



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

El mesènquima embrionari pulmonar i la seva relació en el control del càncer de pulmó

Jordi Canals Serrat



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartitqual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartitqual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

TESI DOCTORAL

Programa de Doctorat Medicina i Recerca Translacional
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut.
Universitat de Barcelona

EL MESÈNQUIMA EMBRIONARI PULMONAR I LA SEVA RELACIÓ EN EL CONTROL DEL CÀNCER DE PULMÓ

Tesi doctoral presentada per **Jordi Canals Serrat**
per optar al grau de doctor per la Universitat de Barcelona

Codirectors: *Dr. Mariano Monzó Planella* i *Dr. Alfons Navarro Ponz*

Departament de Cirurgia i Especialitats Medicoquirúrgiques
Facultat de Medicina-Universitat de Barcelona

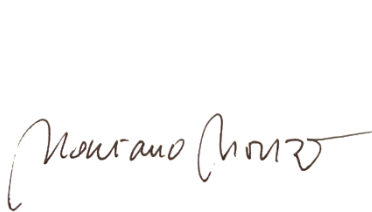
Barcelona, 2022

*Dr. Mariano Monzó Planella i Dr. Alfons Navarro Ponz
Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana
Departament de Cirurgia i Especialitats Medicoquirúrgiques
Facultat de Medicina-Universitat de Barcelona
Universitat de Barcelona*

Certifiquem que:

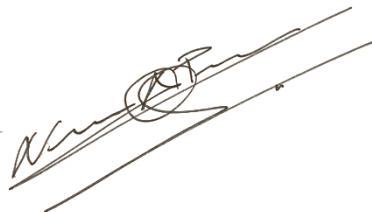
La tesi doctoral titulada “EL MESÈNQUIMA EMBRIONARI PULMONAR I LA SEVA RELACIÓ EN EL CONTROL DEL CÀNCER DE PULMÓ” ha estat realitzada íntegrament, sota la nostra supervisió, per en Jordi Canals Serrat, per optar al grau de Doctor en Medicina i Recerca Translacional, i que l'article que la configura compleix les condicions vigents exigides per la Universitat de Barcelona, pel que considerem la present tesi doctoral apta per la seva presentació.

I, per a que consti, signem aquest document.



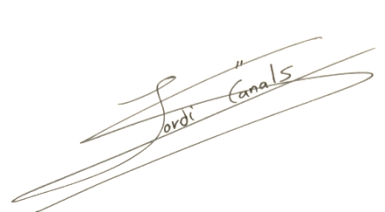
*Dr. Mariano Monzó
Planella*

Director de tesi



*Dr. Alfons Navarro
Ponz*

Director de tesi



*Jordi Canals
Serrat*

*Candidat al grau de
Doctor*

A la meva família,
en especial als meus pares

“We keep moving forward, opening up new doors

and doing new things, because we’re curious...

And curiosity keeps leading us down new paths.”

WALT DISNEY

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi doctoral que teniu a les mans ha estat per mi un somni fet realitat del qual estic molt orgullós; tot i així, no ha estat un camí de roses. Les persones que em coneixen saben que sóc una persona molt optimista i que costa perdre l'alegria, però haig de confessar que fins que no vaig poder iniciar el meu projecte i, posteriorment, publicar l'article, vaig arribar a perdre en varies ocasions l'esperança de poder-la realitzar algun dia. Per això, actualment, estic tant increïblement satisfet del camí que he seguit i la persona que he arribat a ser; fet que no hauria estat possible sense una gran quantitat i varietat de persones que m'han acompanyat en ell i a les que vull agrair aquí el que m'han aportat.

En primer lloc, m'agradaria agrair als esgraons de l'escala, educativa i professional, que he anat pujant fins arribar al laboratori on he pogut dur a terme la tesi doctoral. A l'Escola Sant Joan Baptista i als seus atents professors, per inculcar-me les bases de la meva educació i sempre donar-me suport; em sap molt de greu que actualment hagi hagut de tancar. A la Salle Barceloneta i als seus impecables professors, per fer-me madurar i preparar-me pel pas a la universitat; sobretot al Dr. Joan Ramon Torrella que em va encaminar cap a la Biologia al contagiarme la seva passió degut a la seva gran capacitat pedagògica. A la Facultat de Biologia i als seus magnífics professors, per tot el que he arribat a aprendre durant el Grau i el Màster i per estimular el meu afany de recerca i coneixement; en especial al Dr. Francesc Mestres esplèndid professor i tutor del TFG amb el qual sé que sempre podré comptar i que m'ha orientat en més d'una ocasió. Al Servei Laboratori d'Hematologia (Hospital Germans Trias i Pujol - Institut Català d'Oncologia), concretament, al laboratori de Citogenètica, a la Dra. Isabel Granada i a la Dra. Maria Joao Baptista per acollir-me durant el TFM i presentar-me oficialment el món de la ciència clínica i el laboratori fora de les pràctiques de la carrera. I per últim, al Club Natació Atlètic-Barceloneta que, tot i no estar relacionat amb la meva formació acadèmica, sí que esta relacionat amb la meva formació professional

i com a persona, no podent oblidar de mencionar als meus entrenadors (i posteriorment companys de feina): David Pol, Xavi Miralpeix, Mapi Escriche i Joan Bas. Òbviament, no em vull oblidar de tots els meus ex-companys, ex-companyes (col·legi, batxiller, universitat i club esportiu) i dels meus nedadors i les meves nedadores que no nombraré perquè no hi ha suficients pàgines a la tesi.

En segon lloc, m'agradaria agrair a la Universitat de Barcelona per concedir-me la beca APIF (Ajut de Personal Investigador en Formació) confiant en les meves aptituds i permetent-me poder provar el meravellós món de la docència durant la duració de l'ajut i de poder compartir laboratori amb gent tant especial que m'han fet gaudir sobre manera dels anys que he dedicat a l'elaboració d'aquesta tesi. Relacionat amb el tema docència, agrair, per una banda, als meus ex-alumnes el seu interès per aprendre i la seva actitud positiva que em va motivar a instruir-los el millor possible; i per altre banda, a tot l'equip de la Sala de Dissecció pel seu treball i ajut per la bona realització de les classes. Una menció especial al Departament de Ciències Biomèdiques, concretament a la Cristina Vila i al Dr. Josep Maria Canals, per ajudar a completar l'article d'una manera tant espectacular com són els experiments *in vivo* i per la seva bona predisposició en tot moment. Agrair al Departament de Cirurgia i Especialitats Medicoquirúrgiques, concretament, a la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana que m'han permès dur a terme els experiments i instruir-me encara més enllà, i a tots els seus integrants. A les persones immutables de la unitat (professors, tècnics i secretaries) destacant a la Dra. Neus Ciurana, la Dra. Tania Díaz, la Dolors Fuster, la Trinidad Martínez, el Dr. Tiago Mota, la Dra. Carme Muñoz, el Dr. Josep Maria Potau, el Dr. Jordi Ribas i la Dra. Guadalupe Soria dels quals la seva constància i dedicació m'han inspirat tant i amb els que sempre he pogut comptar. Als clínics i clíniques de l'Hospital Clínic que col·laboren amb nosaltres donant-nos una altre perspectiva i sense els quals no podríem realitzar molts dels estudis que duem a terme, en especial a la Dra. Marina Diaz i al Dr. Jorge Moisés. Als i les estudiants de TFG, TFM i Doctorat, que han passat per la

unitat i que han estat una brisa d'aire fresc a la rutina del laboratori: Marta Casadevall, Sandra Castaño, Raquel Companys, Coralí Cros, Andrés Garisoain, Jara Martin, Jaume Meinhardt, Sara Morales i Lea Vilanova. A la secció oriental del laboratori (Bing Han, Yangyi He i Dr. Yan Li), per obrir-nos a la seva cultura i per la seva generositat infinita. A la resta de becaris APIF, com l'Aroa Casado, pel seu bon cor i per la seva visió crítica i justa del món; la Dra. Sandra Santasusagna, pels seus consells i força; el Dr. Joan Castellano, per ser un referent com a investigador i, sobretot, una persona esplèndida; i la Melissa Acosta, última incorporació APIF, per la seva passió i dedicació en la feina que realitza. I un agraïment especial als meus dos tutors: Al Dr. Alfons Navarro, per combinar una ment brillant per la investigació amb una personalitat pròxima i animada; i al Dr. Mariano Monzó, per ser un referent i un model a seguir, per acollir-me al laboratori i creure en mi, per guiar-me i orientar-me en tot el doctorat, i per ser una meravellosa persona.

En tercer lloc, agrair als meus amics i amigues ja que sense ells la vida seria molt grisa i insuportable. És importantíssim per una persona poder desconnectar de la feina i tenir gent amb qui poder oblidar els problemes i amb qui comptar en els moments més durs; i tinc la sort de tenir bastanta gent en aquest grup. Al grup dels “De fruitis!”, format pels amics i amigues del grau de Biologia dels quals la majoria estan repartits pel món i degut a això no ens veiem tant com voldríem; però que, tot i així, sé que els tinc allà pel que em faci falta: Bet Figuerola, Cristina Garcia, Victor Gonzalez, Adrià Hernández, Albert Jiménez, Sergi Leon, Berta Marcó, Cristina Martin, Elena Vizcaya i Carol Zapater. Al grup dels “Ramen’s boys”, format pel Rubén Gubianes i en Sergi Felguera, els més recentment incorporats al meu grup d'amics però que m'han demostrat molt en poc temps i amb els que passo moments surrealistes tant lúdics com culinaris. Al grup dels “Agapornis”, amics de tota la vida amb infinitat d'aventures i històries compartides, i amb els que només em venen bones experiències al cap que tant de bo amb els anys siguin moltes més: Oscar Abril, Pol Avinyó, Dani Cid, Álvaro Fernández, Edgar Fernández, Alex Montes i Victor Pérez. I en especial, al factor comú dels dos últims grups comentats i

al que considero el meu millor amic, l'Albert Boix, una persona generosa i bondadosa a la que desitjo de tot cor que tot li vagi bé a la vida, que sé que mai em fallarà, que el tindrè a l'instant al meu costat quan el necessiti, i que gràcies a ell el meu món és un lloc molt millor.

I en quart lloc i el més important, agrair a la meva família. La gent més pròxima a mi, que més ha cregut en la meva persona i capacitats, i a qui més estimo. Als meus avis Francesc i Andrea, que ja no estan amb nosaltres, però que estic segur de que estarien orgullosos de mi perquè sempre van confiar en que podria arribar lluny. Al meu iaio Rafel, que també ens ha deixat, un exemple de bona persona, que estava molt orgullós del seu net i que no havia res que no fes per la família. Tant de bo els tres poguessin estar físicament amb mi el dia de la meva defensa de tesis ja que els trobo a faltar. A la meva iaia Paquita i al meu tiet Matías, perquè sempre estan allà, m'han cuidat i sé que m'estimen molt. A la Leia, la meva gateta, incorporació recent a la família que fa companyia inestimable i que sent el seu amor quan s'alegra de veure't cada cop que arribes a casa. A la Claudia Galofré, la meva companya de vida a la que estimo moltíssim. No crec que hagués pogut trobar a ningú millor per mi; que, per una banda, em millorés com a persona fent-me veure les coses amb una perspectiva més objectiva i ajudant-me a créixer, i, per l'altre banda, que m'estimés tal com sóc amb les meves virtuts i tots els meus defectes. Ella m'ha ajudat a ser fort en els moments en que em calia empenta i m'ha animat quan la cosa no semblava tenir sortida, i això no té preu. Relacionat amb ella, agrair a la seva família, en especial als seus pares, Jaume i Montse, al seu germà, Miquel, i a la seva iaia, Pilar (a qui sempre recordaré), per acollir-me com un més des de l'inici i preocupar-se per mi. I per últim, i els que mai em poden faltar, als meus pares, Xavier i Roser, a qui més estimo i a qui agraeixo tot en aquesta vida. Primer, al meu pare que ha lluitat com ningú contra les adversitats (tant familiars, com laborals, com, recentment, de salut) durant tota la seva vida; i que ha estat el millor exemple de persona treballadora i lluitadora. I segon, a ma mare que ha portat a l'infinit els conceptes de persona generosa, atenta i bona gent, al desviure's per tots nosaltres; i no m'equivoco

al dir que no se que faríem sense ella. Ambdós han apostat al 100% en la meva persona, ho han fet tot per mi i sempre els tinc amb mi, m'han volgut donar tot el millor i més, i no trobo paraules suficients per descriure lo increïbles i fabulosos pares que són ja que no podria haver tingut uns millors. Només sento no poder-los estimar més dels que me'ls estimo.

Diuen que una persona és el resultat de les experiències que viu i de la gent que l'ha acompanyat durant la seva vida; i crec cegament que, si no fos per tota aquesta gent que he mencionat en aquests agraïments, jo no seria la persona que sóc ara. Em feu ser la millor versió de mi, moltes gràcies !!!

Jordi Canals Serrat

Finançament: Aquesta tesi doctoral ha estat finançada pel contracte predoctoral APIF-UB 2017/2018 atorgat a l'autor d'aquesta memòria i recolzat per subvencions del Ministeri d'Economia, Indústria i Competència, "Agència Estatal de Recerca" cofinançades amb fons FEDER de la Unió Europea amb el nombre de projecte SAF2017-88606-P (AEI/FEDER, UE) atorgat al Dr. Alfons Navarro Ponz.

ÍNDEX

AGRAÏMENTS	IX
ÍNDEX	XVII
GLOSSARI.....	XXI
ARTICLE QUE COMPOSA LA TESI	XXVII
INTRODUCCIÓ.....	1
1. El microambient embrionari i el càncer	3
1.1. Embriologia vs Càncer	3
1.2. Origen de la relació entre cèl·lules embrionàries i cèl·lules tumorals.....	5
1.2.1. La hipòtesis del blastema i la teoria de les restes embrionàries	5
1.2.2. L'arribada del metabolisme i els primers estudis bioquímics.....	6
1.3. Reprogramació cel·lular per mitjà del microambient embrionari.....	7
1.3.1. Primers estudis on es demostra que el medi embrionari controla la tumorigènesi.....	7
1.3.2. L'embriogènesi en la formació i reprogramació tumoral.....	9
1.3.3. L'organotropisme en el control tumoral	13
1.4. Situació actual: Plasticitat de l'ADN i pluripotència cel·lular	15
1.4.1. El microambient embrionari controlant la malignitat en diverses patologies	15
1.4.2. Reversió de la pluripotència.....	16
2. L'embriologia del pulmó	19
2.1. Bases de l'embriologia pulmonar	19
2.2. Estadis del desenvolupament pulmonar	20
2.2.1. Estadi embrional (Setmanes 4 a 7).....	20
2.2.2. Estadi pseudoglandular (Setmanes 5 a 17).....	21
2.2.3. Estadi canalicular (Setmanes 16 a 26).....	24
2.2.4. Estadi sacular (Setmanes 24 a 38)	26
2.2.5. Estadi alveolar (Setmanes 36 a 8 anys)	28
2.3. Biologia molecular del desenvolupament pulmonar.....	29
3. El càncer de pulmó.....	33
3.1. Epidemiologia	33
3.2. Etiologia	35
3.2.1. Tabac i altres factors implicats en el càncer de pulmó	35
3.2.2. Predisposició genètica i malalties prèvies.....	37

3.3.	Histopatologia del càncer de pulmó	37
3.3.1.	Càncer de pulmó de cèl·lula petita	38
3.3.2.	Càncer de pulmó de cèl·lula no petita	38
3.4.	Clínica del càncer de pulmó.....	40
3.4.1.	Diagnòstic.....	40
3.4.2.	Estadiatge i pronòstic	41
3.4.3.	Tractament.....	41
3.5.	Biologia molecular del càncer de pulmó	42
3.5.1.	Origen del càncer de pulmó.....	42
3.5.2.	Mutacions en l'ADN implicades en el càncer de pulmó	43
3.5.3.	Vies del desenvolupament i diferenciació pulmonar alterades en el càncer de pulmó.....	49
3.5.4.	Alteracions del nombre de còpies d'ADN i reordenacions gèniques en el càncer de pulmó	50
3.5.5.	Influència de l'epigenètica en el càncer de pulmó.....	52
HIPÒTESI I OBJECTIUS		55
MATERIAL I MÈTODES		59
1.	L'obtenció de medis condicionats	61
1.1.	Aïllament i caracterització de les cèl·lules mesenquimals de pulmó embrionari humà	61
1.2.	Condicionament del medi per part de les cèl·lules hEML i les cèl·lules tumorals	63
1.3.	Purificació dels medis condicionats i creació dels medis condicionats lliures d'exosomes.....	64
2.	La caracterització del hEML-CM.....	66
2.1.	Anàlisi dels nivells de TGF- β 1 en T-CM i hEML-CM.....	66
3.	L'estudi del canvi morfològic	67
3.1.	Condicionament de les cèl·lules A549 amb els diferents medis condicionats	67
3.2.	Condicionament de les cèl·lules A549 amb dilucions de hEML-CM.....	67
3.3.	Duració del condicionament de les cèl·lules A549 al retirar el medi hEML-CM	67
3.4.	Condicionament de les cèl·lules H1299 amb els diferents medis condicionats	68
3.5.	Condicionament de les cèl·lules de càncer colorectal, LoVo, amb hEML-CM.....	68
3.6.	Observació en detall del canvi morfològic per microscòpia electrònica	69
3.7.	Neutralització dels nivells de TGF- β 1 en el hEML-CM.....	69
4.	L'anàlisi funcional de les cèl·lules condicionades.....	70
4.1.	Proliferació cel·lular	70

4.2.	Migració cel·lular (Scratch wound healing assay)	70
4.3.	Capacitat de generar colònies 2D (<i>Colony formation assay</i>)	71
4.4.	Capacitat de generar colònies 3D (<i>Soft-agar assay</i>)	71
4.5.	Capacitat tumoral <i>in vivo</i>	72
5.	L'anàlisi molecular i l'estudi de la diferenciació de les cèl·lules condicionades	74
5.1.	Extracció d'ARN i anàlisi de l'expressió gènica	74
5.2.	Tinció de surfactant amb <i>Oil Red O Solution</i>	74
5.3.	Microarray i anàlisi transcriptòmic.....	75
5.4.	Immunofluorescències de marcadors associats a mesènquima i miofibroblasts	76
6.	L'estadística	78
RESULTATS		79
1.	Resultats de l'objectiu 1: La caracterització de les cèl·lules hEML.....	81
1.1.	Les cèl·lules aïllades del pulmó embrionari són cèl·lules mesenquimals.....	81
2.	Resultats de l'objectiu 2: El paper del TGF- β 1 en el canvi morfològic	83
2.1.	El hEML-CM conté nivells més alts de TGF- β 1 comparat amb el T-CM.....	83
3.	Resultats de l'objectiu 3: El canvi morfològic de les cèl·lules tumorals	84
3.1.	Les cèl·lules A549 pateixen un canvi morfològic en hEML-CM indiferentment de la setmana embrional.....	84
3.2.	El canvi morfològic no es degut al desgast de nutrients del medi	85
3.3.	Els exosomes no intervenen en el canvi morfològic	86
3.4.	El canvi morfològic és depenent de la concentració de hEML-CM.....	86
3.5.	La duració del condicionament és limitada i depèn de la presència de hEML-CM.....	87
3.6.	Les cèl·lules H1299 també pateixen un canvi morfològic en hEML-CM.....	89
3.7.	El hEML-CM no afecta a cèl·lules tumorals d'altres òrgans.....	89
3.8.	El canvi morfològic al ser observat per SEM i TEM.....	90
3.9.	El TGF- β 1 col·labora en el canvi morfològic.....	93

4.	Resultats de l'objectiu 4: L'estudi de les alteracions funcionals del condicionament	94
4.1.	Les cèl·lules en hEML-CM tenen menys capacitat de proliferació.....	94
4.2.	Les cèl·lules en hEML-CM tenen menys capacitat de migració	95
4.3.	Les cèl·lules en hEML-CM tenen menys capacitat de generar colònies en 2D.....	95
4.4.	Les cèl·lules en hEML-CM tenen menys capacitat de generar colònies en 3D.....	97
4.5.	Les cèl·lules en hEML-CM tenen menys capacitat tumoral <i>in vivo</i>	97
5.	Resultats de l'objectiu 5: L'estudi de les alteracions moleculares del condicionament	101
5.1.	Les cèl·lules en hEML-CM expressen nivells més baixos de marcadors de pluripotència (<i>OSKM</i>).....	101
5.2.	Les cèl·lules en hEML-CM expressen nivells més baixos de marcadors d'adenocarcinoma pulmonar i pulmó embrionari (<i>NKX2-1</i> i <i>SFTPs</i>)	102
5.3.	Les cèl·lules en hEML-CM expressen nivells més alts d' <i>ADN metiltransferases (DNMTs)</i>	102
5.4.	Les cèl·lules en hEML-CM presenten un genotip diferent de les cèl·lules en T-CM.....	104
6.	Resultats de l'objectiu 6: L'anàlisi de la diferenciació causada pel condicionament.....	107
6.1.	Les cèl·lules en hEML-CM expressen nivells més alts de marcadors mesenquimals (<i>VIM</i> i α - <i>SMA</i>).....	107
6.2.	Les cèl·lules en hEML-CM expressen nivells més alts de marcadors miofibroblàstics (<i>MYH4</i>).....	107
6.3.	Les cèl·lules en hEML-CM tendeixen a semblar-se a cèl·lules mesenquimals i fibroblàstiques.....	110
	DISCUSSIÓ	113
	CONCLUSIONS.....	127
	BIBLIOGRAFIA	131
	ANNEX.....	177

GLOSSARI

ADN:	Àcid desoxiribonucleic
ARN:	Àcid ribonucleic
ARNm:	ARN missatger
BMP2:	<i>Bone morphogenetic protein 2</i> / Proteïna morfogenètica òssia 2
BMP4:	<i>Bone morphogenetic protein 4</i> / Proteïna morfogenètica òssia 4
BSA:	<i>Bovine serum albumin</i> / Albúmina de sèrum boví
c-MYC:	MYC proto-oncogene
CE:	Carcinoma embrionari
CP:	Càncer de pulmó
CPCNP:	CP de cèl·lula no petita
CPCP:	CP de cèl·lula petita
DEG:	<i>Differentially expressed genes</i> / Gens diferencialment expressats
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNMT3A:	ADN metiltransferasa 3A
DNMT3B:	ADN metiltransferasa 3B
DNMTs:	ADN metiltransferases
DPBS 1x:	Dulbecco's phosphate buffered saline / Solució salina
E10:	Embrió de 10 setmanes

E11:	Embrió de 11 setmanes
E9:	Embrió de 9 setmanes
EB:	<i>Embryoid bodies</i> / Cossos embrioides
EGFR:	<i>Epidermal growth factor receptor</i> / Receptor del factor de creixement epidèrmic
EMT:	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i> / Transició d'epiteli a mesènquima
ESC:	<i>Embryonic stem cells</i> / Cèl·lules mare embrionàries
FBS:	<i>Fetal bovine serum</i> / Sèrum boví fetal
FGF10:	<i>Fibroblast growth factor 10</i> / Factor de creixement de fibroblasts 10
FGF4:	<i>Fibroblast growth factor 4</i> / Factor de creixement de fibroblasts 4
FGFR2IIIb:	<i>FGF receptor 2 isoform IIIb</i> / Isoformes IIIb dels receptors 2 de FGFs
FGFs:	<i>Fibroblast growth factors</i> / Factors de creixement de fibroblasts
FISH:	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> / Hibridació fluorescent <i>in situ</i>
GEO:	Gene Expression Omnibus
GO:	Gene Ontology
hEML-CM:	<i>Human embryonic mesenchymal lung - conditioned medium</i> / Medi condicionat de cèl·lules mesenquimals de pulmó embrionari humà

hEML:	<i>Human embryonic mesenchymal lung cells</i> / Cèl·lules mesenquimals de pulmó embrionari humà
HLF:	<i>Human lung fibroblasts</i> / Fibroblasts pulmonars humans
HPAEC:	<i>Human pulmonary artery endothelial cells</i> / Cèl·lules primàries endotelials d'arteria pulmonar humana
iPSCs:	<i>Induced pluripotent stem cells</i> / Cèl·lules mare pluripotents induïdes
KLF4:	Kruppel like factor 4
KRAS:	Kirsten-Ras
LEFTY1:	Left-right determination factor 1
LEFTY2:	Left-right determination factor 2
MAPK:	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> / Proteïnes quinases activades per mitogens
miARNs:	microARNs
MYH1:	Miosina 1
MYH16:	Miosina 16
MYH2:	Miosina 2
MYH3:	Miosina 3
MYH4:	Miosina 4
MYH7:	Miosina 7
MYHs:	Miosines
NDS:	<i>Normal donkey serum</i> / Sèrum de burra

NKX2-1:	NK2 homeobox 1 gene
NPM:	Nínxol pre-metastàtic
OCT-3/4:	Octamer-binding transcription factor 3/4
OMS:	Organització Mundial de la Salut
OSKM:	OCT-3/4; SOX2; KLF4; c-MYC
PBTx:	Tritó X-100 al 0,5% en DPBS 1x
PS:	<i>Penicillin/streptomycin</i> / Penicil·lina/estreptomicina
qRT-PCR:	Quantitative real-time polymerase chain reaction
RA:	Àcid retinoic
RPMI 1640:	Roswell Park Memorial Institute 1640 medium
SEM:	<i>Scanning electron microscope</i> / Microscopi electrònic de rastreig
SFTPA:	<i>Surfactant protein A</i> / Proteïna surfactant A
SFTPB:	<i>Surfactant protein B</i> / Proteïna surfactant B
SFTPC:	<i>Surfactant protein C</i> / Proteïna surfactant C
SFTPD:	<i>Surfactant protein D</i> / Proteïna surfactant D
SFTPs:	Surfactants
SHH:	Sonic Hedgehog
SNP:	<i>Single nucleotide polymorphism</i> / Polimorfismes de nucleòtids únics
SOX2:	SRY-box transcription factor 2

SOX9:	SRY-box transcription factor 9
SSEA:	<i>Stage specific embryonic antigens</i> / Antígens embrionaris específics de cada etapa
T-CM:	<i>Tumoral - conditioned medium</i> / Medi condicionat tumoral
TCs:	Teratocarcinomes
TEM:	<i>Transmission electron microscope</i> / Microscopi electrònic de transmissió
TFs:	<i>Transcription factors</i> / Factors de transcripció
TGF- β :	<i>Transforming growth factor β</i> / Factor de creixement transformant β
TNF- α :	<i>Tumor necrosis factor α</i> / Factor de necrosis tumoral α
TTF-1:	<i>Thyroid transcription factor 1</i> / Factor de transcripció tiroïdal 1
VEGFA:	<i>Vascular endothelial growth factor A</i> / Factor de creixement endotelial vascular A
VEGFs	<i>Vascular endothelial growth factors</i> / Factors de creixement endotelial vascular
VIM:	Vimentina
VSR:	Virus del sarcoma de Rous
WNT2:	Wingless-Type MMTV integration site family member 2
WNT2b:	Wingless-Type MMTV integration site family member 2b
α -SMA:	<i>α-Smooth muscle actine</i> / Actina- α de musculatura llisa

ARTICLE QUE COMPOSA LA TESI

La següent tesi doctoral es presenta en format clàssic amb un article annexat. Els objectius de l'article són els mateixos que els d'aquesta tesi doctoral i es poden trobar a l'apartat "Hipòtesis i Objectius".

L'article en qüestió va ser acceptat el 06/12/2021 i publicat el 26/01/2022 i és el següent:

Canals J, Navarro A, Vila C, Canals JM, Díaz T, Acosta-Plasencia M, Cros-Font C, Han B, He Y, Monzó M. Human embryonic mesenchymal lung-conditioned medium promotes differentiation to myofibroblast and loss of stemness phenotype in lung adenocarcinoma cell lines. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022; 41, 37. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02206-z>. FI (2020) = 11.161, Q1 (Oncology) JCR2020.

L'article complet en el format de la revista es troba adjunt a l'annex.

INTRODUCCIÓ

1. EL MICROAMBIENT EMBRIONARI I EL CÀNCER

1.1. Embriologia vs Càncer

L'embriologia és la branca de la biologia que s'encarrega d'estudiar la morfogènesis i el desenvolupament embrionari des d'una única cèl·lula fecundada fins al naixement d'un ésser viu. A partir d'aquesta única cèl·lula fecundada, el zigot, s'organitzen teixits, es modelen òrgans i es forma un organisme biològicament estable. Per tant, podem afirmar que la cèl·lula fecundada, que està indiferenciada i és molecularment totipotent, conté el conjunt d'instruccions necessàries per formar tot un organisme. Actualment, es sap que totes aquestes instruccions estan gravades en forma de missatges codificats en el àcid desoxiribonucleic (ADN), el nostre material genètic; d'aquesta manera, si rep les senyals adequades té la capacitat de transformar-se en un organisme de gran complexitat morfològica i molecular. En paral·lel, durant el desenvolupament embrionari es formen microambients cel·lulars, d'origen tant embrionari com matern, que produeixen senyals que poden activar o reprimir parts del nostre codi genètic amb la finalitat d'orientar el creixement i regular la diferenciació cel·lular.

En contraposició, el càncer és un conjunt de malalties on s'observa un procés descontrolat de divisió cel·lular, sense coordinació amb el teixit adult i que persisteix al llarg del temps. La massa anormal, que té certa autonomia, manca d'una finalitat i s'apodera del hoste. En l'estudi del càncer s'estudia el fet de com una cèl·lula sana, morfològicament complexa i molecularment unipotent, adquireix un rol maligne amb el que pot destruir teixits, desorganitzar òrgans i formar estructures biològicament inestables. Aquesta cèl·lula, que d'origen era sana, per tal d'expandir-se i transformar altres cèl·lules normals en tumorals, envia senyals creant un microambient a la zona que l'envolta.

Introducció

En ambdós casos, podem assumir que l'ADN és el mateix tant en cèl·lules embrionàries com en cèl·lules adultes, ja que no hi ha increment de material genètic, però sí que respon diferent segons les senyals que li arriben del microambient. Per una banda, el microambient embrionari controla tot un procés de creixement organitzat, una diferenciació cap a la normalitat i la creació d'estructures integrals; i per l'altra banda, el microambient tumoral estimula un creixement descontrolat, una indiferenciació cel·lular i una disseminació tumoral. En el que s'ha comentat ara mateix podem intuir una possible relació entre els dos microambients que són tant similars i oposats a la vegada.

Tot i que sembli un tema nou, aquesta relació entre cèl·lules embrionàries i tumorals, i dels seus respectius microambients, es porta tractant des de fa molts anys. Inicialment, i anterior als actuals coneixements de la biologia molecular, van aparèixer treballs pioners en plantejar la idea de com el desenvolupament embrionari pot relacionar-se en el control o la formació de tumors. A posteriori, amb els avenços tecnològics, es va demostrar que emprant gens embrionaris en cèl·lules somàtiques adultes, aquestes es reprogramaven a un estat de major pluripotència. Aquests resultats posen en manifest dos fets importants: La gran plasticitat de l'ADN davant estímuls exògens; i que mecanismes moleculars reguladors de la embriogènesis poden ser utilitzats i ser funcionals en altres circumstàncies.

En aquest apartat de la introducció, en primer lloc, comentarem la història d'aquestes teories i treballs inicials que tractaven la relació entre les cèl·lules embrionàries i les tumorals amb els seus corresponents microambients, abans i després de la considerada nova era de la biologia molecular; i en segon lloc, l'estat en que es troba actualment la ciència envers aquesta temàtica.

1.2. Origen de la relació entre cèl·lules embrionàries i cèl·lules tumorals

El 1773 en un concurs ofert per la *Lyon Academy of Science* en que es buscava un estudi original sobre el tema “*What is cancer?*”, el premi l’obtingué el cirurgia i químic Bernard Peyrilhe que realitzà un experiment on injectava extractes de tumors humans a gossos (1). Aquest treball no va aclarir que era el càncer, però va permetre, juntament amb altres estudis, diferenciar entre tumors benignes i malignes. Derivat d’aquests estudis i d’un augment en el coneixement de l’embriologia, a principis del segle XIX, molts científics de l’època van començar a observar certes similituds entre les cèl·lules embrionals i les cèl·lules tumorals.

1.2.1. La hipòtesis del blastema i la teoria de les restes embrionàries

Tot i així, per trobar el primer indicatiu científic en que es relacionen les cèl·lules embrionàries i les cèl·lules tumorals ens hem de remuntar al 1838, quan Johannes Peter Müller, anatomista i patòleg, va exposar la teoria del blastema. Müller, observant teixit tumoral al microscopi, va observar la presència de cèl·lules amb característiques morfològiques anormals, que anomena el blastema, i teoritzava que són les responsables de les formacions tumorals (2). A favor de la teoria del blastema, Karl Bruch, un anatomista, per mitjà d’estudis amb microscopi estableix l’existència de similituds morfològiques entre les cèl·lules embrionals i les cèl·lules canceroses del blastema (3). En paral·lel als estudis de Müller, l’anatomista Adolph Hannover descriu característiques de les cèl·lules canceroses del blastema assumint que certes cèl·lules tumorals poden passar al torrent circulatori i créixer a distància, el que coneixem actualment com metàstasi (4).

El treball de Müller va ser continuat i actualitzat pels seus alumnes, Robert Remak i Rudolph Virchow. El 1852, Remak, estudiant a fons l’embriologia, va evidenciar l’existència de tres capes embrionàries (ectoderm, mesoderm i endoderm) que es multiplicaven per la divisió dels seus nuclis no només per generar més cèl·lules embrionàries, sinó per formar també cèl·lules normals

Introducció

i anormals. A més, Remak, va postular que els tumors són d'origen epitelial (5). Per altre banda, Virchow considera que l'origen dels tumors no esta en el blastema, sinó que hi ha una predisposició hereditària i que l'efecte traumàtic i irritatiu en el teixit conjuntiu té una repercussió fonamental en el desenvolupament tumoral (6). Aquesta hipòtesis es compartida pels cirurgians James Paget i John Simon (7, 8).

Anys més tard, els teratocarcinomes (TCs) són descrits, per Virchow, com formacions tumorals formades per la barreja de teixits embrionaris anormals i adults, i aquest fet deriva en que Julius Friedrich Cohnheim, fisiopatòleg alumne de Virchow, proposi la teoria de les restes embrionàries. Ell considera que durant el desenvolupament embrionari, mentre unes cèl·lules proliferen de forma dirigida i organitzada, unes altres cèl·lules queden en estat latent embrionari degut a una sobreproducció. Més endavant, aquestes últimes serien les que a l'adult s'activarien generant les formacions tumorals (9). Un any abans del treball de Cohnheim, Francesco Durante, polític i cirurgia, publicava el seu estudi en que afirmava que restes de teixit embrionari en l'adult eren les encarregades de les formacions tumorals malignes (10).

1.2.2. L'arribada del metabolisme i els primers estudis bioquímics

Amb el pas del temps i l'aparició de noves tecnologies, a l'inici del segle XX, es comencen a conèixer les transformacions energètiques que acompanyen als processos biològics, donant lloc al concepte de metabolisme. L'estudi del metabolisme de les cèl·lules embrionals i tumorals, que no va trigar en arribar, va posar de manifest, experimentalment, les semblances bioquímiques entre aquests dos tipus cel·lulars gràcies als avenços de la química orgànica. Així, en el metabolisme lipídic, el 1925, es va observar que es trobava molt reduït tant en els embrions com en els tumors, ja que les cèl·lules normals són capaces de metabolitzar certs lípids que per les cèl·lules embrionàries i tumorals és més difícil (11). Respecte el metabolisme proteic, el 1927, es va observar que l'arginasa, un enzim responsable del metabolisme de l'arginina,

es trobava altament expressat tant en teixits embrionals com en tumorals, però no en teixits normals (12).

En el camp del metabolisme, el treball més destacable de l'època fou realitzat l'any 1926 per Otto Warburg, on demostrava que les cèl·lules embrionàries i tumorals utilitzen la via de la glicòlisi, i no la fosforilació oxidativa, com a mitjà d'obtenció d'energia a través de la glucosa, i com a conseqüència produeixen un excés d'àcid làctic (13). Derivat d'aquests resultats, investigadors com Duran i Reynals (14) i Bierich (15) van suggerir que l'àcid làctic que alliberaven les cèl·lules tumorals podria tenir la finalitat de preparar el terreny pel creixement de posteriors neoplàsies, fet que actualment esta demostrat. D'aquesta manera, per primer cop, es va demostrar la importància d'un microambient que facilita el creixement tumoral.

De l'estudi de Warburg, també es va poder extreure que en les primeres fases del desenvolupament, on no hi ha aportació d'oxigen, la glucosa es metabolitza igual que en les cèl·lules tumorals, per la via de la glicòlisi, mostrant una semblança metabòlica entre l'embriologia i la tumorogènesis. Aquest és un punt interessant ja que, tot i tenir el mateix tipus de metabolisme de la glucosa, les cèl·lules tumorals segueixen un comportament metabòlic caòtic, mentre que les embrionàries segueixen un procés ordenat.

1.3. Reprogramació cel·lular per mitjà del microambient embrionari

1.3.1. Primers estudis on es demostra que el medi embrionari controla la tumorogènesis

Entre 1909 i el 1911, s'inicia l'oncologia experimental quan Peyton Rous va realitzar amb gallines Plymouth Rock una sèrie d'experiments amb resultats molt significatius: Primer, que la implantació de triturats de sarcoma d'una gallina a una altra produeix un nou sarcoma; i segon, que si aquest triturat es passa per una membrana que reté bactèries i s'implanta el filtrat, també es genera un nou sarcoma (16). En aquell moment es desconeixia que contenia

Introducció

aquell filtrat que era capaç de produir sarcomes, però més endavant es va descobrir que era un retrovirus que es va anomenar com a virus del sarcoma de Rous (VSR). Per aquests experiments Rous va rebre el premi Nobel de Medicina el 1966.

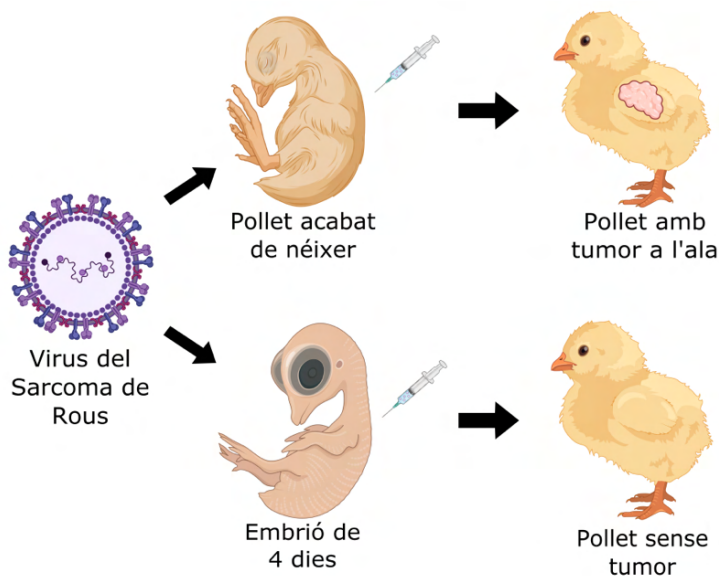


Figura 1. Experiment de Dolberg i Bisell del 1984. En aquest experiment els autors van infectar amb el VSR tant pollets acabats de néixer com embrions de pollet de quatre dies de gestació. Com s'ha comentat, el VSR és un virus amb la capacitat de produir tumors i se'ls va injectar a les ales i esbossos d'ala dels subjectes. El que van observar és, per una banda, que els pollets acabats de néixer, als 10 dies de la inoculació, van desenvolupar tumors a la zona de la punció; i per l'altre banda, que els embrions infectats van donar lloc a pollets sense cap tipus de tumor. Aquests resultats van indicar que el medi embrionari genera algun tipus de control envers la tumorogènesis. Figura adaptada de (17).

A partir del treball de Rous, es va iniciar una línia experimental que proporcionava la capacitat d'analitzar el desenvolupament de cèl·lules tumorals quan són injectades en un medi embrionari. El primer treball relacionat amb aquesta temàtica va ser realitzat per Murphy i Rous que van inocular VSR de gallines adultes en gallines adultes i en embrions de pollastre. Van observar que en el cas dels adults es desenvolupaven tumors amb capacitat invasiva i histologia similar a la dels sarcomes origen, mentre que en el cas del embrions el resultat variava segons la zona d'injecció o l'edat de l'embrió (18). Aquest treball es va ampliar i complementar amb altres que el

van seguir, com el de Milford i Duran i Reynals (19) o, el més destacable, de Dolberg i Bisell (17). En aquest últim, van inocular el VSR a l'esbós de l'ala d'embrions de pollastre observant que no es formaven tumors; però, per contra, si l'inoculaven a l'ala de pollets acabats de néixer, apareixien formacions tumorals. A partir d'aquí es van mostrar les primeres evidències de que el microambient embrionari pot afectar positivament i reprimir el creixement tumoral (Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

1.3.2. L'embriogènesi en la formació i reprogramació tumoral

Els embrions i la formació de tumors

A la dècada dels anys 50, Leroy Stevens, va observar que els ratolins de la soca 129 desenvolupaven espontàniament tumors testiculars, els quals eren histològicament classificats com a TCs. La capacitat maligne d'aquests tumors era evident per la seva habilitat en generar nous tumors quan eren injectats subcutàniament o intraperitonealment en altres ratolins de la soca 129 (20). Anys més tard, el mateix autor va demostrar que la incidència dels TCs augmentava significativament quan s'injectaven crestes genitals embrionàries de 12,5 dies de gestació en la càpsula renal o en el testicle de ratolins adults; mentre que sorprenentment la incidència tumoral disminuïa molt si la injecció era a la melsa o bé si eren crestes genitals de 13 dies de gestació. En aquests treball, l'autor va suggerir que la malignitat tumoral provenia de cèl·lules embrionàries indiferenciades de la cresta genital, les quals serien les cèl·lules tumorals en origen (21). D'aquesta manera es pot dir que es va anticipar al concepte actual de cèl·lules mare canceroses. Continuant amb Leroy Stevens i els seus col·laboradors, l'any 1970, van ser els primers en descriure com cèl·lules embrionàries poden donar lloc a cèl·lules tumorals. En el seu experiment van injectar embrions de ratolí en fase de gàstrula a la càpsula suprarenal i testicle de ratolins adults. El que van poder observar va ser com aquests embrions acabaven transformant-se en tumors malignes, els quals tenien característiques histològiques de TCs. Curiosament, si els embrions eren implantats en altres zones anatòmiques del ratolí, com per

Introducció

exemple la melsa, no evolucionaven a tumor (22). Aquests dos últims estudis junts van posar en manifest com és d'important el microambient de la zona on s'implanta la futura formació tumoral, suggerint un cert control organotrópic.

En paral·lel, en els anys 70, és quan Davor Solter i el seu equip obtenen resultats similars quan injecten embrions de ratolí de 3 a 6 dies de gestació a testicles o capsules renals d'animals adults. Aquí es va posar de nou en manifest que un embrió jove pot donar lloc a una formació tumoral quan es col·loca en una zona ectòpica; reafirmant que un embrió aïllat del seu microambient embrionari deixa d'estar controlat. A més, aquests tumors es podien mantenir *in vivo* al trasplantar-los subcutàniament o intraperitonealment en ratolins adults. En el cas del trasplantament intraperitoneal, el ratolí desenvolupava una ascitis on es van obtenir unes estructures derivades del tumor anomenades cossos embrioides (EB, de l'anglès *embryoid bodies*) degut a la gran semblança que tenien amb les primeres fases de la embriogènesis (23). Seguint amb l'estudi dels EB, Monzó i col·laboradors, van demostrar que estaven formats per una capa externa de cèl·lules de característiques endodèrmiques que envolten a una població de cèl·lules indiferenciades de carcinoma embrionari (CE). Aquestes cèl·lules són les responsables de les noves formacions tumorals que es generen quan els EB són injectats subcutàniament o intraperitonealment en altres animals d'experimentació (**Figura 2**)(24).

Una altre semblança interessant entre els embrions i els EB és que les cèl·lules de CE comparteixen amb els embrions diversos marcadors d'expressió, com per exemple els antígens embrionaris específics de cada etapa (SSEA, de l'anglès *stage specific embryonic antigens*), la fibronectina i la laminina, entre altres (25, 26). Aquest conjunt de treballs ens mostra com les cèl·lules embrionals poden desenvolupar un fenotip maligne si modifiquem el seu microambient.

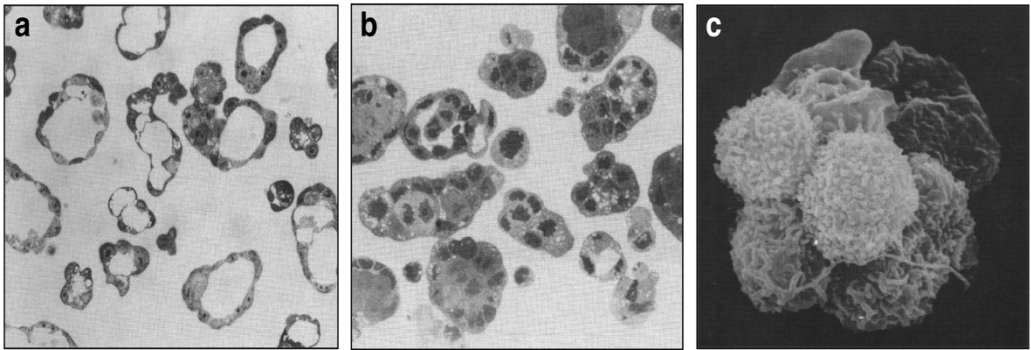


Figura 2. Observació de EB per microscòpia. (a, b) Imatges de EB per microscòpia òptica on es veu clarament la gran semblança que tenen amb les primeres fases de la embriogènesis. **(c)** Imatge de EB per microscopi electrònic de rastreig. Figura adaptada de (24).

Els embrions i la reprogramació tumoral

Treballant *in vivo* i amb mamífers, concretament en ratolins, es va dur a terme un dels treballs pioners i més representatiu on es demostra l'influència del medi embrionari en el control total de les cèl·lules tumorals. Com es detalla a la **Figura 3**, els autors, obtenen EB derivats d'un TC de ratolins de pell negra. A continuació, aïllen les cèl·lules malignes de CE dels EB i les implanten a l'interior de la cavitat blastocèlica d'un ratolí de pell blanca. Aquests blastocists són injectats a la matriu d'una mare gestant adoptiva, on es desenvolupen donant lloc a ratolins normals i quimèrics de pell blanca amb taques negres. D'aquesta manera es demostra que les cèl·lules malignes de CE, es poden controlar totalment pel blastocist i fent-les formar part dels teixits i òrgans interns de l'animal (27, 28).

En un altre treball, amb la finalitat de comprovar si cèl·lules tumorals diferents a les de CE també eren controlades pels blastocists, es van injectar cèl·lules de leucèmia mieloide L1210, de sarcoma 180 i de neuroblastoma C1300, a l'interior de la cavitat blastocèlica de ratolins. En aquest cas, cap d'aquestes cèl·lules van estar controlades i van donar lloc a formacions tumorals (29).

Introducció

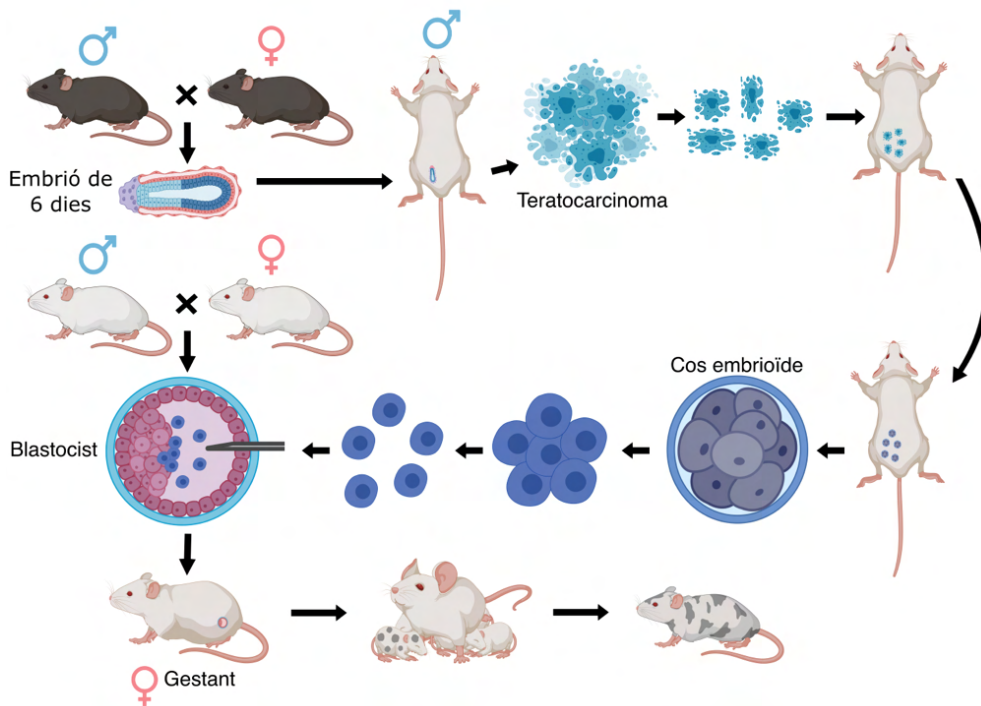


Figura 3. Experiment de Mintz i Ilmensee del 1975. Del creuament de dos ratolins negres es va seleccionar un embrió de sis dies i es va trasplantar a la capsula testicular d'un ratolí blanc. Aquest embrió va esdevenir en un teratoma, que es va fragmentar i implantar intraperitonealment a un altre ratolí blanc. Amb el temps, els fragments de teratoma van donar lloc a EB que es van extirpar i les seves cèl·lules malignes van ser aïllades i inoculades dins d'un blastocist provinent del creuament de dos ratolins blancs. Aquest blastocist va ser introduït dins la matriu gestant d'un ratolí femella blanc. El resultat fou que una de les cries nascudes era quimèrica (ratolí blanc amb taques negres) donant a entendre que les cèl·lules tumorals, originalment provinents de l'embrió de ratolins negres, havien estat controlades i van acabar ajudant al normal desenvolupament del ratolí. Figura adaptada de (27).

Paral·lelament als estudis en animals d'experimentació, es van realitzar importants estudis *in vitro* que han estat fonamentals per comprendre el funcionament de les cèl·lules mare. Relacionat amb el recent comentat, a la dècada dels anys 80, Gail Martin i Martin Evans, dos anatomistes i embriòlegs, van demostrar que cultius de cèl·lules de la massa interna del blastocist, podien donar lloc a TCs o podien diferenciar-se en diferents tipus cel·lulars totalment normals. A les cèl·lules totipotents derivades dels TCs que podien donar lloc a formacions tumorals, les van anomenar cèl·lules de

carcinoma embrionari; mentre que les cèl·lules totipotents derivades de la massa interna del blastocist que podien donar lloc a teixits diferenciats normals, les van anomenar ESC (30, 31). Per aquest treball, Evans, va rebre el Premi Nobel de Medicina el 2007.

1.3.3. L'organotropisme en el control tumoral

No obstant, altres investigadors suggereixen que el control de les cèl·lules tumorals podria ser òrgan i edat dependent; com per exemple, el treball en que es van injectar cèl·lules de leucèmia mieloide en matrius de ratolins gestants i van acabar formant part del sistema sanguini de l'adult (32). En un altre estudi, es va observar que quan s'injectaven cèl·lules de neuroblastoma C1300 en el segon somita, en el fetge i en el testicle de ratolí; només hi havia una significativa reducció tumoral en les cèl·lules injectades en el somita, mentre que apareixen tumors en el fetge i el testicle (33). Un dels treballs on es posa de manifest més clarament la importància de l'organotropisme en el control de la malignitat, és el realitzat el 1994 per Monzó i col·laboradors. Aquests autors van injectar cèl·lules de CE marcades amb el gen *LacZ*, anomenades ES-D3, a l'interior de matrius gestants i no gestants de ratolins 129/Sv. Gràcies al marcatge amb *LacZ*, es van localitzar les cèl·lules un cop injectades. El que es va poder observar va ser que en les matrius gestants, les cèl·lules ES-D3 no formaven tumors i es diferenciaven en endoderma visceral a les membranes extraembrionàries; i, per contra, en les matrius no gestants apareixen grans formacions tumorals de TCs. Els autors van suggerir que senyals del medi gestacional podrien controlar tant el desenvolupament embrionari com també el tumoral (**Figura 4**)(34).

Com a resultat de tots aquests treballs, es va arribar a la hipòtesis proposada pel patòleg Barry Pierce que va plantejar que les cèl·lules mare dels teixits adults normals tenen les mateixes potencialitats que les cèl·lules mare tumorals. Per tant, l'origen de les neoplàsies podria ser deguda més a canvis d'expressió gènica per una desorganització dels teixits durant el desenvolupament, que per un efecte mutacional, que en tot cas apareixeria

Introducció

més tard en el creixement tumoral (35). Aquest fet va obrir la porta a la idea de que el coneixement de com l'embrió regula i controla la seva proliferació i diferenciació podria ser la clau per trobar una bona alternativa al tractament dels tumors.

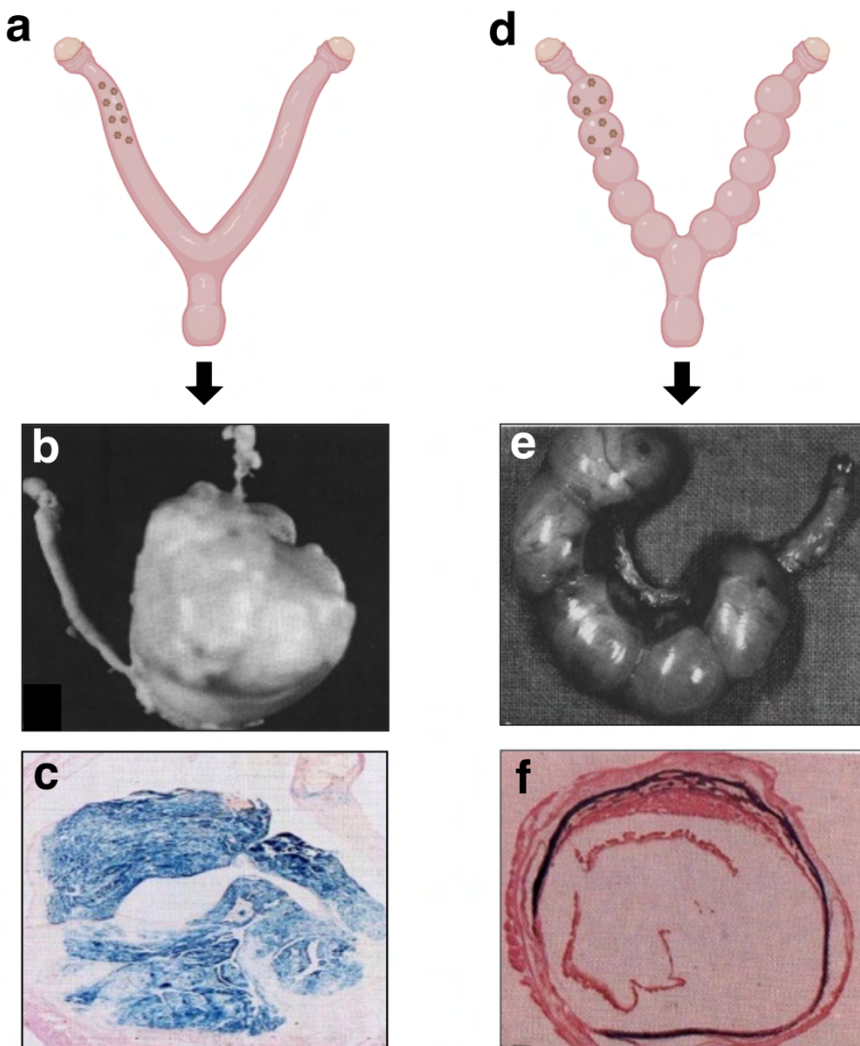


Figura 4. Experiment de Monzó i col·laboradors del 1994. (a) Van injectar cèl·lules de CE marcades amb el gen *LacZ* (blau) a l'interior de matrius no gestants de ratolí. **(b, c)** Es van produir grans formacions tumorals de TCs, generades per les cèl·lules marcades. **(d)** El mateix experiment en matrius gestants. **(e, f)** La matriu es desenvolupa de forma normal; i les cèl·lules no formen tumors al diferenciar-se en endoderma visceral. Figura adaptada de (34).

1.4. Situació actual: Plasticitat de l'ADN i pluripotència cel·lular

1.4.1. El microambient embrionari controlant la malignitat en diverses patologies

A l'inici del segle XXI i amb els nous coneixements i tècniques de la biologia molecular, es reprenen els estudis per determinar la capacitat del microambient embrionari per controlar les cèl·lules tumorals. En aquesta direcció, les investigacions es focalitzen en comprovar si tumors diferents als TCs també poden ser controlats pel medi embrionari, els mecanismes moleculars implicats, i l'influència organotrópica del medi en el control tumoral.

En el càncer de mama, s'ha vist que les cèl·lules de les línies 4T1, MDA-MB-231, MCF-7, T47D, MDA-MB-468, MDA-MB-330 i ZR75-30, perden la seva capacitat de proliferació, neovascularització i metastasis quan són cultivades en un medi condicionat procedent de ESC. També es va demostrar que la pèrdua de malignitat de les cèl·lules de càncer de mama és per segregació de factors de les ESC que inhibeix la via Nodal-Stat3 (36, 37).

En melanoma, s'ha vist que quan es realitza una injecció de cèl·lules metastàtiques de melanoma en les gàstrules de peix zebra, no es formen tumors; i que les cèl·lules de melanoma es localitzen disperses en tots el teixits, però sense capacitat tumoral (38). En un altre estudi en embrions de pollet, es van injectar cèl·lules metastàtiques de melanoma a la zona de la cresta neural, que és la zona embrionària d'on surten els melanòcits. El resultat va ser que les cèl·lules malignes de melanoma canviaven el seu fenotip maligne i adquirien característiques morfològiques i moleculars de melanòcits. Destaquem que aquest treball posa un cop més en rellevància la importància organotrópica en el control tumoral (39). També s'ha vist que al cultivar cèl·lules metastàtiques de melanoma de la línia C8161, negatives en l'expressió del marcador de melanòcits Melan-A, en un medi condicionat procedent de ESC, les cèl·lules metastàtiques perden el seu fenotip maligne, canvien la seva morfologia i comencen a expressar Melan-A (40). I com últim

Introducció

exemple en melanoma, a l'estudiar els mecanismes moleculars implicats en el canvi de maligne a benigne en els melanomes sota l'influència del medi embrionari, es va comprovar la importància de la inhibició de la via Nodal com s'havia observat en el càncer de mama (41).

En el càncer colorectal, quan es van analitzar i comparar genèticament l'expressió d'ARN missatgers (ARNm) entre cèl·lules de càncer colorectal de pacients quirúrgics, cèl·lules embrionàries humanes de colon i cèl·lules sanes de colon, es van observar patrons d'expressió d'ARNm molt similars entre les cèl·lules tumorals i les embrionàries; i que el clúster 17-92, té un paper fonamental en la transformació tumoral i la regulació embrionària a través de la proteïna E2F1 (42).

Per últim, en el càncer de pulmó s'ha analitzat l'expressió de les proteïnes PIWI, que tenen un paper fonamental en la regulació gènica, entre cèl·lules embrionàries de pulmó humà i mostres parellades de 77 pacients amb càncer de pulmó de cèl·lula no petita (CPCNP) amb el seu teixit pulmonar normal. Es va observar que PIWIL1 i PIWIL4 s'expressaven tant en teixit pulmonar embrionari com en el tumoral, però no en el teixit pulmonar normal. D'aquesta manera es va demostrar significativament que l'expressió de PIWIL1 i PIWIL4 era un factor de mal pronòstic en els pacients de CPCNP (43).

1.4.2. Reversió de la pluripotència

La pluripotència, canònicament, suposa passar d'un estat cel·lular indiferenciat a una diferenciació cel·lular i no al revés. La capacitat pluripotent la presenten tant les cèl·lules ESC com les cèl·lules indiferenciades tumorals. No obstant això, tots els treballs presentats fins ara mostren que el nostre ADN no és un codi hermètic, inamovible i unidireccional, sinó que disposem d'una gran plasticitat ja que tota la informació per donar lloc a qualsevol tipus cel·lular es troba a l'abast de les cèl·lules embrionàries i tumorals. Aleshores, l'important per a manipular aquesta plasticitat cel·lular són els estímuls que li arriben a la cèl·lula; i per

tant, la reprogramació cel·lular depèn de senyals i mecanismes capaços d'actuar sobre l'ADN. D'aquests estímuls, els més estudiats van ser els factors de transcripció (TFs, de l'anglès *transcription factor*) proteïnes que poden unir-se a seqüències d'ADN activant o bloquejant vies cel·lulars.

En aquesta direcció, sorgeixen els treballs de Yamanaka i els seus col·laboradors. En primer lloc, van obtenir un llistat de gens més altament expressats en ESC que en cèl·lules diferenciades. A continuació, per mitjà de retrovirus van transfectar cèl·lules diferenciades per sobreexpressar els gens del llistat obtingut. Finalment, van poder observar que la combinació de quatre gens que actuaven com TFs, *OCT-3/4* (de l'anglès *octamer-binding transcription factor 3/4*), *SOX2* (de l'anglès *SRY-box transcription factor 2*), *KLF4* (de l'anglès *kruppel like factor 4*) i *c-MYC* (de l'anglès *MYC proto-oncogene*)(*OSKM*) quan eren injectats en fibroblasts normals, produïa un canvi morfològic i molecular en aquestes cèl·lules diferenciades i els atorgava capacitat de pluripotència donant lloc a les actualment conegudes com cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSCs, de l'anglès *induced pluripotent stem cells*). D'aquesta manera es va poder revertir el rellotge biològic i transformar cèl·lules adultes en cèl·lules indiferenciades amb característiques ESC. Aquest conjunt de TFs se'l va conèixer popularment com a còctel Yamanaka (44, 45). Yamanaka va rebre el Nobel de Medicina el 2012. Amb la descoberta d'aquests factors embrionaris, va començar una nova era en la medicina i la manipulació de les cèl·lules mare amb finalitats terapèutiques. No obstant, va sorgir un problema al reprogramar cèl·lules amb finalitats terapèutiques: el risc de poder desenvolupar formacions tumorals (46).

Totes les investigacions referenciades fins ara, suggereixen que entre la cèl·lula mare i el microambient que l'envolta s'estableix un diàleg de senyals moleculars que condicionen el seu fenotip i genotip. Això recorda a com en la embriogènesis dels mamífers, pel correcte desenvolupament dels òrgans, són necessaris els intercanvis de senyals moleculars que es duen a terme entre el mesènquima i l'epiteli embrionari. Un aspecte que no s'ha analitzat fins ara

Introducció

és si les cèl·lules mesenquimals embrionàries de pulmó creen un microambient que controli les cèl·lules tumorals de pulmó. Per això, es imprescindible conèixer bé les etapes del desenvolupament embrionari del pulmó i les seves vies moleculars.

2. L'EMBRIOLOGIA DEL PULMÓ

2.1. Bases de l'embriologia pulmonar

Degut a que la tesis es centra en el microambient embrionari pulmonar, prèviament, realitzarem una introducció a l'embriologia del pulmó humà. Les fases del desenvolupament embrionari i les principals vies moleculars en aquest procés seran comentades en aquest apartat.

Tant en rèptils, aus com mamífers, l'òrgan essencial per a la respiració és el pulmó. Per poder parlar d'un pulmó funcional i viable necessitem d'unes característiques o pilars fonamentals:

- Un arbre conductor de l'aire (bronquis i bronquíols) que comuniqui l'exterior amb la zona on es realitza l'intercanvi de gasos (bronquíols respiratoris i alvèols) i viceversa (47, 48).
- Una àmplia àrea de morfologia fina que permeti l'aparició de la barrera sang-aire, es a dir, el nexa entre el sistema respiratori i el sanguini (49).
- Un sistema vascular efectiu que irrigui de sang la zona d'intercanvi gasós i faci possible la distribució de la sang, tant oxigenada com pobre en oxigen, per l'organisme (49, 50).
- La presència de surfactant, una barreja de fosfolípids i proteïnes amb funció tensioactiva, que facilita l'estabilitat alveolar, disminueix el treball pulmonar i ajuda a les defenses innates de l'hoste (51, 52).

El desenvolupament del pulmó el podem subdividir en cinc estadis de desenvolupament i maduració: Embrional, pseudoglandular, canalicular, sacular i alveolar. Aquests estadis solen estar solapats temporalment degut a que hi ha processos embrionals que no acaben del tot quan comença el següent i a que els segments més cranials del pulmó maduren més ràpidament que els caudals (53).

2.2. Estadis del desenvolupament pulmonar

2.2.1. Estadi embrional (Setmanes 4 a 7)

Tot s'inicia amb l'aparició del solc laringotraqueal a la setmana 4, entre el quart i el sisè arcs faringis, el qual a partir d'una ràpida proliferació acabarà donant lloc a una estructura en forma de T, l'orifici laringi, inici de les vies respiratòries inferiors. Aquesta ràpida proliferació durant la setmana 6, anomenada re-epitelització, farà que desaparegui la llum del tub; i no serà fins la setmana 10 que, per vacuolització, s'anirà recuperant la llum. En paral·lel, a la regió ventral del tub digestiu primitiu anterior, comença la proliferació d'una protuberància anomenada diverticle laringotraqueal. En aquest moment la futura tràquea i futur esòfag es troben totalment comunicats. A continuació, el diverticle comença a elongar-se i créixer caudalment donant lloc a la gemma pulmonar, que al poc temps es bifurcarà en les dues gemmes bronquials primàries. A més, aprofitant aquest moment de creixement, la separació entre tràquea i esòfag s'anirà fent més petita amb l'apropament de les crestes traqueoesofàgiques que al fusionar-se donaran lloc a la paret traqueoesofàgica, fent que l'únic accés a les vies respiratòries inferiors sigui l'orifici laringi (53).

A l'originar-se a partir del tub digestiu, l'epiteli de l'arbre respiratori serà descendent de l'endoderm, el qual estarà recobert de mesoderm, que acabarà generant amb el temps el cartílag, múscul i teixit connectiu dels pulmons. És importantíssima la relació entre epiteli i mesènquima ja que serà la comunicació entre ells i els factors que produeixen el que guiarà el modelatge dels òrgans respiratoris (54). Aquests conjunts de factors, gradients i relacions moleculars es comentaran més endavant. Durant les setmanes 5 i 7, es formaran les dues pleures diafragmàtiques: La pleura visceral, derivada del mesoderm esplàncnic i que recobrirà els pulmons fins i tot entre lòbuls, i la pleura parietal, derivada del mesoderm somàtic i que recobrirà les parets toràciques internes. Entre les dos pleures es situarà la cavitat pleural (55, 56).

Per altre banda, la vascularització discorre i s'expandeix paral·lelament al desenvolupament de les vies respiratòries. Els primers vasos pulmonars es formen a partir del mesènquima que envolta la gemma pulmonar per vasculogènesis, un procés pel qual les cèl·lules del mesènquima es diferencien. Aquest plexe vascular es comunicarà amb l'aorta i l'atri del cor. A partir d'aquí, a mida que s'expandeix l'arbre bronquial també ho fa la seva vascularització a partir de la remodelació i angiogènesis del plexe vascular primitiu (57).

2.2.2. Estadi pseudoglandular (Setmanes 5 a 17)

El nom d'aquest estadi es degut a l'aspecte de glàndula tubular que presenta histològicament el seu teixit. Però no només té un aspecte de glàndula, sinó que també produeix líquid pulmonar fetal, lleugerament diferent al líquid amniòtic, que ajudarà al bon creixement i desenvolupament de les vies respiratòries (58, 59). L'elongació i creixement de les parts terminals de l'arbre respiratori dins el mesènquima que el rodeja, ve acompanyat d'una ramificació dicotòmica de les vies aèries. A finals d'aquest estadi, totes les divisions bronquials ja s'han completat i les primeres generacions de conductes alveolars comencen a aparèixer. Entre les setmanes 12 i 14, comencen a aparèixer les primeres estructures sòlides d'origen epitelial a les parets de la tràquea i bronquis envaint el mesènquima i formant les futures glàndules mucoses (60). A més, en aquest estadi, es duu a terme la separació entre la cavitat toràcica i la cavitat peritoneal (**Figura 5a**)(61).

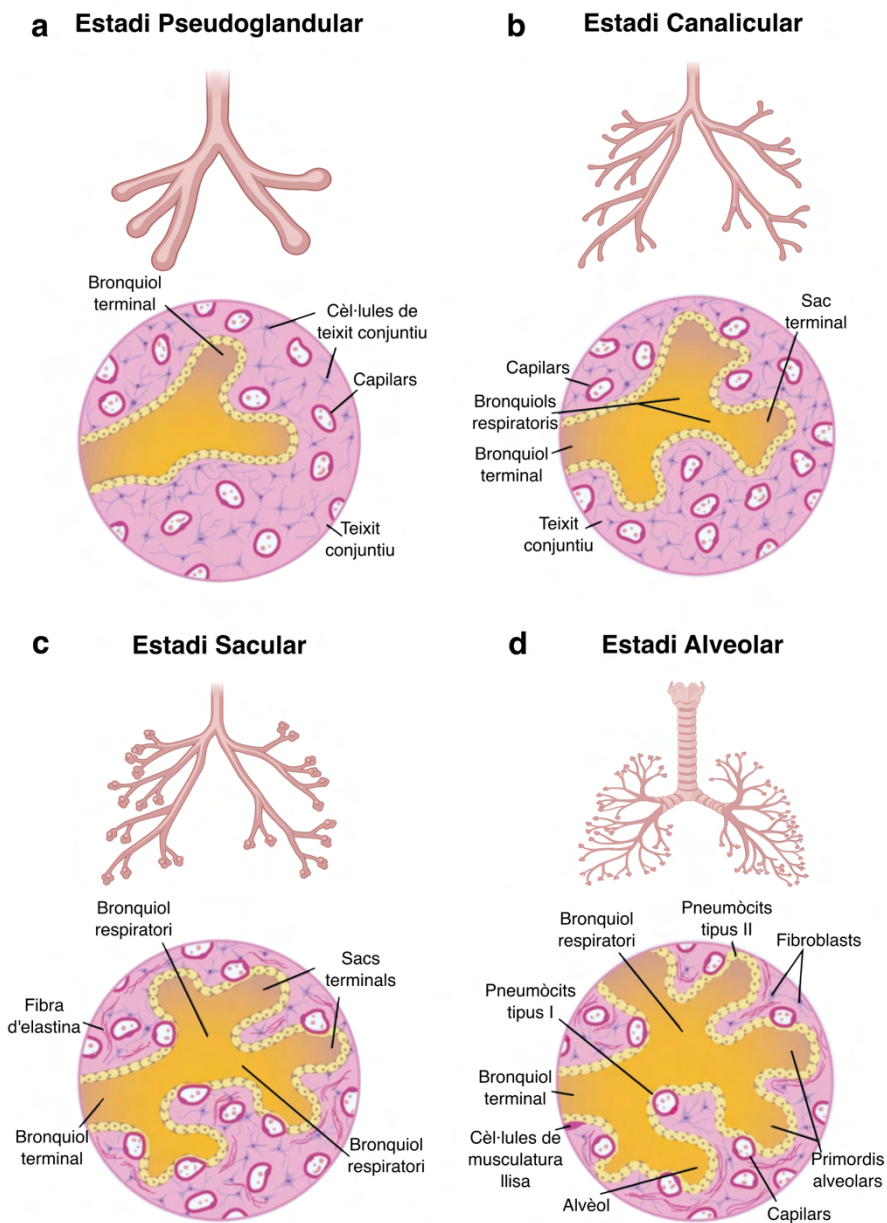


Figura 5. Estadis del desenvolupament embrionari del pulmó humà. (a) Representació esquemàtica de l'arbre respiratori i d'un tall histològic en l'estadi pseudoglandular. **(b)** Representació esquemàtica de l'arbre respiratori i d'un tall histològic en l'estadi canalicular. **(c)** Representació esquemàtica de l'arbre respiratori i d'un tall histològic en l'estadi sacular. **(d)** Representació esquemàtica de l'arbre respiratori i d'un tall histològic en l'estadi alveolar. Figura adaptada de (53).

En aquest estadi, les futures vies respiratòries estan formades per un epitelí constituït per cèl·lules progenitores epitelials columnars que al llarg del temps aniran perdent la seva alçada progressivament, tornant-se cuboïdals i, a partir d'aquí, s'aniran diferenciant en els diversos tipus cel·lulars de l'arbre respiratori (**Figura 6a**). Aquest epitelí cuboïdal no es diferenciarà fins el següent estadi; però podem començar a observar diferenciació cel·lular a les vies respiratòries més proximals (tràquea i bronquis) amb l'aparició de quatre tipus cel·lulars: Basals, secretores, caliciformes i ciliades. Les cèl·lules ciliades, encarregades de la neteja de les vies i escampament del mucus respiratori, són de les més abundants i apareixen entre les setmanes 11 i 16. Les cèl·lules secretores comencen a tenir presència a partir de la setmana 13 i són les encarregades de generar diversos tipus de substàncies, podent-les classificar en les que tenen grànuls mucosos (mucines primàries), grànuls cerosos (aigua, electròlits i proteïnes amb antimicrobians, antiinflamatoris i antioxidants) i mixtes. Per últim, les cèl·lules basals, que expressen queratina, apareixen a la setmana 12 i juguen un paper important en la renovació cel·lular i la regeneració de danys en l'epitelí respiratori (**Figura 6b**)(62).

En aquest mateix tram respiratori comença a crear-se una capa de cèl·lules positives en actina- α de musculatura llisa, (α -SMA, de l'anglès *α -smooth muscle actine*), entre les setmanes 6 i 8, que anirà tornant-se discontinua a mida que ens apropem a la zona distal. Aquestes cèl·lules són contràctils i comencen a produir contraccions espontànies que segons s'ha postulat servrien per estimular la morfogènesis de les branques respiratòries amb ajuda dels fluids secretats dins els pulmons. Les contraccions comencen a partir de la setmana 10 i es relacionen amb la producció de serotonina que estimularà la proliferació cel·lular i acabarà promovent la diferenciació cel·lular (63). El suport cartilaginós de l'arbre traqueobronquial comença la setmana 4, però va avançant al llarg del recorregut, arribant als bronquis a la setmana 10 i als bronquíols terminals a la setmana 25. Entre el cartílag i l'epitelí apareixen unes glàndules submucoses amb el rol de defensa de les vies

Introducció

respiratòries. Aquestes glàndules submucoses seran més comuns en infants que en adults (61).

Respecte a la vascularització, segueix expandint-se com en l'estadi anterior. En aquest moment trobem més ramificada les arteries i venes que l'arbre bronquial. Tot i així, la xarxa capil·lar és modesta i no es troba en contacte amb els bronquíols terminals, la part més distal en aquest estadi, fet que fa impossible encara l'intercanvi de gasos i, per tant, no és possible la respiració (64, 65).

2.2.3. Estadi canalicular (Setmanes 16 a 26)

El fet clau d'aquest estadi és la diferenciació de l'epiteli podent observar diferències entre la part conductora i la respiratòria de l'arbre respiratori. A la part més distal, els bronquíols terminals ramifiquen a bronquíols respiratoris on, al final de l'estadi, ja podrem observar conductes alveolars i algun sac alveolar (**Figura 5b**)(66, 67).

L'epiteli cuboïdal de la part distal gradualment va disminuint la quantitat de cèl·lules ciliades i caliciformes que es podien observar a les parts més proximals per donar pas a una gran quantitat de cèl·lules Club. Aquestes cèl·lules, evidents a partir de la setmana 16, inicialment contenen alts nivells de glicogen que derivarà en grànuls secretors i tenen una funció de defensa i destoxicació amb la secreció de proteïnes secretores, surfactant i proteases. Per altre banda, durant les últimes setmanes d'aquest estadi a la regió dels futurs conductes alveolars i sacs alveolars, les cèl·lules cuboïdals començaran a patir una ràpida diferenciació cap a pneumòcits tipus I i II, i, per tant, començarà la producció de surfactant (**Figura 6a i b**)(62, 68).

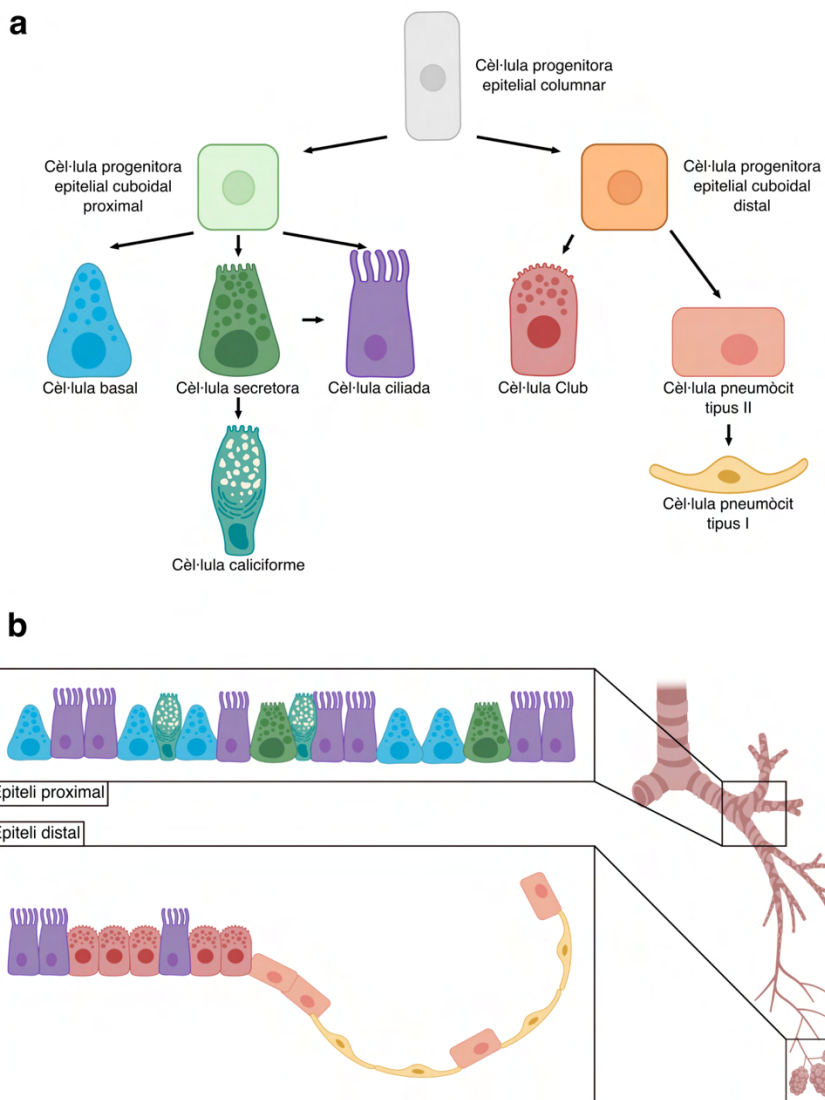


Figura 6. Diferenciació cel·lular de l'aparell respiratori i disposició de les cèl·lules segons el tram bronquial. (a) De les cèl·lules progenitores columnars s'originen les progenitores cuboïdals que, segons de quin tram formin part, les diferenciem en proximals o distals. Les progenitores proximals donaran lloc a cèl·lules basals, secretores i ciliades. Les secretores poden donar lloc a caliciformes i a més ciliades. Les progenitores distals donaran lloc a cèl·lules Club i pneumòcits tipus II, els quals seran els progenitors dels pneumòcits tipus I. **(b)** En el tram proximal, trobem en major nombre cèl·lules basals i ciliades, però també cèl·lules secretores i caliciformes. I en el tram distal, encara trobem alguna cèl·lula ciliada, però destaquem més les cèl·lules Club i en especial els pneumòcits tipus I i tipus II. Figura adaptada de (69).

Introducció

A l'etapa anterior, el mesènquima pulmonar conté una xarxa vascular modesta que ara per angiogènesis farà augmentar prominentment la densitat capil·lar. Per altre banda, l'arbre respiratori també s'internarà dins d'aquest mesènquima en busca de la vascularització generant una canalització dins d'ell. Per tant, el mesènquima quedarà reduït no només en volum sinó també amb nombre de cèl·lules degut a l'aparició de més vasos, més canalització aèria i per una mort cel·lular programada (apoptosis)(70).

2.2.4. Estadi sacular (Setmanes 24 a 38)

Es considera un estadi intermedi degut a que es deixa de ramificar l'arbre respiratori i comencen a desenvolupar-se els alvèols, i en ambdós processos la maquinaria genètica emprada és diferent i sembla que no es poden dur en paral·lel. A la part més distal, els sacs terminals comencen a expandir-se i prendre lloc al mesènquima pulmonar. Entre els sacs es generen septes per on discorrerà vascularització. En aquesta etapa també desenvolupen un paper important les cèl·lules precursoras de musculatura llisa que generaran una xarxa de fibres elàstiques i col·lagen que ajudarà a la formació dels alvèols (**Figura 5c**)(71, 72).

La majoria de la superfície dels septes esta recoberta per pneumòcits tipus I; i la resta pels de tipus II. Els pneumòcits tipus I són allargats i plans, fet que fa que cobreixin la major part de la superfície dels conductes i sacs alveolars, tot i ser més minoritaris que els tipus II. Aquests estaran estretament relacionats amb els vasos sanguinis per a crear la futura barrera sang-aire. El contacte es tant intens que la membrana endotelial del capil·lar i la epitelial del pneumòcit es fusionen. També tenen una funció reguladora de la proliferació regulant macròfags, proteases i factors de creixement (73, 74). Els pneumòcits de tipus II es troben intercalats entre els de tipus I i la seva funció és la producció de surfactant que s'acumularà dins unes estructures morfològicament visibles anomenades cossos lamel·lars, orgànuls derivats de lisosomes, que regularan la seva secreció. S'ha observat la presència de cossos lamel·lars dins dels pneumòcits tipus I; d'aquest fet deriva que s'ha pogut

demostrar que els pneumòcits tipus II són els progenitors dels de tipus I. Una altre funció dels tipus II és la producció de ions i aigua, per mantenir hidratat l'alvèol, i antioxidants i molècules de defensa (75-77). A més d'aquests dos tipus cel·lulars, també trobem petits nuclis de cèl·lules mare que crearan petits nínxols que mantindran la seva pluripotència (78).

Com ja s'ha comentat en apartats anteriors, el surfactant és una barreja de fosfolípids, lípids i proteïnes que revesteix les parets dels sacs alveolars com a protecció. És un factor tensioactiu, que disminueix la tensió superficial en la interfase aire-alvèols, facilitant l'expansió dels pulmons (79). Extracel·lularment, es troba en forma de mielina tubular i els seus components són capaços de ser reabsorbits per les cèl·lules i reempaquetats en els cossos lamel·lars. Podem diferenciar quatre tipus: Proteïna surfactant A, proteïna surfactant B, proteïna surfactant C i proteïna surfactant D (SFTPA, SFTPB, SFTPC i SFTPD, de l'anglès *surfactant protein A, B, C i D*, respectivament)(80). SFTPA i SFTPD són proteïnes hidrofíliques relacionades amb respostes de defensa, immunomodulació, manteniment i metabolisme; mentre que SFTPB i SFTPC són proteïnes hidrofòbiques amb les funcions de facilitar la mobilitat dels fosfolípids de la capa superficial de mielina tubular, promoure la disseminació dels fosfolípids i mantenir l'estabilitat de la capa al final de l'expiració. Concretament, SFTPB té un paper principal de protecció alveolar, és essencial en la formació dels cossos lamel·lars i està fortament associat a membranes. SFTPC madura a l'interior dels cossos lamel·lars i té un domini que travessa la membrana fixant-lo (81-83). El surfactant començarà a aparèixer entre les setmanes 22 i 24 de la gestació i la seva producció augmentarà cada cop més, sobretot durant les fases finals de l'embaràs. En cas de nadons que es sap que naixeran prematurs, a les mares se'ls administra corticosteroides que s'ha demostrat que estimulen la diferenciació dels pneumòcits tipus II i, en conseqüència, la producció de surfactant per accelerar el procés de maduració i preparació dels pulmons. Per altre banda, s'ha vist que TFs com el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , de l'anglès *tumor necrosis factor α*), o el factor de creixement transformant β

(TGF- β , de l'anglès *transforming growth factor β*) inhibeixen la producció de surfactant (61).

2.2.5. Estadi alveolar (Setmanes 36 a 8 anys)

Un cop s'ha nascut, els pulmons segueixen en desenvolupament. Aproximadament el 95 % dels alvèols madurs es desenvolupen post-naixement. A favor d'aquesta afirmació tenim l'evidència de que a les radiografies els pulmons de nadó es veuen més densos que els d'adult, ja que només tenen aproximadament 150 milions d'alvèols primitius que serien la meitat que en l'adult (53).

Les noves tècniques que han aparegut actualment han permès estudiar millor el procés d'alveolització i aportar nous coneixements; com per exemple, que la forma dels alvèols és irregular i no la típica arrodonida dels llibres de text (84, 85), que l'alveolització continua mentre creixi el pulmó (86, 87), que la maduració dels capil·lars es fa en paral·lel a l'alveolització (88), i que es pot dividir l'alveolització en dos fases segons l'increment del nombre d'alvèols (clàssica o continuada)(89). Durant l'alveolització clàssica (de la setmana 36 als 3 anys), els nous septes creixen i maduren, però sobretot es divideixen i multipliquen (72). En aquesta etapa la vascularització, sobretot la microvascularització, també madura i la comunicació amb els septes es torna molt més estreta, augmentant així l'eficiència de l'intercanvi de gasos (60). Al final d'aquesta etapa el desenvolupament alveolar ja està quasi finalitzat (**Figura 5d**). En l'alveolització continuada (dels 3 als 8 anys), no hi ha tant increment en el nombre d'alvèols, però sí que augmenta el grau de maduració i creixen de mida (90).

Certs estudis han comentat que l'alveolització pot allargar-se més enllà dels 8 anys; fins i tot, fins als 20 anys (86). Destacar el cas curiós de com el grau de contaminació d'una ciutat afecta al desenvolupament post-natal dels pulmons de nens i nenes, fet que ens confirma com durant uns anys després del naixement els pulmons encara estan creixent i madurant (91).

2.3. Biologia molecular del desenvolupament pulmonar

Com s'ha comentat anteriorment, el tub digestiu és l'origen del sistema respiratori, però per a que sorgeixi d'ell i es desenvolupi correctament cal un equilibri entre la proliferació i la diferenciació cel·lular, i, sobretot, cal algun sistema coordinador i regulador de tot el procés. Aquests reguladors del desenvolupament són els, ja comentats, TFs. El més important d'ells en el cas del pulmó, és el factor de transcripció tiroïdal 1 (TTF-1, de l'anglès *thyroid transcription factor 1*) el qual està produït pel gen *NK2 homeobox 1 (NKX2-1)*. Aquest gen juga un paper clau en el destí cel·lular referent al desenvolupament proximal a distal de l'arbre respiratori. L'origen del sistema respiratori comença com una zona de cèl·lules epitelials que expressen el gen *NKX2-1* a la regió ventral del tub digestiu on apareixerà la futura tràquea i pulmons (92). L'activació de TTF-1 depèn de la fosforilació d'un dels seus aminoàcids (93). Aquesta via estarà estimulada per WNT2 i WNT2b (de l'anglès *wingless-Type MMTV integration site family member 2* i *2b*, respectivament) que tindran un paper crucial en el mesoderm ventral anterior promovent l'expressió de *NKX2-1* a l'activar la β -catenina (94). Per altre banda, la proteïna morfogenètica òssia 4 (BMP4, de l'anglès *bone morphogenetic protein 4*) també ajudarà a aquesta especificació de la regió d'aparició del sistema respiratori primitiu a l'inhibir *SOX2*, un inhibidor de *NKX2-1* (**Figura 7a**)(95).

Referent a l'eix anteroposterior, els TFs encarregats de conferir-lo són el factor de creixement de fibroblasts 4 (FGF4, de l'anglès *fibroblast growth factor 4*), la proteïna morfogenètica òssia 2 (BMP2, de l'anglès *bone morphogenetic protein 2*) i l'àcid retinoic (RA). Cal remarcar que els òrgans adjacents al sistema respiratori també tenen una interacció amb ell i ajuden al seu modelatge (96-98).

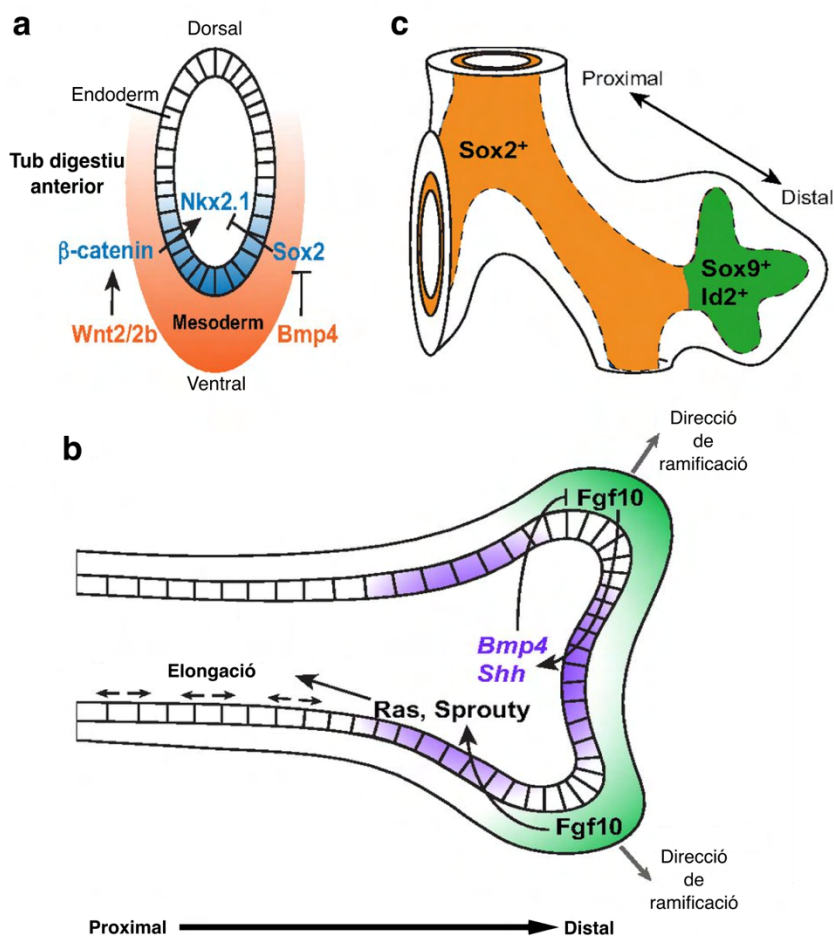


Figura 7. Principals processos moleculars en el desenvolupament de l'arbre respiratori. (a) Aparició de la gemma pulmonar: En el tub digestiu primitiu anterior, concretament a la regió ventral, sorgirà una zona amb alta expressió de NKX2-1 d'on s'originarà la gemma pulmonar. NKX2-1 estarà regulat, per una banda, per la presència de β -catenina estimulada per WNT2/2b i, per l'altre banda, per la inhibició per part de BMP4 de l'inhibidor de NKX2-1, SOX2. **(b)** Regulació de la ramificació de l'arbre respiratori: La gemma pulmonar es va elongant i amb la comunicació de l'epiteli amb el mesènquima es decideix per on i quan es bifurcarà. El mesènquima produirà FGF10 en certs punts estimulant l'aparició de BMP4 i l'expressió de SHH en parts de l'epiteli on s'inhibirà FGF10. Pels punts on FGF10 estigui actiu, és per on apareixerà una dicotomització de l'arbre respiratori. **(c)** Control de l'eix pròxim-distal: A les zones més proximals hi ha major expressió de SOX2 que per gradient, de mica en mica que ens allunyem, anirà disminuint produint un augment progressiu de l'expressió de SOX9 el qual és molt abundant a les parts més distals. Figura adaptada de (69).

Pel desenvolupament de la gemma respiratòria, hi ha una constant comunicació entre l'epiteli i el mesènquima, la qual serà l'encarregada de guiar la ramificació i transformació de les vies respiratòries. Els pilars fonamentals en aquest procés són la família dels factors de creixement de fibroblasts (FGFs, de l'anglès *fibroblast growth factors*), dels que ja hem presentat FGF4, produïts per les cèl·lules mesenquimals i rebuts per les cèl·lules epitelials. Per exemple, el factor de creixement de fibroblasts 10 (FGF10, de l'anglès *fibroblast growth factor 10*) es secretat per les cèl·lules mesenquimals i captat per les isoformes IIIb dels receptors 2 de FGFs (FGFR2IIIb, de l'anglès *FGF receptor 2 isoform IIIb*) de les cèl·lules epitelials (**Figura 7b**). En l'exemple anterior, la unió de FGF10 amb FGFR2IIIb resulta en l'activació de la via de les proteïnes quinases activades per mitogens (MAPK, de l'anglès *mitogen-activated protein kinase*) per part de les cèl·lules epitelials generant una cascada de senyals que derivaran en regular l'adhesió cel·lular, el citoesquelet i la polaritat cel·lular, tots ells relacionats amb la migració cel·lular (99). El RA, a més d'ajudar a la formació de la gemma pulmonar, també s'ha vist que regula l'expressió de FGF10 (100).

Un cop tenim generada la gemma respiratòria i ubicada en el seu lloc, aquesta creix, s'elonga i ramifica; fet que estarà regulat per diversos gens i TFs que s'encarregaran d'aspectes diferents. *SOX2* es troba infraexpressat en el moment de la generació de la gemma i, posteriorment, es troba associat a l'epiteli menys morfològicament actiu i no trobem expressió en les parts més noves, es a dir, les més distals (101). Per tant, l'expressió de *SOX2* és un marcador d'endoderm proximal mentre que *SOX9* (de l'anglès *SRY-box transcription factor 9*) és la contrapart sent marcador distal (**Figura 7c**)(102). *LEFTY1* i *LEFTY2* (de l'anglès *left-right determination factor 1* i *2*, respectivament), entre altres, regularan la asimetria de l'arbre respiratori, que com sabem serà diferent entre dreta i l'esquerre (103). *Sonic Hedgehog* (*SHH*), per altre banda, esta altament expressat a la part distal i s'associa al control de la mida de la gemma al regular l'expressió de FGF10 (104, 105). Per

Introducció

últim, BMP4 es troba a l'epiteli distal i també se li ha atribuït un paper de moderador de FGF10 per estabilitzar l'elongació (**Figura 7b**)(105, 106).

Per part de la vascularització, els factors de creixement endotelial vascular (VEGFs, de l'anglès *vascular endothelial growth factors*) són els protagonistes indiscutibles degut al seu important paper en la angiogènesis i vasculogènesis. Es troben localitzats sobretot a les puntes de les zones més distals de l'arbre bronquial, anomenades en anglès *tips*, i l'expressió dels gens que els regulen per les cèl·lules epitelials es degut a un ambient hipòxic del pulmó fetal en creixement. Aquestes proteïnes VEGFs tenen varies isoformes, i la més estudiada d'elles és el factor de creixement endotelial vascular A (VEGFA, de l'anglès *vascular endothelial growth factor A*), que s'ha vist que indueix proliferació i migració de les cèl·lules endotelials (107, 108). S'ha vist que els nivells de VEGFA baixen quan TTF-1 no està fosforilat, fet que torna a remarcar l'estreta relació entre el desenvolupament de l'epiteli i la vascularització (93).

Aquí s'han comentat alguns exemples de cascades de senyals iniciades per TFs, comunicacions entre cèl·lules i gradients de proteïnes; però s'ha de remarcar que aquests processos no són lineals sinó que tot es un complex entramat, es a dir, una xarxa. Qualsevol alteració en aquesta comunicació pot desencadenar en un mal desenvolupament del sistema respiratori i produir malformacions (72).

3. EL CÀNCER DE PULMÓ

3.1. Epidemiologia

En l'última dècada hi ha hagut notables canvis en l'epidemiologia i la prevenció del càncer de pulmó (CP) degut a canvis en la societat, un augment en l'estudi de la malaltia, un increment del coneixement de la seva genètica i els grans avenços en el seu tractament. Tot i així, el CP segueix sent un dels càncers més comuns i la principal causa de mort per càncer (109). En xifres del 2020, van ser diagnosticats 2,2 milions de nous casos en tot el món, el 11,4% de tots els càncers, situant-se només per darrere del càncer de mama; i van haver quasi 1,8 milions de morts per aquesta patologia, el 18,4% de les morts totals per càncer al món, en aquesta cas tenint la primera posició. Si separem per sexes, en homes segueix sent el càncer amb major incidència i la principal causa de mort per càncer (**Figura 8a i b**); mentre que per dones, és el tercer més diagnosticat, per darrera del càncer de mama i del càncer colorectal, i la segona causa de mort per càncer per darrera del de mama (**Figura 8c i d**)(International Agency for Research on Cancer, <http://www.globocan.iarc.fr>).

Cal remarcar que en els últims anys s'ha pogut observar un augment en la incidència en dones (110). L'alta posició en causa de mort per càncer i la tendència a tenir un mal pronòstic es degut a diversos factors, el més destacable l'estadi al moment del diagnòstic (111). El 75% dels pacients diagnosticats de CP són detectats en estadis avançats, quan les opcions de tractament són limitades; fet que explica la baixa supervivència als 5 anys d'un 19% (112, 113).

Introducció

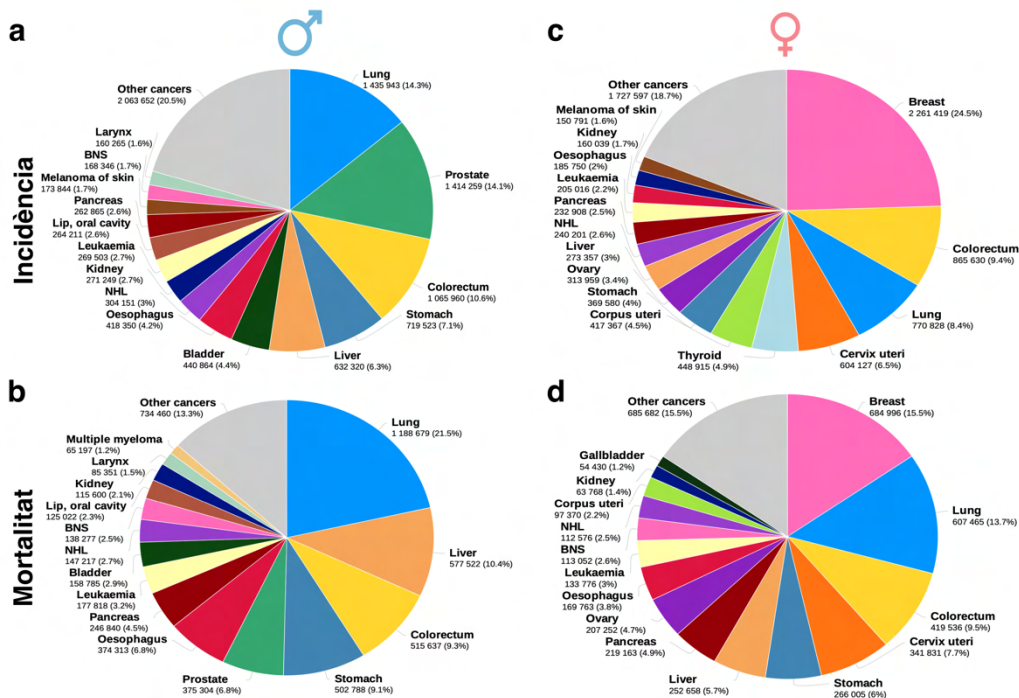


Figura 8. Dades mundials dels diferents càncers. (a, b) Incidència i mortalitat, respectivament, en homes de les neoplàsies més comuns; on el CP, escrit en anglès *lung*, es troba en ambdós casos com el número 1. (c, d) Incidència i mortalitat, respectivament, en dones de les neoplàsies més comuns; on el CP es troba en tercer lloc en incidència, per darrera de mama (*breast*) i colorectal (*colorectum*), i en segon lloc en mortalitat, també per darrera de mama. Figura adaptada de gràfics extrets de la web de Globocan.

A més, s’ha pogut observar en els últims anys un augment de la incidència i mortalitat relacionat entre altres causes amb un ràpid augment de l’esperança de vida i un envelliment de la població. Per altre banda, els factors socioeconòmics generen una variació significativa entre països i es veu reflectit en la distribució demogràfica del càncer. Per tant, trobem les majors taxes d’incidència i mortalitat del CP als països en un estadi del desenvolupament econòmic més avançat i associant-se, principalment al tabaquisme (Figura 9a i b)(114, 115).

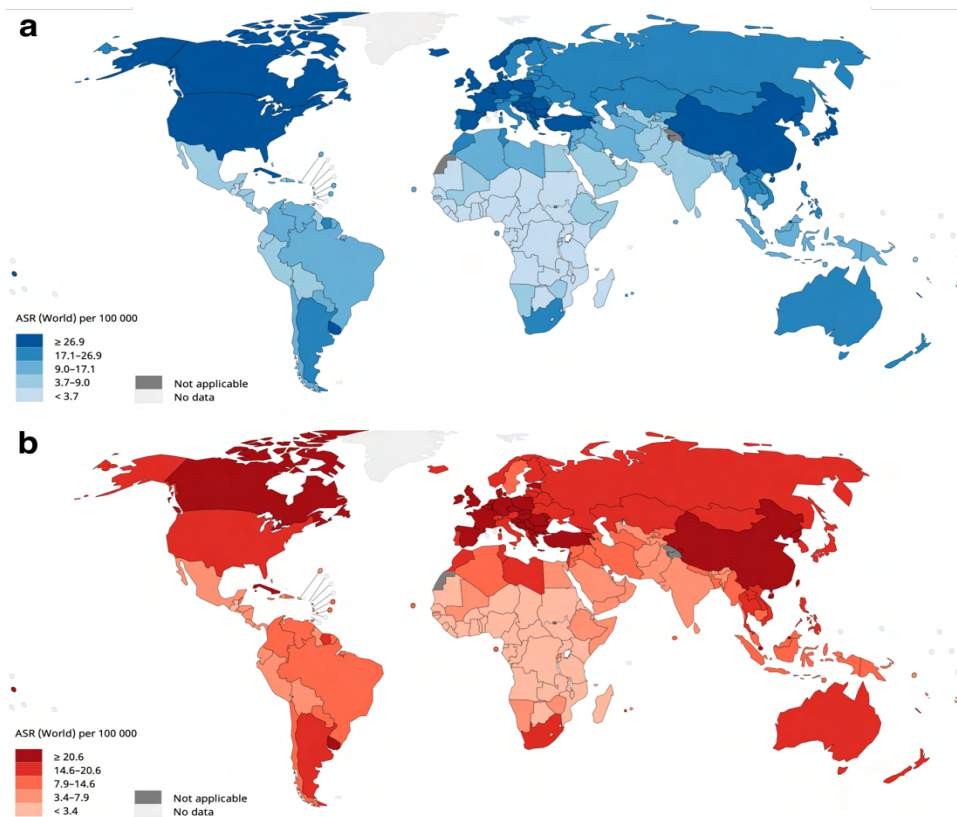


Figura 9. Distribució de la incidència i mortalitat del CP pel món. (a) Incidència del CP pels diversos països del món; on destaca que sigui més elevada en els més països desenvolupats. **(b)** Mortalitat del CP pels diversos països del món; on destaca també que sigui més elevada en els països més desenvolupats. Figura adaptada de gràfics extrets de la web de Globocan.

3.2. Etiologia

3.2.1. Tabac i altres factors implicats en el càncer de pulmó

La relació entre el CP i el tabaquisme fa molt temps que es coneix (116, 117); però no ha estat fins el segle XX que han aparegut els primers estudis que de veritat relacionen el consum de tabac amb l'aparició del CP (118). El primer cas en que es va realitzar un anàlisi quantitatiu i es va veure la tendència de que els individus que patien CP eren la gran majoria fumadors es va realitzar el 1929 (119). A partir d'aquest primer precedent van seguir una sèrie d'estudis amb grups control on es va veure de forma més clara la relació entre l'hàbit del tabaquisme i l'aparició del CP (120).

Introducció

Actualment el tabac és considerat el factor de risc més important en l'aparició del CP, ja que dels casos diagnosticats el 80-90% són fumadors (121). Una clara mostra d'aquesta afirmació és el fet de que l'augment de morts produïdes pel CP correlaciona perfectament amb l'augment de la gent fumadora (122, 123). Una dada curiosa és que, per quantificar el grau d'addicció s'utilitza el que triga una persona fumadora a fumar el seu primer cigarret del dia, i s'ha vist que tenen un risc molt més elevat de patir CP i de morir per aquesta causa les persones que ho fan en els primers 5 minuts del dia comparant-los amb els que esperen un mínim de 60 minuts (124).

El fum dels cigarrets és un aerosol complex format per compostos gasosos i en partícules. El compost determinant en l'addicció del tabac és la nicotina, mentre que el quitrà és el component en partícules més abundant. L'acumulació continuada del quitrà a les vies respiratòries sembla ser un important factor de risc de CP. A més d'aquests, s'han detectat més de 4.000 components químics en el fum del cigarret dels quals l'Agència Internacional d'Investigació del Càncer ha identificat uns 60 com a carcinògens. D'aquests carcinògens potencials destaquem els hidrocarburs policíclics aromàtics, les amines aromàtiques, les N-nitrosamines i altres compostos orgànics i inorgànics, com el benzè, el clorur de vinil, l'arsènic i el crom. Els materials radioactius, com el radó i els seus productes de desintegració, el bismut i el poloni, també són presents al fum del tabac (125-128). Cal destacar que l'acumulació dels subproductes produïts en la metabolització de certs compostos també resulta perjudicial, degut a que alguns tenen la capacitat de reaccionar amb l'ADN afavorint l'aparició de mutacions en gens relacionats amb el CP, com *TP53*, *P16*, *RAS*, *MYC* o *RB* (129, 130).

Tot i ser el tabac el factor més important en l'aparició del CP, no és l'únic. La inhalació de marihuana i altres drogues, la pol·lució de l'aire en les grans poblacions, i inclús la dieta, l'obesitat i el sedentarisme o falta d'una rutina d'exercici, poden ser factors relacionats amb l'aparició d'aquesta patologia (109).

3.2.2. Predisposició genètica i malalties prèvies

S'ha comentat que es pot atribuir al tabac i a factors exògens una gran quantitat dels casos de CP, però s'ha vist que el fet de tenir algun familiar directe amb aquesta patologia incrementa encara més la probabilitat de patir aquesta malaltia i creix com més individus de la família hagin estat afectats indiferentment del tabaquisme (131-133). Estudis de *Genome-Wide Association* han permès analitzar una gran quantitat de polimorfismes de nucleòtids únics (SNP, de l'anglès *single nucleotide polymorphism*) en cohorts grans de pacients demostrant una associació entre certs SNPs i el CP (134). A part d'aquests factors considerats més hereditaris, les mutacions puntuals en gens relacionats amb la reparació de l'ADN (135) o amb certs metabolismes (136, 137) poden també ser factors de risc i dona llum al fet de que la genètica concreta de cada pacient pot influir en la predisposició d'aquest a patir un càncer.

Un altre punt a considerar és que haver patit certes malalties pot augmentar el risc de desenvolupar un CP. L'asma es un d'aquests exemples i s'ha observat que augmenta la probabilitat de l'aparició de CP en pacients no fumadors independentment del sexe (138, 139). Les lesions en el teixit pulmonar causades a vegades per fibrosis pulmonars també s'han relacionat amb un major risc de CP (140, 141). Una altre patologia que s'ha relacionat amb l'aparició de CP seria la malaltia pulmonar obstructiva crònica, coneguda com MPOC (142). Per últim, haver patit certes infeccions es un tema que encara s'està debatent que pugui tenir relació amb el CP, com el papil·loma virus (143), alguns herpesvirus (144), clamídia (145) i SIDA (146, 147).

3.3. Histopatologia del càncer de pulmó

L'any 2015, l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va publicar la que encara és oficialment l'última revisió disponible sobre la classificació histològica dels tumors de pulmó (148). A més, clàssicament, el CP s'ha classificat en dos grups histològics que engloben el 90% dels casos de CP: El CP de cèl·lula petita (CPCP) i el CPCNP (149).

3.3.1. Càncer de pulmó de cèl·lula petita

El 10% dels CP són CPCP, es a dir, que són els més minoritaris dins dels més comuns (150). La taxa de supervivència als 5 anys es troba per sota del 10% ja que es diagnostica en estadis avançats (151). Segons l'OMS, el podem classificar dins els tumors neuroendocrins juntament amb alguns tipus de CPCNP. Sol aparèixer a la regió de les vies respiratòries principals a una localització central. Histològicament, les cèl·lules del tumor són petites en comparació a l'altre tipus de CP i presenta un citoplasma escàs amb les vores cel·lulars poc definides, nucli amb cromatina granular i nuclèol quasi no visible (152).

És un tipus de CP agressiu i amb alta taxa de progressió de la malaltia. Les guies clíniques més noves recomanen com a tractament la combinació de carboplatí/cisplatí amb un etopòsid combinat amb radioteràpia per tots els estadis IIB i III. En estadis més primerencs es pot optar per cirurgia combinada amb quimioteràpia adjuvant; i si hi ha afectació limfàtica, radioteràpia toràcica. Al ser possible la metàstasi cerebral es recomana a tots els estadis en resposta al tractament o amb malaltia estable la irradiació cranial profilàctica (153).

3.3.2. Càncer de pulmó de cèl·lula no petita

En aquest grup trobem els CP més freqüentment diagnosticats (149). Majoritàriament trobem tres subtipus histològics: L'adenocarcinoma, el carcinoma escamós i el carcinoma de cèl·lules grans. Alguns tipus de tumors neuroendocrins també els podem trobar dins dels CPCNP (148).

Carcinoma de cèl·lula gran i tumors neuroendocrins

En el grup de carcinoma de cèl·lula gran es on es troba el que certs autors anomenen el “calaix de sastre” del CPCNP. Les cèl·lules s'organitzen en capes de cèl·lules amb morfologia poligonal amb nucli vesicular, un nuclèol prominent i un citoplasma de moderat a abundant (**Figura 10a**). El diagnòstic queda restringit a mostres quirúrgiques i no a biòpsies petites, ja que altres

regions del tumor podrien presentar un tipus d'histologia representativa d'un altre CPCNP (149, 154).

Per altre banda, el grup de tumors neuroendocrins es sol situar a la perifèria del pulmó, en especial als lòbuls superiors. Histològicament tenen un creixement en forma d'organoïde o en forma de roseta. Es sol trobar zones de necrosis a prop del tumor. Les cèl·lules solen ser de gran mida amb nucli prominent i cromatina vesicular, molt citoplasma i alta taxa mitòtica (**Figura 10b**)(154, 155).

Carcinoma escamós

El carcinoma escamós és el segon CPCNP més freqüent essent el 20% dels casos de CP i el 30-40% dels casos de CPCNP. Es solen localitzar a la regió central del pulmó, a prop dels bronquis lobars principals (156, 157). Parlant de la histologia, destaca per la hiperproliferació de cèl·lules poligonals que poden presentar ponts intercel·lulars i diversos graus de queratinització. Segons la quantitat de queratina present en el teixit es pot deduir si el teixit es troba més o menys diferenciat. Les cèl·lules solen presentar un nucli hiperromàtic amb un discret nuclèol i amb un citoplasma que oscil·la entre moderat i abundant (**Figura 10c**)(158).

Adenocarcinoma

Per últim, tenim el CPCNP que tractarem en aquesta tesi, l'adenocarcinoma, que suposa el 40% de tots els CP i el 50-60% dels CPCNP (150). Sol aparèixer com una massa a la regió perifèrica del pulmó, podent afectar a la pleura (159). Histològicament es defineix com una neoplàsia maligna d'origen epitelial amb diferenciació glandular i producció de mucina (**Figura 10d**). Segons el tipus d'adenocarcinoma presentarà una histologia o una altre; i fins i tot, hi ha cops que és mixta (160-163). Els subtipus d'adenocarcinoma són: Adenocarcinoma lepidic, adenocarcinoma papil·lar o micropapil·lar, adenocarcinoma acinar i adenocarcinoma sòlid.

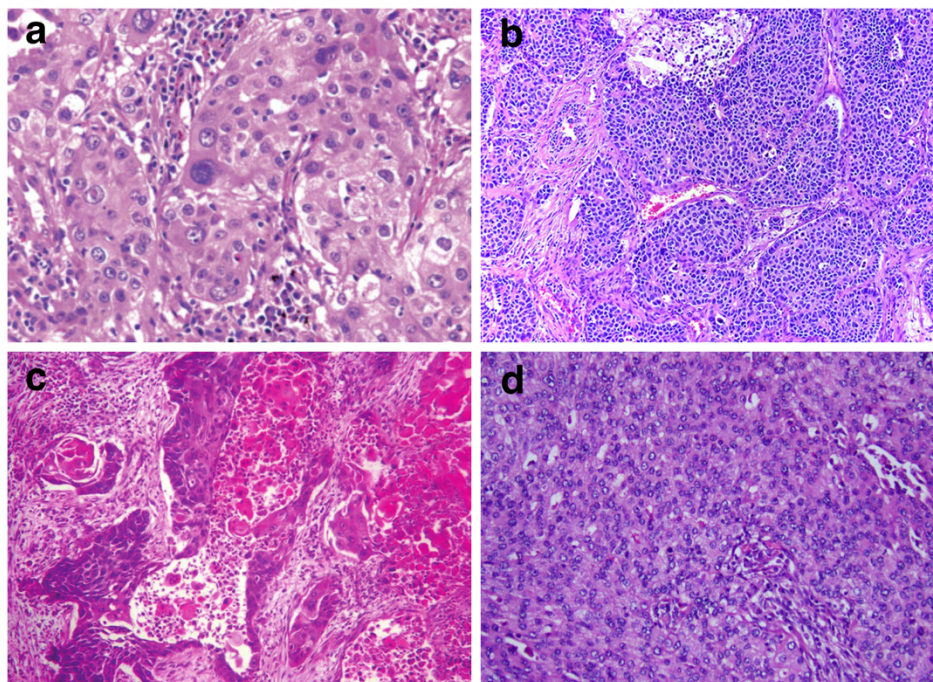


Figura 10. Els quatre tipus de CPCNP. (a) Hematoxilina/eosina d'un carcinoma de cèl·lula gran. **(b)** Hematoxilina/eosina d'un tumor neuroendocrí. **(c)** Hematoxilina/eosina d'un carcinoma escamós. **(d)** Hematoxilina/eosina d'un adenocarcinoma.

3.4. Clínica del càncer de pulmó

3.4.1. Diagnòstic

Tot i que hi ha diverses tècniques de detecció innovadores actualment, encara no s'han implementat per a ser utilitzades en la pràctica clínica massiva (164, 165). Per tant, la forma de diagnòstic més comú en l'actualitat és la detecció de simptomatologia clínica o detecció en altres proves no relacionades. Aquest fet correlaciona amb el que ja s'ha comentat a l'inici de l'apartat de CP, que el diagnòstic de la malaltia es fa en estadis avançats, moment en que apareixen els primers símptomes (166). En el cas del CPCNP, la simptomatologia és ampla i poc concreta; però els símptomes més comuns solen ser tos (40%), dispnea (30-40%), hemoptisis (15-35%) o dolor toràcic (25-40%)(167).

Un cop detectats aquests símptomes i a l'observar que es mantenen al llarg del temps, s'ha de validar el diagnòstic. El primer pas sol ser recórrer a la imatge radiològica del tòrax, per trobar la ubicació, avaluar la mida i veure si hi ha afectació d'altres estructures pròximes. En segon lloc, en cas de detectar una massa, es passa a recollir una mostra realitzant una biòpsia per ecobroncoscòpia o per endoscòpia, amb la finalitat de poder caracteritzar el teixit. El tercer pas pot ser complementar el realitzat fins ara amb un PET o TAC per identificar si existeixen altres zones afectades (168). Per últim, al ser normalment estadis avançats es pot emprar la ressonància magnètica cerebral o la gammagrafia òssia per detectar metàstasis típiques del CPCNP (169).

3.4.2. Estadiatge i pronòstic

Per saber quin tractament i seguiment ha de rebre el pacient, un cop detectat el CPCNP s'ha de veure en quin estadi es troba. En la majoria de casos s'utilitza el sistema TNM on es descriu el tumor segons tres factors: Mida del tumor, afectació de ganglis limfàtics i presència de metàstasi. La informació obtinguda d'aquests tres factors dóna com a resultat l'estadi del pacient. La octava edició de la classificació TNM és la que actualment es troba en vigor pel cas del CP (111). Si el tractament inclou una resecció quirúrgica, l'estadiatge es realitzarà a posteriori un cop l'ha analitzat anatomia patològica.

Assignar un correcte estadi del càncer és essencial al ser aquest el principal factor pronòstic. Addicionalment a l'estadi, existeixen altres factors que afecten al pronòstic; entre ells, el sexe del pacient, el subtipus histològic (170) i el grau de diferenciació. Concretament en el primer factor, la mortalitat en homes és més elevada que en dones (27,1% vs 11,2%)(110); i en el tercer factor, els tumors solen tenir pitjor pronòstic com més indiferenciats es trobin (171).

3.4.3. Tractament

Un cop es té ben caracteritzat el pacient, s'ha de decidir quin dels tres principals tipus de tractament o quina combinació d'ells es seguirà. La

Introducció

cirurgia, el primer dels tractaments, es realitzarà en els estadis I i II al considerar-se potencialment curatiu en estadis tant primerencs (172, 173). En el cas de carcinomes escamosos, l'abordatge quirúrgic recomanat és la lobectomia; en canvi, en adenocarcinomes, es sol recórrer a lobectomia o segmentectomia (174, 175). En el cas de pacients en estadi IIIa, la cirurgia es pot considerar si compleixen certs requisits (176, 177). La resta d'estadis, on es considera la malaltia incurable, la cirurgia no és recomanable.

La radioteràpia és la segona opció de tractament i s'ha vist que en estadis inicials, on no es pot dur a terme una cirurgia per la presència de comorbiditats, la seva modalitat estereotàctica és una bona opció al ser molt precisa (178). Quan l'estadi ja és més avançat i no hi ha opció quirúrgica, combinar radioteràpia i quimioteràpia s'ha demostrat que presenta bons resultats (179).

La tercera opció de tractament és la teràpia sistèmica-quimioteràpia. En estadis II o III amb afectació ganglionar N1 o N2 es recomana la utilització de quimioteràpia seguint la guia clínica de l'ESMO (180). La combinació més comú de platí amb algun agent quimioterapèutic, el més recomanat com a tractament en primera línia, és cisplatí + vinorelbina. Tot i així, també es pot combinar carboplatí amb docetaxel, gemcitabina o pemetrexed, ja que s'ha vist que tenen una eficàcia molt similar (181).

3.5. Biologia molecular del càncer de pulmó

3.5.1. Origen del càncer de pulmó

L'origen exacte del CP ha estat sempre una controvèrsia, però recentment s'han realitzat bastants descobriments en aquest camp que indiquen que el seu desenvolupament implica un seguit de passos orquestrats; des de danys a l'ADN fins a mutacions induïdes per carcinògens, continuant amb la carcinogènesi i la preneoplàsia a l'epiteli de les vies respiratòries, i acabant amb l'aparició del tumor. Tot i que, com ja s'ha comentat, el tabac continua essent el principal factor de risc per al desenvolupament del CP, només el 10%

dels fumadors el pateixen. Això fa pensar que les diferències interindividuals en la susceptibilitat a la patologia venen donades per factors genètics i epigenètics, i per tant, és important analitzar en detall la part molecular del CP (182).

A més, estudis recents relacionen cada CP amb un tipus cel·lular concret dins del teixit pulmonar adult (183). Dels primers estudis, destacar el de 1953 de Raeburn i Spencer que van observar com la histologia dels tumors més proximals era diferent a la dels tumors més distals (184). Li sumem a aquest fet el plantejament de que el CP tingues el seu origen en una desregulació de les ESC residents en el pulmó adult (185-187). Actualment, podem afirmar que en les regions més proximals, com tràquea o bronquis principals, solen destacar l'aparició de carcinomes escamosos (188); en regions intermèdies, com bronquíols, podem trobar amb freqüència CPCP i alguns tipus de tumors neuroendocrins (189, 190); i en regions més distals, com els sacs alveolars, destaquen els adenocarcinomes (191). Aquest conjunt d'evidències es veu reforçat per la descripció el 2008 d'una subpoblació de cèl·lules mare tumorals en el pulmó amb capacitat autoreplicativa i de generar tumors. Aquestes cèl·lules destacaven per expressar marcadors clàssics de pluripotència com els gens *OSKM* (192).

El procés de tumorigènesis passa de forma gradual a l'aparèixer diferents alteracions anomenades lesions preneoplàsiques (193). Un cop s'ha encès aquesta espurna prèvia, la inestabilitat genòmica de les cèl·lules tumorals afavoreix l'aparició i acumulació de mutacions, i de canvis epigenètics que donen avantatges a les cèl·lules tumorals per créixer més (194).

3.5.2. Mutacions en l'ADN implicades en el càncer de pulmó

Al llarg dels anys s'ha creat un ampli llistat de mutacions somàtiques que contribueixen en la transformació maligna del CP. Les més comuns són les mutacions dins de gens supressors de tumors, els oncogens i gens relacionats amb la reparació de l'ADN; i confereixen un avantatge biològic als tumors. Les

Introducció

mutacions a nivell cromosòmic (la pèrdua d'heterozigosi, les translocacions, les delecions i les mutacions puntuals) han estat ben descrites en el CP i, per aquest motiu, es poden utilitzar com a biomarcadors per diagnòstic i pronòstic (195-197).

Gran part de l'èxit en la detecció de totes aquestes mutacions és gràcies al desenvolupament de noves tecnologies, més ràpides i sensibles, que han permès la caracterització d'una multitud de mutacions somàtiques inherents a molts tumors. Els primers estudis que utilitzaven tecnologies de seqüenciació es van centrar en gens diana, com *p53* i *p16* (198, 199). A més, la majoria de les investigacions basades en seqüenciació s'han centrat en gens supressors de tumors i oncogens específics. Aplicant aquesta tècnica, un estudi va seqüenciar els tumors d'un total de 188 pacients de CP i va identificar 26 gens que contenien mutacions significativament per sobre de la taxa de referència en teixits adjacents no implicats en la patologia, dels quals destaquem *EGFR*, *p53* i *KRAS* (200). Actualment, les tècniques més avançades que examinen el genoma permeten detectar mutacions amb baixa freqüència i múltiples mutacions de forma simultània. Quan es va seqüenciar el genoma sencer d'un pacient amb adenocarcinoma, es van poder identificar mutacions ja conegudes, com les dels gens *KRAS*, *TP53* i *CDK4*, i moltes altres menys descrites, com les localitzades en els gens *NEK9* i *MUC16*. Addicionalment, els investigadors van poder identificar mutacions dins de regions no codificants (201). Aquest estudi, juntament amb altres, confirmen el concepte de que els tumors poden albergar diverses aberracions genòmiques, que van des del nivell cromosòmic fins a variacions d'un sol nucleòtid, les quals s'han de tenir en compte pel pronòstic i la resposta al tractament.

Oncogens

El receptor del factor de creixement epidèrmic (*EGFR*, de l'anglès *epidermal growth factor receptor*) és un dels oncogens més estudiats ja que regula processos tumorogènics importants, com la proliferació, l'apoptosi,

l'angiogènesi i la invasió; i sovint es sobreexpressa en el desenvolupament i la progressió del CPCNP (202-205). L'*EGFR* pot activar vies de senyalització, mutacions en *KRAS* i la transició d'epiteli a mesènquima (EMT, de l'anglès *epithelial-mesenchymal transition*)(206-208). L'EMT és un procés de desenvolupament cel·lular que implica, principalment, la pèrdua d'adhesió cel·lular, disminució en l'expressió d'e-caderina i un augment de la mobilitat cel·lular. Vista la importància d'*EGFR*, s'han dut a terme abundants assajos clínics utilitzant-lo com a diana molecular (209, 210), que van derivar en el descobriment de mutacions que van conduir a realitzar extensos estudis sobre el paper d'aquestes mutacions i l'amplificació d'*EGFR* en la patogènesi de la malaltia i el seu pronòstic i sensibilitat al tractament (211). Es va poder observar que aquestes mutacions es produeixen amb major freqüència en dones i no fumadors (212-214) i que s'associen amb un bon pronòstic en el CPCNP, fins i tot quan es tracten amb quimioteràpia citotòxica (215, 216). Les dades preclíniques i clíniques suggereixen que les mutacions d'*EGFR* són esdeveniments primerencs en el desenvolupament del CPCNP, ja que la potencialitat de transformar fibroblasts i cèl·lules epitelials pulmonars (217-221). Aquestes mutacions també es produeixen a l'epiteli normal a l'interior i a les zones adjacents al tumor i poden afectar a la progressió del tumor i la metàstasi (222). Destacar que és possible detectar una amplificació d'*EGFR* en l'esput dels fumadors quan la displàsia és especialment d'alt grau, fet que s'associa amb el risc de CP i amb mal pronòstic (223, 224).

El gen *Kirsten-Ras* (*KRAS*) està implicada en la cascada de senyalització d'*EGFR* i en altres vies que condueixen al creixement de cèl·lules canceroses i la progressió del tumor. L'activació de les mutacions de *KRAS* es limita al CPCNP, sobretot en adenocarcinomes (206, 225, 226). Tot i que estan relacionades amb el tabaquisme (202, 226), recentment, es va detectar un perfil mutacional de *KRAS* en pacients amb adenocarcinoma que mai havien fumats (226). Les mutacions en *KRAS* semblen ser un esdeveniment primerenc que precedeix a l'adenocarcinoma pulmonar i generalment són de mal

Introducció

pronòstic (227). També s'han detectat mutacions *BRAF* en CPCNP (228), les quals poden ser un esdeveniment precoç en la tumorogènesis pulmonar (229).

La via *PI3K*, *AKT* i *mTOR* s'activa a l'inici de la carcinogènesi pulmonar (230). La mutació o amplificació de *PIK3* és típica en un subgrup de CPCNP, especialment en carcinoma escamós (231). *AKT* s'expressa també en excés en la displàsia bronquial i s'ha vist que la seva inhibició pot induir l'apoptosi de cèl·lules pulmonars premalignes i malignes humanes. L'inhibidor de *mTOR* pot bloquejar la progressió maligna de lesions d'hiperplàsia adenomatosa atípica en ratolí. A més, *mTOR* impulsa la tumorogènesis, principalment a través dels macròfags, els quals són un component destacat del microambient tumoral; i per tant, l'efecte antitumoral al inhibir *mTOR* requereix del microambient tumoral (232).

LKB1, també anomenat *STK11*, muta amb freqüència en CPCNP i es creu que actua com un gen supressor de tumors mitjançant interaccions amb *p53* i *CDC42*, modulant l'activitat de l'AMPK i altres mecanismes (233). Es troben mutacions de *LKB1* en el 34% dels adenocarcinomes i el 19% dels carcinomes escamosos de 144 pacients de CPCNP (234). Les mutacions en *LKB1* s'associen amb el tabaquisme i amb les mutacions en *KRAS*, i són pràcticament exclusives de les mutacions en *EGFR* (235). Els nivells baixos de proteïna *LKB1* s'associen amb graus elevats de displàsia en lesions atípiques d'hiperplàsia adenomatosa, cosa que suggereix que *LKB1* té un paper primerenc en el desenvolupament de lesions premalignes al pulmó (236). En un estudi *in vivo*, els resultats en ratolins transgènics mutants per *KRAS* en els quals es va inactivar *LKB1*, van suggerir que el gen té un paper en la diferenciació i el comportament invasiu d'aquests tumors. Per contra, es va observar que només la presència de la mutació de *LKB1* no s'associa amb el desenvolupament de CP en ratolins (234).

Com ja s'ha comentat en l'apartat de desenvolupament pulmonar, *NKX2-1*, o TTF-1, és essencial per a la formació de les cèl·lules que revesteixen els alvèols pulmonars, els pneumòcits tipus II; tot i així, fora del desenvolupament

embrionari està implicat en el CP (**Figura 11**). L'amplificació de *NKX2-1* a la regió 14q13.3 va ser l'esdeveniment focal més comú en un anàlisi d'alta resolució del nombre de còpies gèniques en adenocarcinoma de pulmó humà. Aquest estudi va utilitzar una matriu amb la capacitat de genotipar molts SNPs. Com a resultat, els investigadors també van identificar l'amplificació en regions que contenien *KRAS*, *MYC*, *VEGF* i diversos gens del cicle cel·lular (237). *In vitro*, es va veure que la transfecció de cèl·lules epitelials pulmonars humanes normals immortalitzades amb almenys dos dels tres gens *NKX2-1*, *NKX2-8* i *PAX-9* a la regió 14q13.3 provocava un augment del creixement de les cèl·lules; fet que podria suggerir que aquests tres gens poden funcionar de manera cooperativa en la patogènesi del CP (238). Dades recents indiquen que el carcinoma de cèl·lules escamoses també presenta una amplificació de *NKX2-1*, però no la proteïna TTF-1; a diferència del que passa en adenocarcinoma (239).

Un altre gen característic del desenvolupament pulmonar, però que es relaciona amb el CP és *VEGF*. S'ha pogut observar que els nivells de *VEGF* a les cèl·lules epitelials bronquials dels fumadors augmenten en associació amb la progressió de la displàsia bronquial (240). La hiperplàsia bronquial, la metaplàsia i el carcinoma *in situ* s'associen amb un augment de la densitat de microvasos, i es pot produir un patró distintiu conegut com a displàsia escamosa angiogènica (241). A més, els factors associats a l'augment de l'angiogènesi del tumor es correlacionen amb el desenvolupament i pronòstic del CP (242-244). També s'ha vist que els nivells circulants de *VEGF* poden predir el benefici clínic dels inhibidors de *VEGF* en pacients amb aquesta malaltia. Molts factors angiogènics es regulen almenys en part a través de les vies regulades per la hipòxia, com ara *HIF-1α* i *2α* (245, 246). A més de la hipòxia, el *VEGF* i altres factors angiogènics també estan regulats per *EGFR* mitjançant *HIF* i per oncogens com *KRAS* i *p53* (247). Les interaccions entre les vies de *VEGF* i d'*EGFR* van conduir a la hipòtesi que el seu bloqueig dual podria ser més eficaç que qualsevol enfocament en solitari (248). El *VEGF* s'ha validat recentment com a diana terapèutica basant-se en els resultats d'un

Introducció

assaig de fase 3, que va portar a aprovar anticossos monoclonals per *VEGF*, com el bevacizumab en combinació amb quimioteràpia estàndard, per pacients amb CPCNP no tractats prèviament (249).

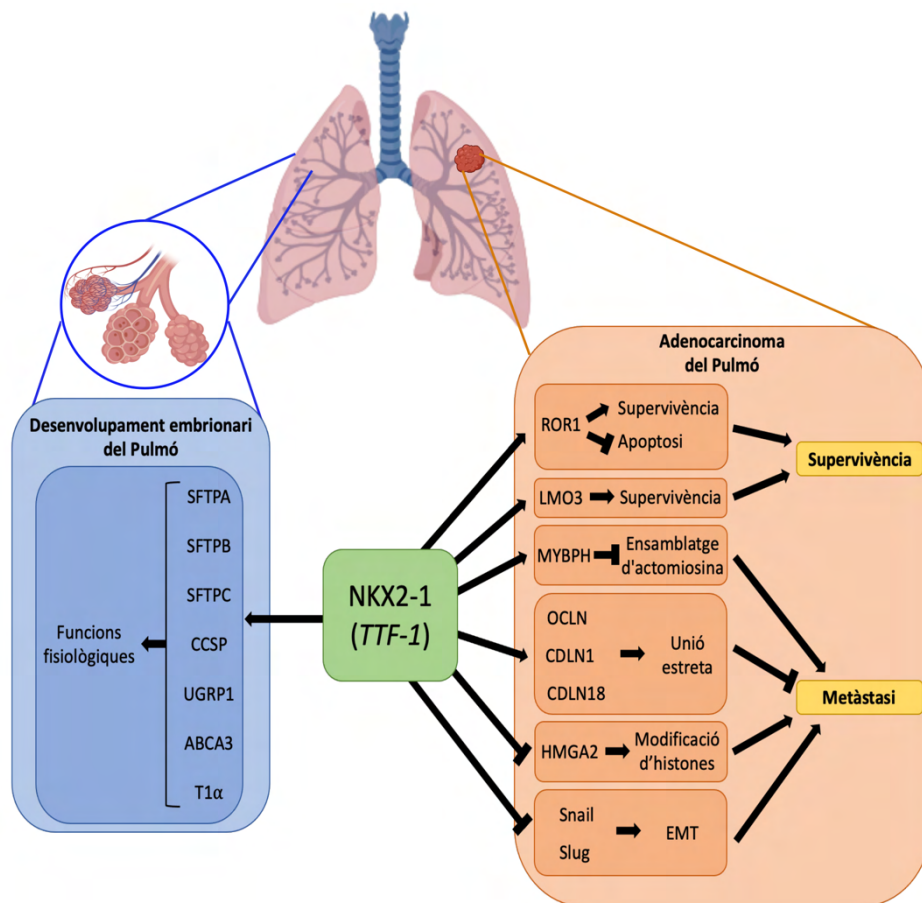


Figura 11. Les dues cares de *NKX2-1*. El gen *NKX2-1* és essencial en el correcte desenvolupament del pulmó embrionari humà, ja que participa en l'activació de vies relacionades en diverses funcions fisiològiques bàsiques. Per contra, en teixit adult, també té un paper important en el CP, on activarà o inhibirà molècules que acabaran facilitant la supervivència de les cèl·lules tumorals i fomentant la metàstasi. Figura adaptada de (250).

microARNs

Durant les dues últimes dècades, els investigadors han determinat que la part no codificant del genoma humà pot tenir capacitat funcional, i ara es sap que aquestes regions d'ARN no codificant tenen una funció reguladora de gens.

D'aquest grup d'ARNs no codificants, els microARNs (miARNs) són els que s'han estudiat en més profunditat (251, 252). Actualment, hi ha més 1.200 miARNs humans estudiats, i basant-se en l'anàlisi *in silico*, s'ha estimat que els miARNs poden regular fins a dos terços del genoma humà (253).

Estudis dels miARNs en el CP han demostrat que hi ha diferències globals en l'expressió de miARNs entre el tumor de pulmó i els teixits pulmonars adjacents no implicats (254). Aquestes observacions inicials han donat lloc a investigacions centrades en la validació funcional *in vitro* i *in vivo* de relacions entre l'expressió de miARNs i paràmetres clínics, com el pronòstic i la resposta terapèutica; i s'ha vist que estan implicats en l'inici i la progressió del càncer.

A partir d'aquí, el nombre d'estudis que han examinat els miARNs com a biomarcadors pronòstics en CP han augmentant amb el temps. Els estudis més primerencs en adenocarcinomes d'estadi I, van demostrar que l'augment de miR-155 i la disminució de Let-7a2 es correlacionaven amb una mala supervivència (254). Landi i els seus col·laboradors van identificar 5 miARNs que es correlacionaven amb la supervivència (255); i Saito i col·laboradors van determinar que el miR-21 correlacionava amb resultats pobres entre pacients de CP en estadis primerencs de tres cohorts independents (256). Un altre estudi va suggerir que els patrons de miARNs en plasma es poden utilitzar per a l'estratificació del risc en programes de cribratge de CP (257). També s'ha vist que uns quants miARNs tenen la capacitat de distingir subtipus histològics. Per últim, diversos estudis han determinat que miR-205, que es troba sobreexpressat en carcinoma escamós en comparació amb adenocarcinoma, es pot utilitzar per distingir les histologies (258-260).

3.5.3. Vies del desenvolupament i diferenciació pulmonar alterades en el càncer de pulmó.

Com s'ha comentat en varies ocasions al primer apartat de la introducció, els paradigmes actuals suggereixen que els carcinomes de pulmó sorgeixen de cèl·lules mare i progenitores pluripotents capaces de diferenciar-se en un o diversos tipus histològics. Per tant, es creu que l'ontologia de les cèl·lules

Introducció

tumorals de pulmó està determinada per les conseqüències de l'activació transcripcional de gens i/o esdeveniments de repressió que recapitulen la cèl·lula cap al desenvolupament pulmonar embrionari (261-263). Sabem, i s'ha comentat anteriorment, que la hipòtesi de que el càncer de pulmó sorgeix de l'expressió aberrant dels gens implicats en el desenvolupament pulmonar és recolzada per estudis d'expressió gènica que demostren similituds entre signatures obtingudes de tumors pulmonars humans i signatures característiques del desenvolupament pulmonar normal (264, 265). Els gens associats al desenvolupament pulmonar precoç s'expressen sovint al CPCP i en altres tumors agressius amb mal pronòstic (266). En conjunt, aquestes observacions suggereixen que hi ha una relació entre la mala diferenciació i els paràmetres moleculars del desenvolupament primerenc del pulmó.

Per altre banda, com ja s'havia comentat, la identificació de cèl·lules progenitores putatives i cèl·lules mare del CP és una àrea activa d'investigació. L'objectiu és orientar aquestes cèl·lules per prevenir el desenvolupament del càncer i tractar-lo. Les cèl·lules mare i progenitores putatives inclouen cèl·lules basals que expressen *p63* i les citoqueratines 5 i 14 (267), cèl·lules epitelials que expressen la glicoproteïna CD133 (268), cèl·lules canceroses aïllades amb una alta activitat d'aldehid deshidrogenasa 1 (269), i cèl·lules mare bronquioloalveolars (270).

3.5.4. Alteracions del nombre de còpies d'ADN i reordenacions gèniques en el càncer de pulmó

S'han investigat àmpliament les anomalies cromosòmiques que inclouen amplificacions, supressions i reordenaments en el CP. Un assaig d'ús habitual és la hibridació fluorescent *in situ* (FISH, de l'anglès *fluorescence in situ hybridization*), que es basa en segments d'ADN marcats amb fluorescència per detectar regions amb aberracions cromosòmiques. Els primers estudis van demostrar que per FISH es podien identificar aneuploidies cromosòmiques en mostres de CP (271, 272). Addicionalment, els resultats de diversos estudis suggereixen que el FISH podria complementar la precisió diagnòstica de la

citologia (273, 274) i algunes sondes ja s'estan emprant com a assaig de diagnòstic per a la detecció del CP (274-276). Per exemple, en una cohort de pacients amb CP i un grup control amb malaltia no neoplàsica, es va realitzar un FISH per a *MYC*, *EGFR* i els cromosomes 5 i 6, de raspallats bronquials; i van mostrar una sensibilitat més gran en comparació amb la citologia convencional (277).

Una aplicació emergent de la tecnologia FISH ha estat determinar l'estat mutacional d'*EGFR*. Això s'està convertint cada cop més en un estàndard en l'avaluació dels adenocarcinomes, tenint en compte les taxes de resposta significatives als inhibidors d'*EGFR/TKI* entre els pacients que alberguen aquestes mutacions (212, 213). Tot i així, el paper del número de còpies d'*EGFR* en la determinació de la teràpia o la resposta encara no està clar; però, alguns estudis suggereixen que el nombre de còpies d'*EGFR* es correlaciona amb l'estat mutacional i, en menor mesura, amb la capacitat de resposta al fàrmac (278).

Un altre alteració d'aquest tipus és la proteïna *EML4/ALK* que representa una fusió entre *ALK* i *EML4* que estan presents en aproximadament un 4% dels CPCNP (279, 280). Aquesta reordenació s'associa amb la resposta a l'inhibidor d'*ALK*, crizotinib; i una comparació de diferents metodologies per a la detecció desregulada d'*ALK*, va concloure que el FISH podria detectar amb precisió els reordenaments d'*ALK* (281).

SOX2 és un gen del factor de transcripció implicat en el desenvolupament de l'intestí anterior i la pluripotència, que s'ha demostrat que s'amplifica en els carcinomes escamosos, entre ells el de pulmó (282, 283). De fet, *SOX2* té una especificitat del 95% en la distinció entre escamós i adenocarcinoma (284). Diversos estudis han demostrat que *SOX2* té propietats oncogèniques i que utilitzar-lo de diana pot suprimir tant les metàstasis com el creixement del tumor. Curiosament, valors elevats de *SOX2* poden correlacionar-se amb un pronòstic favorable en escamós (285), però en un pronòstic desfavorable en adenocarcinoma en estadi I (286).

3.5.5. Influència de l'epigenètica en el càncer de pulmó

Metilació

Durant els darrers anys, els investigadors han determinat que els canvis epigenètics dins del genoma humà a nivell de la remodelació de la cromatina, les modificacions d'histones i la metilació de l'ADN podien alterar els patrons d'expressió de gens supressors de tumors i oncogens per influir en la transformació maligna. La hipermetilació i la hipometilació aberrants de les illes CpG representen la troballa més comuna, que oscil·la entre el 15% i el 80% dels CP (287). S'han identificat diversos gens que solen estar metilats habitualment en aquesta patologia, inclosos *CDKN2A*, *FHIT*, *APC*, *p16* i *RASSF1A* (288-291).

Els gens metilats es poden detectar mitjançant diverses tècniques. La majoria dels primers estudis utilitzaven tecnologies com la PCR específica de metilació que s'adreça a regions i candidats genòmics específics. Aquesta tècnica ha demostrat tenir èxit en la identificació de patrons de metilació que distingeixen el tumor dels teixits normals, i també en la identificació de subgrups clínics (292). El perfil d'alt rendiment permet l'anàlisi epigenètic global de gens candidats dins de les illes CpG promotores, regions no traduïdes i regions no codificants del genoma, incloent ARNm, ARNs llargs no codificants i regions ultraconservades (293).

Actualment, s'estan provant canvis epigenètics, tant globals com específics de gens, com a biomarcadors no invasius per a la detecció precoç i el pronòstic del CP (294, 295). Analitzar el metiloma pot utilitzar-se per subclassificar encara més, de manera molecular i clínica, diferents subtipus de CP i, per tant, orientar potencialment les decisions terapèutiques. Brock i col·laborador van examinar el valor pronòstic dels patrons de metilació de set gens (*p16*, *MGMT*, *DAPK*, *RASSF1A*, *CDH13*, *ASC* i *APC*) en l'estadi I del CPCNP. Els autors van demostrar que parells de combinacions de gens de *p16*, *CDH13*, *APC* i *RASSF1A* servien com a factor de risc de recurrència (296). Addicionalment, l'anàlisi de la metilació de gens específics s'està aplicant ara com biomarcador

en proves no invasives; com en el cas de l'estudi de patrons de metilació en esput d'un panell de gens predeterminats que es va veure que tenia valor predictiu pel desenvolupament eventual de CP entre els fumadors d'alt risc (297). Un altre estudi va concloure que els patrons de metilació dins de l'esput es correlacionaven molt millor amb el tumor primari que la metilació dins del sèrum (298).

Microambient tumoral

En els darrers anys, s'ha vist una nova apreciació del paper de l'estroma, parènquima o mesènquima tumoral en l'inici i la progressió del càncer (299). La senyalització entre el mesènquima i l'epiteli, mitjançant el contacte directe i els mediadors secretats, és essencial per a l'inici, creixement, diferenciació, i progressió del tumor, i la metastasi (300). L'estroma tumoral és un sistema complex format per fibroblasts i macròfags associats al tumor, altres cèl·lules immunitàries, vascularització i matriu extracel·lular (301). Les cèl·lules canceroses modulen el microambient tumoral mitjançant la secreció d'una varietat de factors de creixement, inclòs el TGF- β 1, el factor de creixement derivat de les plaquetes, el VEGF i el FGF (302). Alternativament, la resposta mesenquimal pot facilitar la progressió del tumor mitjançant l'alliberament de factors de creixement que retroalimenten a les cèl·lules tumorals, participant en el creixement de nous vasos i promovent el creixement i la invasió del tumor (299). A més, el parènquima pot tenir efectes potents que promouen el tumor. Per exemple, el cultiu de fibroblasts associats al càncer amb cèl·lules epitelials prostàtiques millora el creixement i la invasió del tumor (303). Per últim, a més del seu paper en l'inici del tumor en el pulmó i la seva progressió, el mesènquima, en cooperació amb les cèl·lules tumorals, pot establir un nínxol dins del pulmó que afavoreixi l'establiment i el creixement de focus metastàtics d'altres tumors primaris (304, 305).

HIPÒTESI I OBJECTIUS

1. ANTECEDENTS

Els coneixements actuals ens permeten avalar els següents antecedents:

1. Les cèl·lules en l'embrió proliferen a gran velocitat i massivament; tot i així, s'organitzen correctament en teixits que modelaran òrgans funcionals que formaran un organisme biològicament estable. En canvi, en el tumor proliferen ràpidament de forma descontrolada, sense coordinació amb la resta de l'organisme adult, persistint al llarg del temps, i produint una patologia.

2. En el desenvolupament embrionari es crea un microambient cel·lular, matern i embrionari, on les cèl·lules mesenquimals envien instruccions que poden activar o reprimir parts del nostre codi genètic amb l'objectiu d'orientar el creixement i regular la diferenciació cel·lular. En contrapartida, en el desenvolupament tumoral es crea un microambient anormal per part d'una cèl·lula, d'inici sana, que per mitjà de senyals promou la expansió i transformació d'altres cèl·lules normals en tumorals que donaran lloc a la malaltia.

3. L'ADN és el mateix en totes les cèl·lules de l'organisme i és la seva gran plasticitat la que genera tanta variabilitat cel·lular; però segons quin microambient dirigeix aquestes cèl·lules es pot produir un creixement controlat i una diferenciació normal, o un creixement descontrolat i una indiferenciació cel·lular. El seu destí depèn totalment de les senyals rebudes per la cèl·lula.

2. HIPÒTESI

Amb aquestes premisses, formulem la següent hipòtesi:

Hipòtesi: Les senyals provinents del mesènquima pulmonar embrionari, capaces de controlar la correcta diferenciació del pulmó en el desenvolupament, també podrien controlar el fenotip maligne de les cèl·lules de càncer de pulmó.

3. OBJECTIUS

Basant-nos en la hipòtesis anteriorment plantejada, establim els següents objectius generals i específics:

3.1. Objectiu general

Analitzar si un medi de cultiu procedent de cèl·lules mesenquimals embrionàries pulmonars afecta la morfologia, les capacitats funcionals i l'expressió molecular de les cèl·lules tumorals d'adenocarcinoma de pulmó, A549 i H1299.

3.2. Objectius específics

1. Aïllar cèl·lules mesenquimals de pulmó embrionari humà i amb elles crear un medi de cultiu condicionat embrionari pulmonar.
2. Analitzar el contingut del medi condicionat embrionari pulmonar procedent de les cèl·lules mesenquimals pulmonars.
3. Comprovar si hi ha canvis morfològics a les cèl·lules de càncer de pulmó al ser cultivades amb el medi condicionat embrionari pulmonar.
4. Analitzar si el medi condicionat embrionari pulmonar altera les capacitats funcionals (proliferació, migració, generació de colònies en 2D i 3D, i generació de tumors *in vivo*) de les cèl·lules de càncer de pulmó.
5. Observar si les cèl·lules de càncer de pulmó canvien genotípicament (canvis moleculars) al ser cultivades amb el medi condicionat embrionari pulmonar.
6. Analitzar si les cèl·lules de càncer de pulmó es diferencien al ser cultivades amb el medi condicionat embrionari pulmonar.

MATERIAL I MÈTODES

1. L'OBTENCIÓ DE MEDIS CONDICIONATS

1.1. Aïllament i caracterització de les cèl·lules mesenquimals de pulmó embrionari humà

Les mostres d'embrions humans es van obtenir gràcies a les donacions sota consentiment informat al Servei de Donació de Cossos del Departament d'Anatomia i Embriologia Humana de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona per a estudis morfològics i moleculars. L'estudi es va dur a terme d'acord amb les directrius de la Declaració de Hèlsinki i va ser aprovat pel Comitè d'Ètica de la Investigació Clínica de l'Hospital Clínic de Barcelona (número d'aprovació del projecte HCB/2017/1052). Aquesta tesis doctoral es va centrar en embrions en l'estadi pseudoglandular del desenvolupament humà, concretament de les setmanes 9, 10 i 11 (E9, E10 i E11 respectivament).

A l'arribar la mostra fresca, es van localitzar els pulmons amb ajuda de material de microcirurgia estèril i es van netejar amb solució salina (DPBS 1x, de l'anglès *Dulbecco's phosphate buffered saline*)(Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). A continuació, es van tractar els pulmons amb dispasa II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) durant 30 minuts a temperatura ambient i en rotació. Degut a aquest tractament previ, es va facilitar la separació mecànica amb agulles de tungstè del mesènquima pulmonar de l'arbre bronquial epitelial (**Figura 12**). La part més distal de l'arbre respiratori, anomenada en anglès com a *tip*, es va utilitzar per experiments relacionats amb la generació d'organoïdes embrionaris de pulmó; i la part mesenquimal es va sembrar en flascons amb *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)(Invitrogen) suplementat amb 10% de sèrum boví fetal (FBS, de l'anglès *fetal bovine serum*)(Invitrogen) i 1% de penicil·lina/estreptomicina (PS, de l'anglès *penicillin/streptomycin*)(Sigma-Aldrich) i es va deixar creixent sota les condicions de creixement recomanades de 37°C en 5% de CO₂ i 95% d'humitat

Material i mètodes

relativa a l'incubador. Quan les cèl·lules estaven en un estat de confluència, es va realitzar un canvi de flasc.

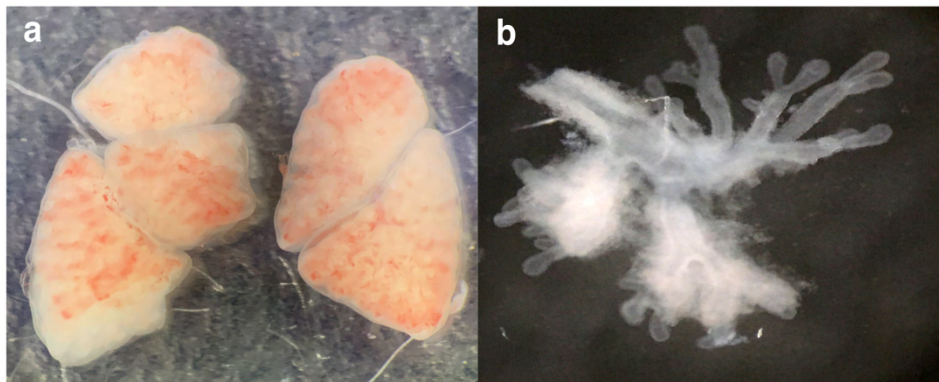


Figura 12 Procediment d'obtenció de mesènquima pulmonar embrionari humà. En primer lloc, es va localitzar l'embrió i es va dissecar buidant el tòrax i l'abdomen, per obtenir els pulmons situats entre el cor i l'aparell digestiu. **(a)** A continuació, un cop aïllats els pulmons, es van tractar amb dispasa durant 30 minuts. **(b)** Finalment, amb l'ajut d'agulles de tungstè, es va separar el mesènquima de l'arbre respiratori epitelià.

Per confirmar les característiques mesenquimals de les cèl·lules aïllades, primer, es van observar pel microscopi invertit IX53 i es van prendre fotografies amb la càmera *cellSense Entry 1.7 software* (Olympus, Center Valley, PA, EEUU) per veure si la seva morfologia coincidia amb la morfologia típica de les cèl·lules mesenquimals. En segon lloc, es va realitzar una immunofluorescència, breument explicat, fixant les cèl·lules amb paraformaldehid al 4% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EEUU) en DPBS 1x en un cobreixobjectes i es van marcar amb l'anticòs monoclonal de ratolí contra la vimentina (*V9 ready-to-use*) i l'anticòs monoclonal de ratolí contra la e-caderina humana (*NCH-38 ready-to-use*)(Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca) per observar si expressaven marcadors característics de cèl·lules mesenquimals.

1.2. Condicionament del medi per part de les cèl·lules hEML i les cèl·lules tumorals

Les cèl·lules mesenquimals de pulmó embrionari humà (hEML, de l'anglès *human embryonic mesenchymal lung cells*) caracteritzades es van fer créixer en medi DMEM al 10% de FBS i 1% de PS sota les condicions de creixement recomanades durant 10 dies. Aquest medi en contacte amb les hEML es va anomenar medi condicionat de cèl·lules mesenquimals de pulmó embrionari humà (hEML-CM, de l'anglès *human embryonic mesenchymal lung - conditioned medium*)(**Figura 13a**). Com s'ha comentat prèviament, els pulmons provenen d'embrions de E9, E10 i E11, i per tant, es van obtenir tres tipus de hEML-CM diferents: hEML-CM de E9, hEML-CM de E10 i hEML-CM de E11, respectivament. Un cop es va confirmar als resultats que els tres medis afecten de la mateixa manera als experiments, es va utilitzar sempre com a hEML-CM el hEML-CM de E11.

Per a crear un medi condicionat control i saber que els efectes produïts pel medi condicionat no són deguts al desgast del medi per part de les cèl·lules que s'alimenten d'ell sinó pel que aporten aquestes cèl·lules al medi, es van utilitzar les cèl·lules d'adenocarcinoma pulmonar humà A549 i H1299 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EEUU) per a generar un altre medi condicionat. Les cèl·lules A549 es van cultivar en medi DMEM al 10% de FBS i 1% de PS, i les H1299 en medi *Roswell Park Memorial Institute 1640 medium* (RPMI 1640)(Invitrogen) al 10% de FBS i al 1% de PS, ambdues línies sota les condicions de creixement recomanades durant 10 dies com en el cas del hEML-CM. El resultat va ser l'obtenció de l'anomenat medi condicionat tumoral (T-CM, de l'anglès *tumoral - conditioned medium*)(**Figura 13b**).

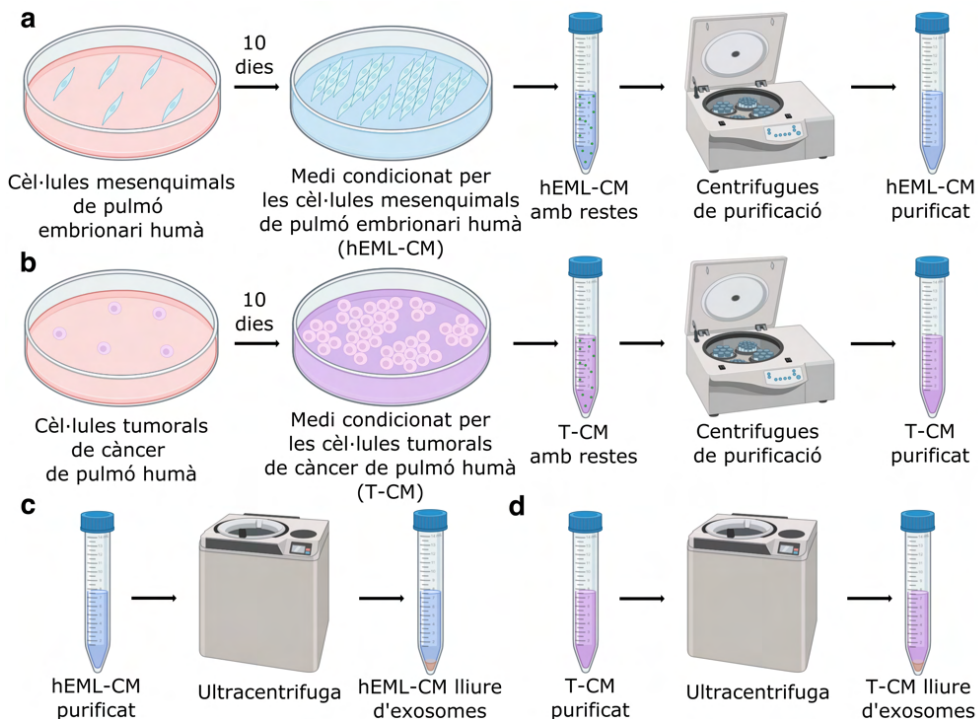


Figura 13. Creació i purificació dels diversos medis condicionats. (a) A partir del cultiu de les cèl·lules mesenquimals de pulmó embrionari humà durant 10 dies es va generar el medi condicionat per aquestes cèl·lules, anomenat hEML-CM. A continuació, per mitjà d'una sèrie de centrifugacions es van retirar les restes cel·lulars del medi i es va deixar purificat i preparat per ser utilitzat. (b) El mateix procediment es va realitzar amb les cèl·lules tumorals de càncer de pulmó humà. El medi resultant també es purifica i d'aquesta manera es va obtenir el medi control anomenat T-CM. (c) El hEML-CM purificat va ser ultracentrifugat i els seus exosomes van ser precipitats. Es va aïllar el sobrenedant i es va obtenir el hEML-CM lliure d'exosomes. (d) Realitzant el mateix procediment d'ultracentrifugació al T-CM, es va obtenir el T-CM lliure d'exosomes.

1.3. Purificació dels medis condicionats i creació dels medis condicionats lliures d'exosomes

Durant els 10 dies que les respectives cèl·lules estan condicionant els medis també es van acumular en ells productes de rebuig o cèl·lules que moren; per fer precipitar i eliminar aquestes partícules del medi es van realitzar tres centrifugacions a 4°C dels medis hEML-CM i T-CM: Primera, 300G durant 5 minuts; segona, 2.500G durant 20 minuts; i tercera, 10.000G durant 30 minuts. Un cop finalitzades les centrifugues, els respectius medis nets es van

identificar i emmagatzemar en un congelador a -20°C fins el moment d'utilitzar-se (**Figura 13a i b**).

Existeix la possibilitat de que els resultats del condicionament siguin deguts als exosomes alliberats per les cèl·lules que condicionen el medi. Per resoldre aquest dubte, es van generar uns medis hEML-CM i T-CM lliures d'exosomes. L'eliminació dels exosomes del medi es va realitzar, després d'haver realitzat les tres centrifugacions de neteja bàsica, per mitjà d'una ultracentrifugació de 100.000G durant dos hores que fa precipitar els exosomes (**Figura 13c i d**)(306).

2. LA CARACTERITZACIÓ DEL hEML-CM

2.1. Anàlisi dels nivells de TGF- β 1 en T-CM i hEML-CM

Es va utilitzar el kit *Human TGF- β 1 Quantikine ELISA Kit* (R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU) per detectar si els nivells de TGF- β 1 en T-CM i hEML-CM eren diferents. Es van analitzar tres alíquotes de T-CM i tres alíquotes de hEML-CM. El procediment es va realitzar seguint el protocol recomanat pel fabricant adjunt al kit. Es van preparar tots els reactius, es van crear les dilucions per la recta estàndard i es van activar les mostres a analitzar. A cada pou es van afegir 50 μ L del diluent RD1-21 i 50 μ L de la mostra pertinent. Es va mantenir a temperatura ambient durant 2 hores. Es va retirar el líquid de cada pou i es van realitzar tres rentats per pou amb DPBS 1x. A continuació, es van afegir 100 μ L del conjugat TGF- β 1 per pou i es va incubar a temperatura ambient durant 2 hores més. Es van tornar a realitzar tres rentats i es van afegir a cada pou 100 μ L de la solució substrat. Es va incubar protegit de la llum durant 30 minuts i es van afegir 100 μ L de la solució stop a cada pou. Finalment, després de 30 minuts d'incubació, es va mesurar la densitat òptica a 450nm per mitjà de l'espectrofotòmetre *VersaMax Tunable Microplate Reader* (Molecular Devices, San Jose, CA, EEUU). De cadascuna de les mostres es van realitzar tres rèpliques. Amb la recta estàndard obtinguda i els valors de cada mostra es van realitzar els càlculs per saber la concentració de TGF- β 1 de cada un dels medis.

3. L'ESTUDI DEL CANVI MORFOLÒGIC

3.1. Condicionament de les cèl·lules A549 amb els diferents medis condicionats

En placa de 12 pous es van sembrar 5×10^4 cèl·lules per pou de la línia cel·lular A549 (sembra estàndard). Aquesta quantitat de cèl·lules és l'òptima per a que triguin uns dies en estar en confluència i es produeixi un bon condicionament. Per veure els diversos resultats al condicionar, les cèl·lules A549 es van condicionar amb 1mL per pou dels respectius medis: T-CM, hEML-CM E9, hEML-CM E10, hEML-CM E11, T-CM lliure d'exosomes i hEML-CM lliure d'exosomes. Per mitjà del microscopi invertit es van realitzar fotografies amb la càmera cada 24 hores per controlar l'evolució de la morfologia cel·lular en cada condició. Per assegurar els resultats observats, es va realitzar cada prova per triplicat.

3.2. Condicionament de les cèl·lules A549 amb dilucions de hEML-CM

Es van generar uns bancs de dilucions del medi hEML-CM al 10%, 25%, 50% i 100% amb medi DMEM al 10% de FBS i 1% de PS. Aquest experiment es va fer servir per veure en quina concentració de medi hEML-CM comença a aparèixer el condicionament i per confirmar de nou que el canvi morfològic no es degut a l'esgotament dels nutrients del medi. Es va realitzar una sembra estàndard i les fotografies es van dur a terme amb el microscopi invertit a les 24 i 48 hores de l'inici del condicionament. Cadascuna de les condicions es va realitzar per triplicat.

3.3. Duració del condicionament de les cèl·lules A549 al retirar el medi hEML-CM

La comprovació de si el condicionament és permanent o transitori es va realitzar de dues maneres diferents. En primer lloc, a les 48h del condicionament de les cèl·lules A549 sembrades de forma estàndard, es van arrancar les cèl·lules de la placa amb trypsin-EDTA (0.25%) phenol red

Material i mètodes

(Invitrogen) i es van tornar a sembrar de manera estàndard en medi DMEM al 10% de FBS i 1% de PS.

I en segon lloc, a les 24 hores d'haver condicionat unes cèl·lules A549 sembrades de manera estàndard, se'ls va canviar el medi hEML-CM per medi DMEM al 10% de FBS i 1% de PS. En ambdós casos les imatges es van fotografiar amb la càmera del microscopi invertit i tot es va replicar per triplicat.

3.4. Condicionament de les cèl·lules H1299 amb els diferents medis condicionats

Per comprovar que el canvi morfològic produït pel hEML-CM també afecta a altres línies d'adenocarcinoma pulmonar humà, es va utilitzar la línia cel·lular H1299. Es van sembrar de manera estàndard cèl·lules H1299 i es van fer créixer en T-CM i hEML-CM. Es van dur a terme fotografies amb la càmera del microscopi invertit cada 24 hores i ambdós condicionaments es van realitzar per triplicat. Degut a la positivitat dels resultats obtinguts, la resta d'experiments realitzats, a no ser que es comenti el contrari, es van realitzar amb les dues línies cel·lulars tumorals.

3.5. Condicionament de les cèl·lules de càncer colorectal, LoVo, amb hEML-CM

En condicions de sembra estàndard es van fer créixer cèl·lules d'una línia cel·lular de càncer colorectal, LoVo (American Type Culture Collection), en hEML-CM. Es va realitzar aquesta prova experimental per observar si hi ha organotropisme, es a dir, si el medi condicionat de cèl·lules pulmonars d'embrió humà afecta només a línies cel·lulars pulmonars o també a línies cel·lulars d'altres òrgans. Com sempre, les imatges es van obtenir amb la càmera del microscopi invertit i es van fer per triplicat.

3.6. Observació en detall del canvi morfològic per microscòpia electrònica

Per poder observar en major detall els canvis morfològics que genera el condicionament amb hEML-CM es van utilitzar el microscopi electrònic de rastreig (SEM, de l'anglès *scanning electron microscope*) i de transmissió (TEM, de l'anglès *transmission electron microscope*). Es van sembrar de forma estàndard les línies cel·lulars i es van fer créixer en T-CM i hEML-CM. Al fons de cada pou es van situar uns petits cobreixobjectes abans d'afegir les cèl·lules per a que aquestes s'adherissin a ells. A les 24 hores de condicionament, en ambdós casos, les cèl·lules van ser fixades amb paraformaldehid al 4% i portades a la Unitat de Microscòpia Electrònica dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona pel seu processament, i posteriorment, van ser observades i estudiades.

3.7. Neutralització dels nivells de TGF- β 1 en el hEML-CM

Aquest experiment va servir per confirmar si el TGF- β 1 esta relacionat amb el condicionament. Sabent la quantitat de TGF- β 1 que tenim en el T-CM i el hEML-CM, gràcies a l'anàlisi ELISA realitzat amb anterioritat, es va neutralitzar el TGF- β 1 afegint 3,75 μ g/mL de l'anticòs monoclonal TGF beta-1,2,3 (1D11)(Invitrogen) als respectius medis. D'aquesta manera es van obtenir quatre medis: T-CM, T-CM amb el TGF- β 1 neutralitzat, hEML-CM i hEML-CM amb el TGF- β 1 neutralitzat. Es va sembrar de manera estàndard les cèl·lules d'adenocarcinoma pulmonar i es van fer créixer en 1mL per pou del respectiu medi. La morfologia de les cèl·lules en cadascuna de les condicions va ser fotografiada amb la càmera del microscopi invertit en intervals de 24 hores. Es van realitzar tres rèpliques de cadascuna de les condicions per confirmar el que s'observava.

4. L'ANÀLISI FUNCIONAL DE LES CÈL·LULES CONDICIONADES

4.1. Proliferació cel·lular

Per saber si les cèl·lules tumorals condicionades amb hEML-CM tenen una capacitat proliferativa diferent a les control, condicionades amb T-CM; es van sembrar de manera estàndard cèl·lules de les línies cel·lulars A549 i H1299, i es van fer créixer en ambdós medis condicionats sota les condicions de creixement recomanades. El seu creixement es va quantificar tripsinitzant alguns pous de cada condició a les 24, 48, 72 i 96 hores, tenyint les cèl·lules amb *Trypan Blue stain 0,4%* (Invitrogen) i comptant-les per mitjà de l'aparell *Countess Automated Cell Counter* (Invitrogen). Cada quantificació es va realitzar per triplicat.

4.2. Migració cel·lular (Scratch wound healing assay)

Per mitjà dels inserts *2 well in μ -Dish 35 mm* (Ibidi, Gräfelfing, Alemanya) es va realitzar un assaig de migració cel·lular, anomenat en anglès, *scratch wound healing assay*. Es va seguir el protocol facilitat pel fabricant. Per cada una de les dos línies cel·lulars es van generar dos solucions, una en T-CM i una en hEML-CM, de concentració 3×10^5 cèl·lules/mL. Es va situar un insert per pou, es van afegir 70 μ L a cada compartiment de l'insert i es van incubar 24 hores en les condicions recomanades de creixement. En aquell moment es va retirar l'insert suaument i es va afegir 1mL del medi corresponent a cada pou. Les diferències entre les cèl·lules creixent en T-CM i hEML-CM es van controlar per fotografies realitzades amb la càmera del microscopi invertit. Amb aquest mateix software es van realitzar les mesures, en tres punts diferents de cada marca que ha deixat l'insert, per a poder realitzar els càlculs del tancament. Com sempre, cada condició es va realitzar per triplicat.

4.3. Capacitat de generar colònies 2D (*Colony formation assay*)

En el *colony formation assay* (2D), una tècnica amb la que s'avalua la capacitat de les cèl·lules per a generar colònies a partir d'una sola, es van sembrar 100 cèl·lules per pou, per a que quedin ben repartides, en placa de 6 pous. Les dues línies cel·lulars d'adenocarcinoma van ser emprades en aquest experiment on en cada pou es van afegir 3mL del respectiu medi, T-CM o hEML-CM. Ambdues línies cel·lulars tenen una capacitat de creixement diferent; degut a aquest motiu, A549 es va deixar créixer durant 12 dies, mentre que H1299 ho va fer durant 15 dies, ambdues en les condicions recomanables de creixement. Al final de l'experiment, les colònies es van tenyir amb 1mL de 0.5% de cristall violeta (Sigma-Aldrich) per pou, i després de rentar-se amb abundant aigua, es va realitzar el comptatge manual de les colònies i les fotografies sota la lupa científica. No només es va realitzar cada condició per triplicat, sinó que el comptatge manual de les colònies també es fa tres cops.

4.4. Capacitat de generar colònies 3D (*Soft-agar assay*)

El *soft-agar assay* és molt similar al *colony formation assay*; però la diferència principal és que aquesta tècnica mira la capacitat de les cèl·lules per generar colònies en 3D. Es va utilitzar el *Cell Transformation Assay Kit (Colorimetric)*(ab235698, Abcam, Cambridge, MA, EEUU) i es van seguir les instruccions del fabricant. Breument explicat, en primer lloc, es van realitzar els càlculs de quant ens caldrà de cadascun dels reactius comptant: Les dilucions per generar la recta estàndard, els controls, les mostres i els pous que s'utilitzaran per fer les fotografies de les colònies. Un cop preparats els reactius, en una placa de 96 pous es van afegir 75µL de la base de soft-agar, es va esperar a que es solidifiqui i, a continuació, es van afegir 75µL de la segona capa de soft-agar amb 2×10^4 cèl·lules per pou. Un cop ha quallat la segona capa, es van afegir 100µL del medi en qüestió. Tant la primera com la segona capa de soft-agar de cada pou van ser creades a partir del respectiu

Material i mètodes

medi que s'afegirà en aquell pou. Es va deixar créixer durant 8 dies en les condicions de creixement recomanables. Al final, es va retirar el medi i es van afegir 50µL de *WST Working Solution*. El nombre de cèl·lules es va quantificar per espectrofotometria a 450nm. Les imatges de les colònies 3D de cada condició es van obtenir sota el microscopi invertit després d'haver estat tenyides amb la 10µL de la *Staining Solution*. Es va realitzar per triplicat per cada línia cel·lular i medi condicionat. El protocol complet es pot trobar a la web del kit:

[https://www.abcam.com/ps/products/235/ab235698/documents/Cell-Transformation-Assay-protocol-book-v1b-ab235698%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/235/ab235698/documents/Cell-Transformation-Assay-protocol-book-v1b-ab235698%20(website).pdf).

4.5. Capacitat tumoral *in vivo*

Els animals es van allotjar en condicions estèrils, amb aire de flux laminar, a una temperatura constant d'uns 25°C, una humitat relativa d'aproximadament del 50%, sota un cicle de llum/foscors de 12:12 hores i amb accés a aliment i aigua. Tots els procediments que involucren animals van estar aprovats pel Comitè d'Ètica d'Animals d'Experimentació de la Universitat de Barcelona i la Generalitat de Catalunya (#10995) en compliment amb les regulacions espanyola (RD 53/2013 & RD 1386/2018) i europea (2010/63/EU) per la cura i utilització d'animals d'experimentació.

Per començar es va generar una prova per establir quina quantitat de cèl·lules A549 és l'òptima per a injectar a cada ratolí i generar un tumor. Primer, es van escollir a tres ratolins de 5 setmanes B6 Rag2^{-/-} (C57BL/6N-Rag2^{Tm1/CipheRj}) i se'ls van realitzar dues injeccions subcutànies per flanc per animal. Al primer se li van injectar 0,5x10⁶ cèl·lules, al segon 1x10⁶ cèl·lules i al tercer 5x10⁶ cèl·lules i sempre en fase exponencial, no confluents i en 100µL de DPBS 1x. Als 26 dies de ser inoculats, es van anestesiar i es van perfondre intracardiàcament amb paraformaldehid al 4%. En aquest punt, els tumors generats es van disseccionar i analitzar. I segon, un cop es va escollir la concentració òptima de 1x10⁶ cèl·lules, a dos ratolins de 5 setmanes B6

Rag2^{-/-} se'ls van realitzar dues injeccions subcutànies per flanc de 1×10^6 cèl·lules en fase exponencial i no confluents en 100µL. En un dels animals es van inocular cèl·lules A549 condicionades amb T-CM en PBS, i a l'altre cèl·lules A549 condicionades amb hEML-CM en hEML-CM. 26 dies després de la inoculació, es van anestesiari i es van perfondre intracardiàcament amb paraformaldehid al 4%. Per últim, els pulmons i els tumors van ser disseccionats i analitzats.

A partir d'aquestes proves prèvies, es va crear un *xenograft tumor model* per avaluar diferències en la formació i el creixement tumoral entre les cèl·lules A549 en T-CM i en hEML-CM. A continuació, es van comprar 6 ratolins mascles atímics *nude* (Rj:ATHYM-Foxn1nu/nu) de 5 setmanes. Tres d'aquests ratolins van ser inoculats amb dos injeccions subcutànies per flanc de 1×10^6 cèl·lules A549 condicionades amb T-CM en fase exponencial i no confluents en 100µL de PBS. Als altres tres ratolins es va realitzar el mateix procediment però amb cèl·lules A549 condicionades amb hEML-CM en fase exponencial i no confluents en 100µL de hEML-CM. D'aquesta manera vam obtenir tres replicats biològics amb dos replicats tècnics per replica. El volum dels tumors es va anar mesurant amb un peu de rei cada 4 dies i el seu volum va ser calculat utilitzant la següent equació: Volum del tumor (mm³) = 0,5 × llargada × amplada². Als 35 dies de la inoculació, es van anestesiari i es van perfondre intracardiàcament amb paraformaldehid al 4% els animals. Els tumors van ser disseccionats, mesurats i pesats al final de l'estudi. Dels tumors obtinguts també es va realitzar una hematoxilina/eosina. La hematoxilina/eosina es va realitzar al laboratori tècnic de la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana.

5. L'ANÀLISI MOLECULAR I L'ESTUDI DE LA DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES CONDICIONADES

5.1. Extracció d'ARN i anàlisi de l'expressió gènica

Es van fer créixer de manera estàndard i en les condicions de creixement recomanades les cèl·lules A549 i H1299 tant en T-CM com en hEML-CM. A partir d'elles, es va realitzar una extracció d'àcid ribonucleic (ARN) utilitzant el *TRIzol Reagent* (Life Technologies, Grand Island, NY, EEUU) i seguint les instruccions del fabricant. Un cop es van aïllar i quantificar els ARNs, es va obtenir ADN complementari de cadascun d'ells a partir de 500ng d'ARN total i amb ajut del kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). L'expressió relativa dels gens en cada mostra va ser determinada per qRT-PCR (de l'anglès, *quantitative real-time polymerase chain reaction*) utilitzant la màquina *StepOne Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Les sondes *Taqman Gene Expression Assays* (Life Technologies) que van ser utilitzades van ser: *OCT-3/4* (Hs04260367_gH), *SOX2* (Hs01053049_s1), *KLF4* (Hs00358836_m1), *c-MYC* (Hs00153408_m1), *NKX2-1* (Hs00968940_m1), *SFTPA* (Hs01652580_g1), *SFTPB* (Hs00167036_m1), *SFTPC* (Hs00951326_g1), *SFTPD* (Hs01108490_m1), *DNMT3A* (Hs01027166_m1), *DNMT3B* (Hs00171876_m1), *MYH1* (Hs00428500_m1), *MYH2* (Hs00430042_m1), *MYH4* (Hs00757977_m1), *MYH7* (Hs00165276_m1) i *MYH16* (Hs01385213_m1). El control endogen que es va utilitzar per igualar les diverses rèpliques va ser el *CDKN1β* (Hs01597588_m1). La quantificació relativa va ser calculada utilitzant el $2^{-\Delta\Delta Ct}$, i tot es va realitzar per triplicat.

5.2. Tinció de surfactant amb *Oil Red O Solution*

A dia 0, es van condicionar amb T-CM i hEML-CM cèl·lules A549 i H1299 de manera estàndard i es van fer créixer en les condicions de creixement recomanades. A les 48 hores d'haver estat sembrades, es van fixar amb

L'anàlisi molecular i estudi de la diferenciació de les cèl·lules condicionades paraformaldehid al 4% i van ser tenyides amb 1mL per pou d'*Oil Red O Solution* (Sigma-Aldrich), per avaluar la presència o absència de surfactants (SFTPs) pulmonars en les cèl·lules. Les imatges de les cèl·lules tenyides van ser preses i analitzades amb la càmera i software del microscopi invertit.

5.3. Microarray i anàlisi transcriptòmic

En primer lloc, es va realitzar un estudi previ de la qualitat i integritat dels ARNs extrets per saber si mostraven les condicions òptimes per a realitzar un microarray amb ells. Les mostres seleccionades van ser tres replicats de A549 en hEML-CM i tres replicats de H1299 en hEML-CM. Per això, es va dur una mostra de cadascun a la Unitat de Genòmica Funcional de l'IDIBAPS. Un cop es va confirmar que els ARNs extrets tenien tots un bon perfil, es va procedir a realitzar, a la mateixa Unitat de Genòmica Funcional, el microarray.

El microarray seleccionat va ser el *Affymetrix Clariom S Human array*. Un cop realitzat, es van obtenir el arxius que van ser utilitzats pels posteriors anàlisis. Per complementar aquests arxius es van emprar dades públiques extretes de les bases de dades online: *Gene Expression Omnibus* (GEO)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) i *ArrayExpress* (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>). Les mostres descarregades d'aquestes bases de dades van ser: Cèl·lules d'una línia cel·lular derivada de cèl·lules epitelials normals immortalitzades de bronqui pulmonar humà, les HBEC6-KT (GSE150541); cèl·lules primàries endotelials d'arteria pulmonar humana (HPAEC, de l'anglès *human pulmonary artery endothelial cells*)(GSE125508); mioblasts humans (GSE121023); fibroblasts pulmonars humans (HLF, de l'anglès *human lung fibroblasts*)(E-MTAB-8488); cèl·lules control de la línia cel·lular A549 (GSE181088); i cèl·lules control de la línia cel·lular H1299 (GSE99993).

Els anàlisi bioinformàtics es van realitzar amb la versió 4.1.1 del programa R i la versió 4.1.0 de Bioconductor. Es va utilitzar el paquet *oligo* per processar i normalitzar les dades pel mètode de *rma*, i tot seguit, la funció

removeBatchEffect del paquet *limma* va ser utilitzada per igualar les mostres. El diagrama Venn es va crear amb el paquet *VennDiagram*. L'anàlisi d'expressió diferencial es va realitzar amb el paquet *limma* tenint en compte tots els gens amb un p-valor inferior a 0,001. L'anàlisi d'agrupament jeràrquic (distància euclidia) dels 100 primers gens diferencialment expressats (DEG, de l'anglès *differentially expressed genes*) es va generar amb el paquet *heatmap*. L'anàlisi d'enriquiment per termes *Gene Ontology* (GO) es va realitzar el paquet *topGO* de Bioconductor. El *multidimensional scaling plot* va ser creat a partir de la funció *plotMDS* de *limma*. Per últim, les matrius de distàncies van ser construïdes amb la funció *dist* del paquet *stats* i van ser representades gràficament amb el paquet *heatmap*.

5.4. Immunofluorescències de marcadors associats a mesènquima i miofibroblasts

Les cèl·lules d'ambdues línies cel·lulars es van sembrar de manera estàndard i en les condicions de creixement recomanades en els dos medis condicionats. Es van situar, prèviament, cobreixobjectes al fons del pou per a que, al afegir les cèl·lules, es situessin a la part superior del vidre i s'adherissin allà. A les 48 hores en els respectius medis, es va realitzar una immunofluorescència de les cèl·lules crescudes en els cobreixobjectes. Es van fixar les cèl·lules amb paraformaldehid al 4% i es van permeabilitzar amb PBTx (Tritó X-100 al 0,5% (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EEUU) en DPBS 1x) a temperatura ambient durant 5 minuts. A continuació, les cèl·lules es van bloquejar amb albúmina de sèrum boví (BSA, de l'anglès *bovine serum albumin*)(Sigma-Aldrich) al 1% i sèrum de burra (NDS, de l'anglès *normal donkey serum*)(Sigma-Aldrich) al 5% en PBTx durant 30 minuts a temperatura ambient i en foscor, i, després, es van incubar amb l'anticòs primari respectiu diluït en solució de bloqueig a 4°C a la foscor i durant tota la nit. Al dia següent, es van realitzar rentats de l'anticòs primari, i es va afegir l'anticòs secundari diluït en solució de bloqueig durant una hora a temperatura ambient a la foscor. Per últim les cèl·lules es van muntar en un portaobjectes utilitzant *Fluoroshield* amb DAPI (Sigma-Aldrich). Els

L'anàlisi molecular i estudi de la diferenciació de les cèl·lules condicionades

anticossos primaris utilitzats van ser: Anticòs de conill contra la vimentina (1:500; Proteintech, Manchester, GBR), anticòs de ratolí contra α -SMA (1:1.000; Abcam) i anticòs de ratolí contra la miosina 4 (1:500; Invitrogen). Els anticossos secundaris utilitzats van ser: Alexa Fluor 488 i Alexa Fluor 594 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). L'anàlisi de les immunofluorescències va ser realitzat per mitjà del microscopi de fluorescència Olympus BX51 (Olympus) i les imatges de les cèl·lules van ser adquirides amb els softwares DPController i DPManager (Olympus).

6. L'ESTADÍSTICA

Segons el tipus d'anàlisi que es realitzava, es van haver d'emprar uns testos estadístics o uns altres. Tot i així, tots els anàlisis estadístics es van realitzar utilitzant el programa GraphPad Prism 8.

Quan es van realitzar comparatives entre els dos medis condicionats, T-CM i hEML-CM, en l'anàlisi dels nivells de TGF- β 1 en el medi, l'anàlisi de les capacitats funcionals de les cèl·lules (proliferació, migració, *colony formation assay* (2D) i *soft-agar assay* (3D)) i l'anàlisi molecular dels nivells d'expressió de les cèl·lules (*OSKM*, *NKX2-1*, *SFTPs*, *DNMTs* i *MYH4*) es va utilitzar t-tests aparellats.

Per altre banda, en el cas de l'estudi *in vivo*, es va utilitza un test ANOVA per mesures repetides. En el cas concret de les mesures del creixement tumoral al llarg del temps, es va fer mitja de les mesures d'ambdós flancs de cada animal per obtenir un únic valor per rèplica.

RESULTATS

1. RESULTATS DE L'OBJECTIU 1: LA CARACTERITZACIÓ DE LES CÈL·LULES hEML

1.1. Les cèl·lules aïllades del pulmó embrionari són cèl·lules mesenquimals

Un cop es va separar el mesènquima de l'epiteli en els pulmons embrionaris humans, es va haver de confirmar que de veritat el que s'estava cultivant i ens produiria el hEML-CM eren cèl·lules mesenquimals pulmonars. L'observació per microscopi de les cèl·lules en cultiu ens va mostrar la morfologia típica de cèl·lules mesenquimals, amb una forma allargada i un creixement en xarxa (**Figura 14a**).

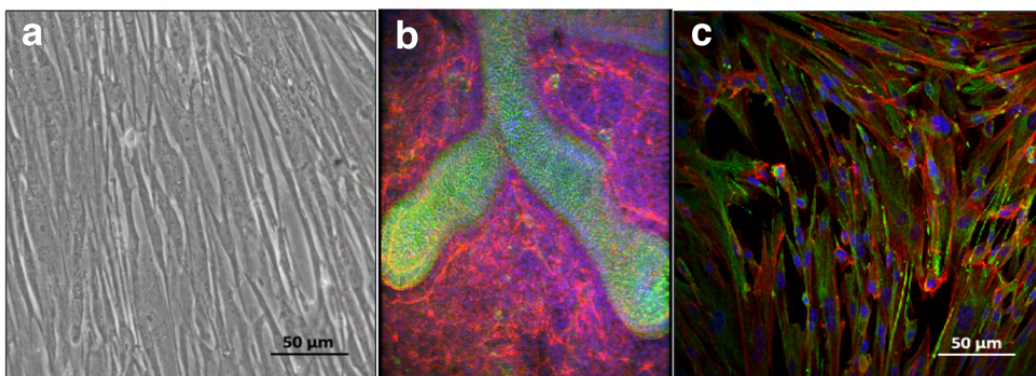


Figura 14. Caracterització de les cèl·lules mesenquimals de pulmó embrionari humà. (a) Imatge de microscopi invertit de les cèl·lules aïllades del mesènquima pulmonar embrionari. (b) Immunofluorescència de tall de pulmó embrionari humà. Nuclis marcats en blau, e-caderina marcada en verd i vimentina marcada en vermell. (c) Immunofluorescència de les cèl·lules aïllades del mesènquima pulmonar embrionari. Nuclis marcats en blau, e-caderina marcada en verd i vimentina marcada en vermell.

Tot i així, es va voler caracteritzar més a fons i es va realitzar una immunofluorescència per veure quina expressió de marcadors moleculars presentaven les cèl·lules aïllades. En un tall de pulmó embrionari es va poder observar com a l'epiteli hi havia un gran marcatge verd degut a la e-caderina, mentre que al mesènquima predominava el color vermell de la vimentina (VIM). Aquest fet ens va confirmar que l'epiteli està embolcallat per

Resultats

mesènquima en el pulmó (**Figura 14b**). Quan es van analitzar les cèl·lules obtingudes pel mateix tipus d'immunofluorescència que en el pulmó embrionari, es va poder veure que sobretot estaven enriquides en VIM ja que expressaven una gran quantitat de marcatge vermell (**Figura 14c**).

2. RESULTATS DE L'OBJECTIU 2: EL PAPER DEL TGF- β 1 EN EL CANVI MORFOLÒGIC

2.1. El hEML-CM conté nivells més alts de TGF- β 1 comparat amb el T-CM

Intentant deduir els factors que podrien haver aportat les hEML al medi durant el temps de condicionament, es va pensar en el TGF- β 1. D'aquesta manera es van analitzar els nivells de TGF- β 1 en el T-CM i el hEML-CM i es van comparar. Es van trobar nivells significativament més alts de TGF- β 1 en el hEML-CM en comparació al T-CM ($p=0,013$)(Figura 15).

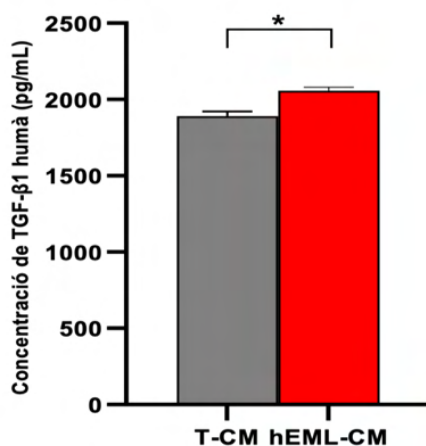


Figura 15. Concentració de TGF- β 1 en els medis condicionats. Gràfic que mostra com el hEML-CM va presentar nivells més alts de TGF- β 1 respecte el T-CM. Les columnes representen la mitjana \pm SEM i les barres d'error la desviació estàndard dels tres replicats. * $p<0,05$.

3. RESULTATS DE L'OBJECTIU 3: EL CANVI MORFOLÒGIC DE LES CÈL·LULES TUMORALS

3.1. Les cèl·lules A549 pateixen un canvi morfològic en hEML-CM indiferentment de la setmana embrional

Es van cultivar les cèl·lules de la línia d'adenocarcinoma pulmonar, A549, amb els medis hEML-CM E9, hEML-CM E10, hEML-CM E11 per veure si aquests medis provinents d'un microambient embrional afectaven d'alguna manera a les cèl·lules tumorals. En tots els casos es va poder veure un canvi morfològic al poc temps del condicionament que consistia en una elongació cel·lular i l'aparició de formes estrellades i espigades, recordant fenotípicament a cèl·lules mesenquimals. No es va observar cap diferència significativa en el tipus de canvi morfològic patit amb els tres tipus de hEML-CM que es van emprar (**Figura 16**). Per tant, quan a posteriori ens referim a hEML-CM, significa que es va utilitzar únicament hEML-CM E11.

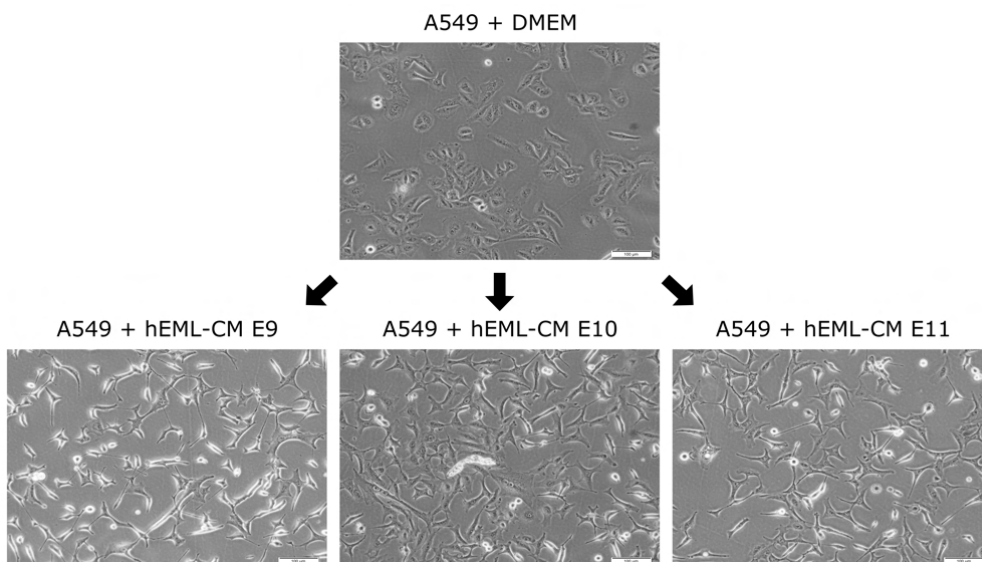


Figura 16. Cultiu de cèl·lules A549 amb diferents hEML-CMs. Les cèl·lules A549, que de normal tenen una forma poligonal compacta, van ser cultivades en hEML-CM E9, E10 i E11 i van canviar dràsticament la seva morfologia a formes estrellades i espigades, semblants a cèl·lules mesenquimals. Entre els tres tipus de medi no es van detectar diferències en el canvi produït.

3.2. El canvi morfològic no es degut al desgast de nutrients del medi

L'alteració en la morfologia podria haver estat produïda per l'esgotament de nutrients al medi degut a haver estat en contacte amb les cèl·lules hEML i no pels factors que es podrien haver alliberat al medi. Aleshores, es va pensar en generar un medi que també hagués estat en contacte durant 10 dies amb cèl·lules, però que no pogués aportar res nou al medi. D'aquesta manera es va generar el medi control T-CM. Quan es van fer créixer les cèl·lules A549 en T-CM i hEML-CM es va observar que les crescudes en hEML-CM patien el canvi morfològic mentre que les crescudes en T-CM no (**Figura 17**).

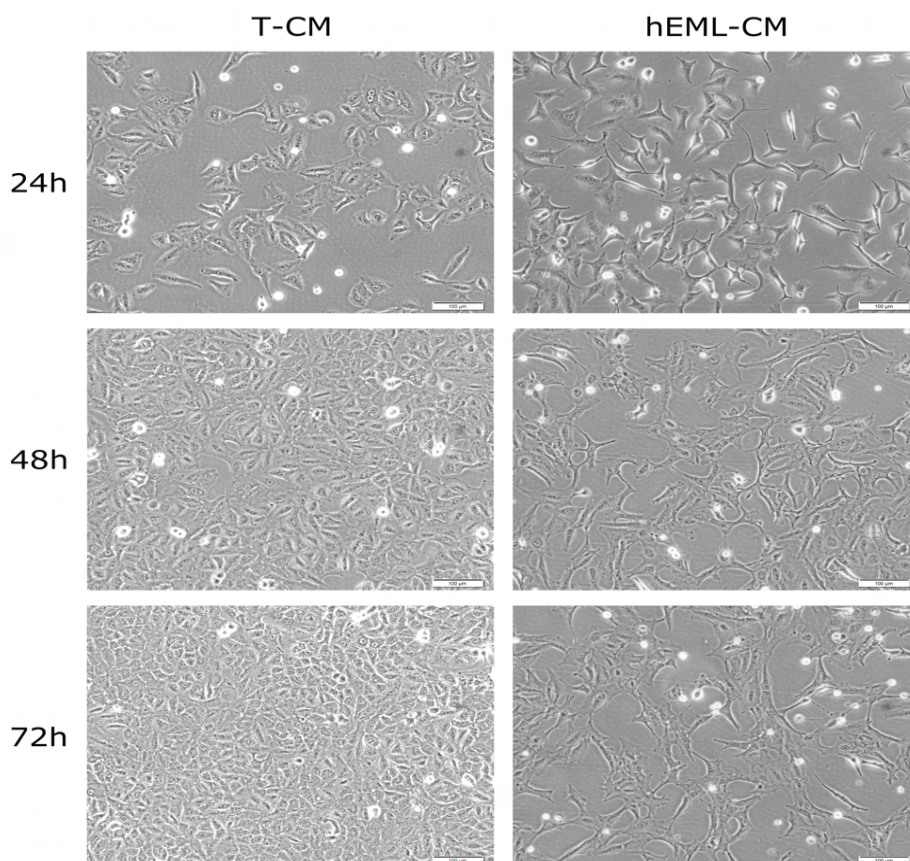


Figura 17. El desgast de nutrients del medi no es la causa del canvi morfològic. Es van fer créixer les cèl·lules A549 durant 72 hores en els dos medis condicionats prèviament en contacte durant 10 dies amb altres cèl·lules. Només en les cultivades en hEML-CM es va produir el canvi morfològic.

3.3. Els exosomes no intervenen en el canvi morfològic

Els exosomes s'han vist que estan relacionats en la comunicació entre cèl·lules i que molts cops el seu contingut està implicat en diversos processos cel·lulars. Davant aquesta premissa es va plantejar saber si el canvi morfològic podria estar relacionat amb els exosomes aportats al medi per les hEML. Llavors, es van testar els medis T-CM lliure d'exosomes i hEML-CM lliure d'exosomes en les cèl·lules A549 i es va observar que seguia passant el mateix que amb exosomes, deixant intuir que els exosomes probablement no estan implicats en el canvi morfològic (**Figura 18**).

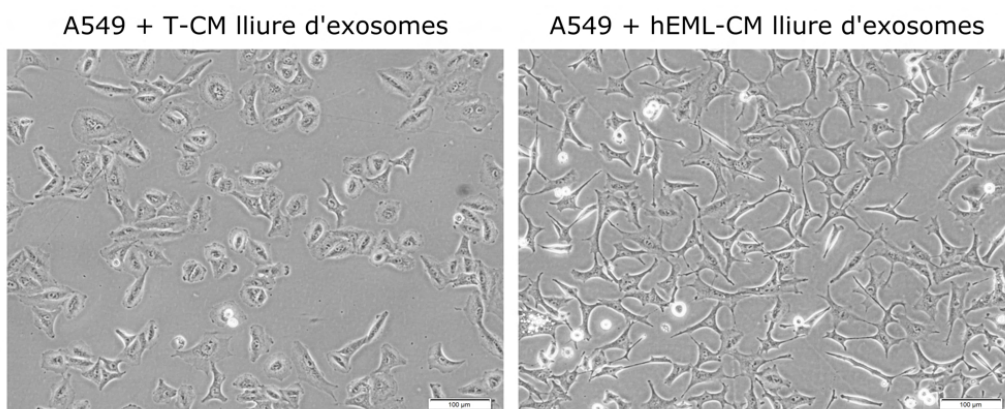


Figura 18. Els exosomes no estan implicats en el canvi morfològic. Quan es van cultivar les cèl·lules A549 en T-CM i hEML-CM ambdós lliures d'exosomes, no es va observar diferències respecte al que s'observa en els mateixos medis amb exosomes.

3.4. El canvi morfològic és dependent de la concentració de hEML-CM

Tot i la creació del T-CM, encara havia dubtes de si el que produïa el canvi en la morfologia era el que aportaven les cèl·lules mesenquimals o el desgast de nutrients. A més, es va voler saber a quina concentració de hEML-CM començava a fer-se visible el canvi morfològic. Per aquests dos motius es va generar un banc de dilucions de hEML-CM i es va provar en les cèl·lules A549. Es va poder observar com de mica en mica que anava incrementant la concentració de hEML-CM apareixien més cèl·lules amb la morfologia estrellada. Amb el 10% es va veure alguna cèl·lula de morfologia canviada,

Resultats de l'objectiu 3: El canvi morfològic de les cèl·lules tumorals

amb el 25% unes quantes d'elles i amb el 50% la majoria ja estaven canviades (**Figura 19**).

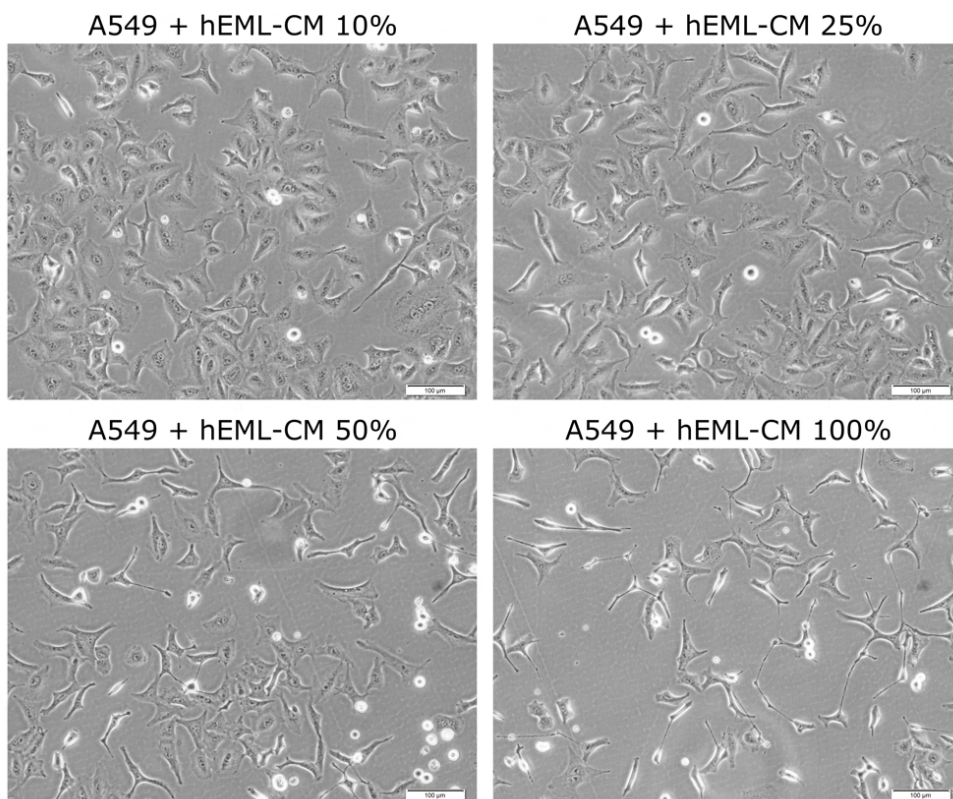


Figura 19. La concentració de hEML-CM es determinant per la quantitat de cèl·lules que presenten el canvi morfològic. El nombre de cèl·lules A549 que canvien morfològicament es va observar que augmentava com més alta era la concentració de hEML-CM en el medi en que creixien.

3.5. La duració del condicionament és limitada i depèn de la presència de hEML-CM

A continuació, es va voler saber si aquest gran canvi morfològic era permanent o temporal. En primer lloc, es van condicionar cèl·lules i es van tripsinitzar i ressemar en un nou pou amb medi normal per veure amb quina morfologia creixien. Es va poder observar que a les 24 hores encara hi havia un tant per cent alt de cèl·lules amb la morfologia alterada; però a les 48 hores ja estaven creixent de manera normal i quasi no quedaven cèl·lules amb el canvi morfològic (**Figura 20a**).

Resultats

En segon lloc, es va testar quan triguen les cèl·lules en retornar a la morfologia original al ser retirat el hEML-CM. A les 24 hores d'haver canviat el medi es podia veure com el 50% aproximadament de les cèl·lules havien tornat a la forma característica de les cèl·lules A549. A les 48 hores no es van observar pràcticament cèl·lules amb el canvi morfològic (**Figura 20b**).

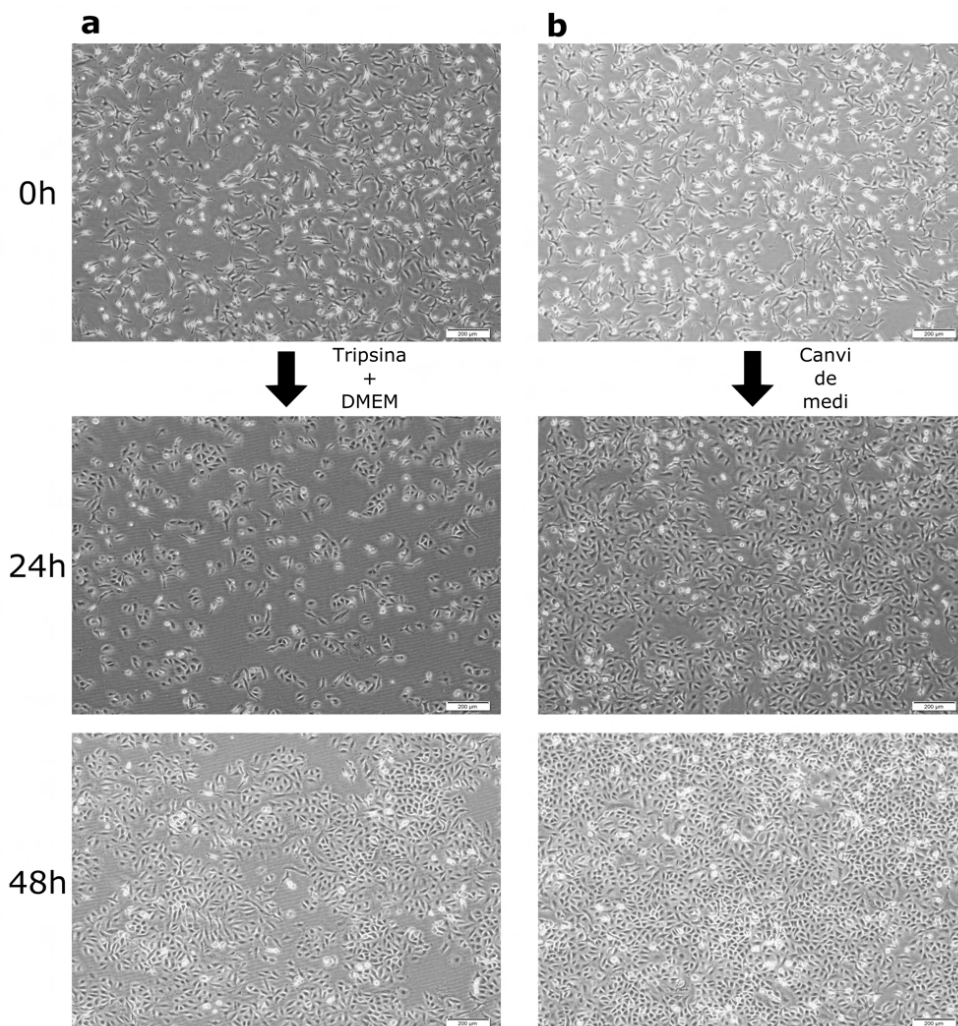


Figura 20. Duració del canvi morfològic. (a) Les cèl·lules condicionades es van tripsinitzar i ressemar en DMEM normal. A les 24 hores van començar a observar-se cèl·lules amb la morfologia típica de les A549, i a les 48 hores, pràcticament cap cèl·lula patia el canvi morfològic. (b) Es va retirar el hEML-CM de cèl·lules A549 condicionades i es va canviar per DMEM normal. En 24 hores la meitat de les cèl·lules van presentar la morfologia original, i en 48 hores no quedaven quasi cèl·lules amb el canvi morfològic.

3.6. Les cèl·lules H1299 també pateixen un canvi morfològic en hEML-CM

Veure si el canvi morfològic afectava a altres línies cel·lulars d'adenocarcinoma pulmonar era una pregunta important, així que es van cultivar en T-CM i hEML-CM cèl·lules de la línia cel·lular H1299. En aquest cas, també es va observar un canvi morfològic d'allargament de les cèl·lules al ser cultivades en hEML-CM, però destacava, sobretot, que van deixar de generar clapes i van començar a créixer de forma més individualitzada. Amb el medi T-CM, no es va observar cap variació en la morfologia respecte la típica d'aquestes cèl·lules (**Figura 21**).

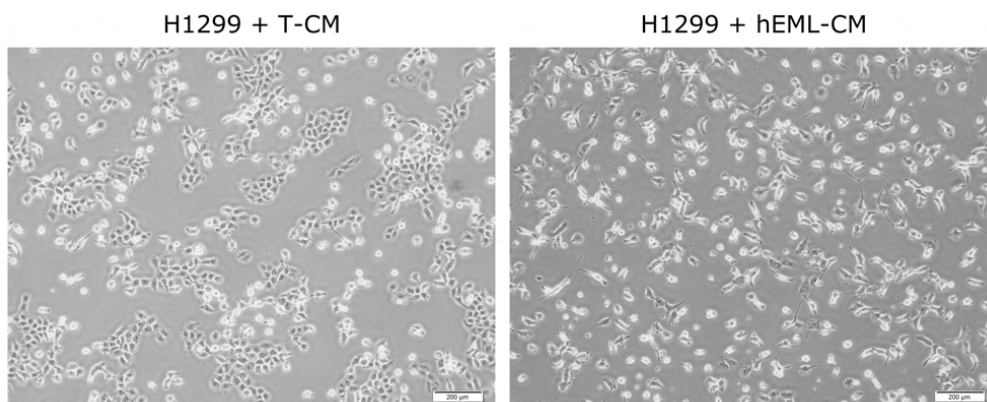


Figura 21. Cultiu de cèl·lules H1299 en hEML-CM. Les cèl·lules H1299, al igual que les A549, van mostrar un canvi morfològic al ser cultivades en hEML-CM i no en T-CM. Aquest canvi va consistir en una elongació de les cèl·lules i en una pèrdua del seu típic creixent en clapes.

3.7. El hEML-CM no afecta a cèl·lules tumorals d'altres òrgans

L'organotropisme és l'afinitat d'una substància per un òrgan en concret respecte altres; i justament es va voler comprovar si el hEML-CM actuava només en cèl·lules pulmonars o també reaccionaven a ell cèl·lules d'altres òrgans. Per aquesta prova es van fer créixer amb els medis condicionats les cèl·lules de la línia cel·lular LoVo, de càncer colorectal. Per una banda, quan es va utilitzar el T-CM, les cèl·lules no van presentar cap tipus de canvi morfològic ni alteració. Per l'altre banda, amb el hEML-CM tampoc es va

Resultats

detectar cap canvi suficientment significatiu. Tot i així, es va poder localitzar algunes poques cèl·lules de morfologia allargada (**Figura 22**).

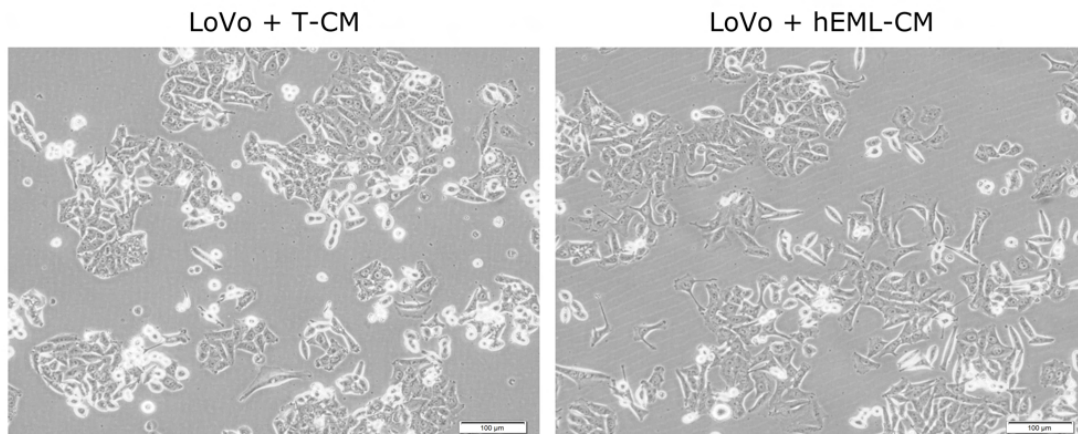


Figura 22. Organotropisme del hEML-CM. Les cèl·lules LoVo, de càncer colorectal, van ser cultivades amb medi condicionat. El resultat va ser que no es produïen canvis morfològics significatius.

3.8. El canvi morfològic al ser observat per SEM i TEM

Per finalitzar l'anàlisi del canvi morfològic, es van observar les cèl·lules A549 en T-CM i en hEML-CM per SEM. Un altre cop, les crescudes en el medi control no van patir cap canvi morfològic (**Figura 23a i b**); en canvi, les crescudes en medi condicionat van aparèixer amb la morfologia allargada, en forma estrellada i espigada, i destacava la pèrdua d'unions intercel·lulars (**Figura 23c i d**).

A més, es va creure que l'observació per TEM aportaria més informació de l'interior de les cèl·lules. A l'analitzar les cèl·lules A549 en T-CM es va observar que presentaven gran nombre de cossos lamel·lars en el seu citoplasma (**Figura 23e**); mentre que en hEML-CM disminuïa el seu nombre i apareixien estructures microfilamentoses i fibronexus (**Figura 23f**). A l'observar en deteniment les cèl·lules H1299, es va veure que al créixer en T-CM mostraven moltes estructures lipídiques (**Figura 23g**), les quals desapareixien quan es van cultivar en hEML-CM (**Figura 23h**).

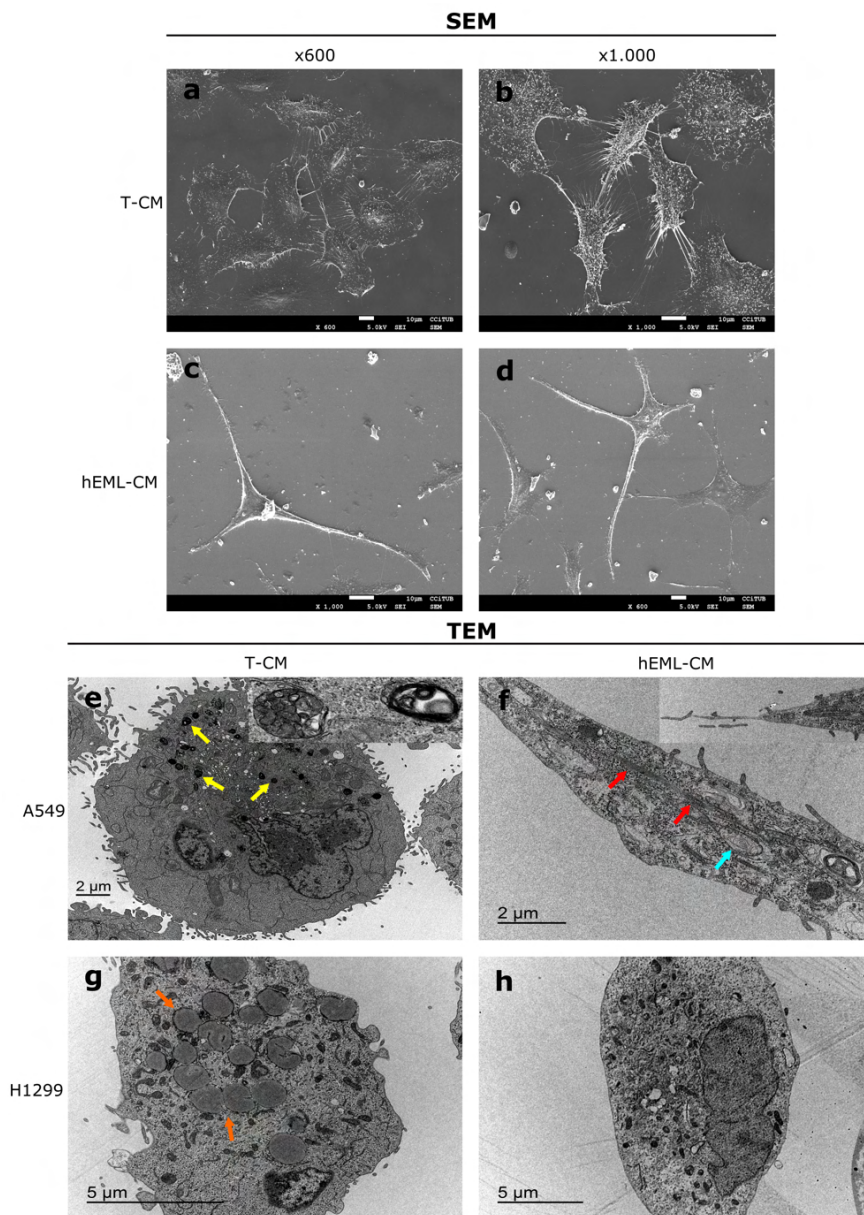


Figura 23. Observació per SEM i TEM de les cèl·lules condicionades. (a, b) Imatges d'A549 en T-CM observades per SEM. **(c, d)** Imatges d'A549 en hEML-CM observades per SEM. **(e)** Les A549 en T-CM observades per TEM van presentar gran nombre de cossos lamel·lars (fletxes grogues i ampliats en detall). **(f)** Les A549 en hEML-CM per TEM van mostrar morfologia allargada, microfilaments (fletxes vermelles), reticle endoplasmàtic rugós engruixit (fletxa blava) i fibronexus (ampliat en detall). **(g)** Les H1299 en T-CM per TEM van presentar gran quantitat de cossos lipídics (fletxes taronges). **(h)** Les H1299 en hEML-CM van mostrar una morfologia més allargada i menys lípids.

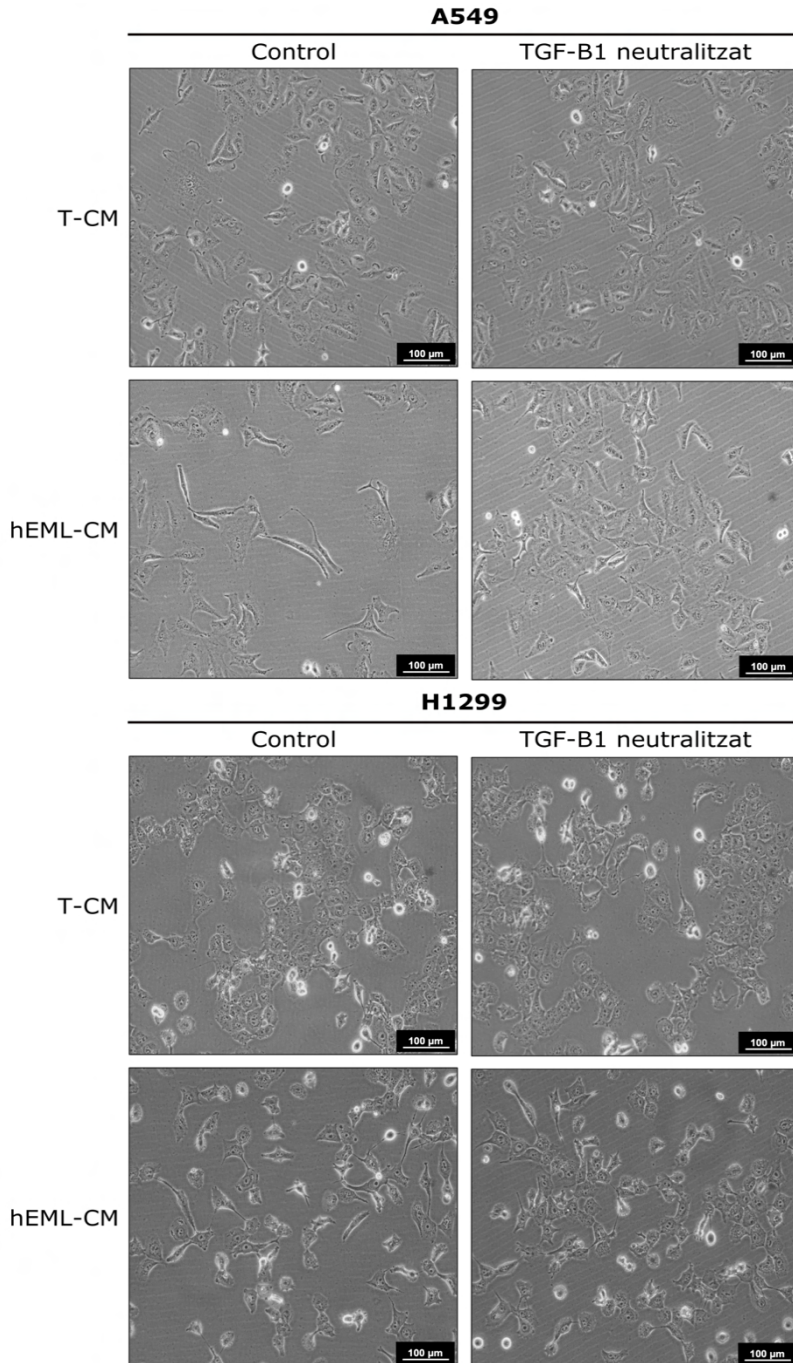


Figura 24. Neutralització del TGF-β1 en el hEML-CM. Es va neutralitzar el TGF-β1 en tots els medis i es va comparar amb imatges sense ser neutralitzat. Els dos únics casos en que es veien diferències en neutralitzar, va ser en el hEML-CM, on es va poder observar una disminució de les cèl·lules amb canvi.

3.9. El TGF- β 1 col·labora en el canvi morfològic

Òbviament, que el hEML-CM contingui nivells de TGF- β 1 més alts, va donar a pensar que podria ser una de les causes que provocaven el canvi morfològic, i es va voler confirmar. Al neutralitzar els nivells de TGF- β 1 en els medis i comparar la morfologia amb imatges dels medis sense neutralitzar, només es van apreciar diferències en la neutralització del hEML-CM. Es va observar que el nombre de cèl·lules amb morfologia canviada disminuïa en les dues línies al neutralitzar el TGF- β 1 del hEML-CM (**Figura 24**).

4. RESULTATS DE L'OBJECTIU 4: L'ESTUDI DE LES ALTERACIONS FUNCIONALS DEL CONDICIONAMENT

4.1. Les cèl·lules en hEML-CM tenen menys capacitat de proliferació

Quan es van analitzar a fons les imatges obtingudes del canvi morfològic, es va poder observar que semblaven que les cèl·lules condicionades amb hEML-CM proliferaven menys que les crescudes en T-CM. Es va voler confirmar aquesta apreciació experimentalment en les dos línies cel·lulars tumorals. Les A549 a les 48 hores cultivades en hEML-CM van mostrar una lleugera disminució de la proliferació respecte les cultivades en T-CM. Aquesta diferència en la proliferació va anar incrementant amb el temps tornant-se significativa a les 72 hores ($p=0,04$) i encara més significativa a les 96 hores ($p<0,001$)(Figura 25a). En el cas de les H1299, a les 48 hores no hi va haver senyals de diferències entre els dos medis; tanmateix, a les 72 hores va començar a aparèixer una tènue diferència en la proliferació fent-se significativa a les 96 hores ($p=0,001$)(Figura 25b).

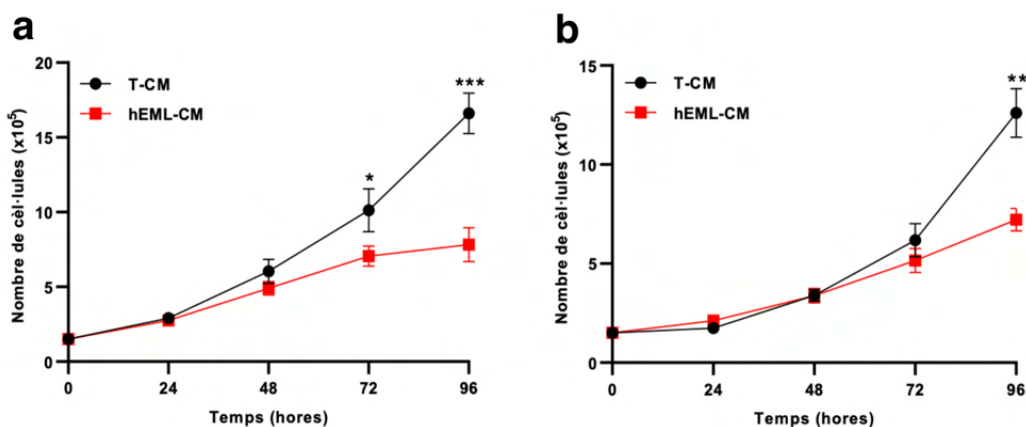


Figura 25. Proliferació de les línies cel·lulars A549 i H1299 després de 96 hores creixent en T-CM i hEML-CM. Gràfics que mostren com les cèl·lules en T-CM van proliferar més que en hEML-CM (a) a partir de les 72 hores, en A549, (b) i les 96 hores, en H1299. Els punts representen la mitjana \pm SEM de mínim tres rèpliques per experiment a 0, 24, 48, 72 i 96 hores. Les barres d'error representen la desviació estàndard de mínim tres replicats. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

4.2. Les cèl·lules en hEML-CM tenen menys capacitat de migració

Igual que amb la proliferació, es va voler veure si el condicionament afectava a la migració cel·lular. Gràcies al *scratch wound healing assay*, es va observar que les cèl·lules A549 en hEML-CM mantenien la seva morfologia mesenquimalitzada i a les 6 hores des de l'inici de l'experiment ja van aparèixer diferències significatives respecte la migració de les cultivades en T-CM ($p=0,0087$). Aquestes diferències van anar augmentant a les 24 hores ($p<0,001$) i a les 48 hores encara no estaven en confluència ($p<0,001$); al contrari que les A549 en T-CM que van estar confluents completament a les 48h (**Figura 26a i b**). Quan es van analitzar les H1299, les cultivades en hEML-CM a les 24 hores encara van estar confluents però si les cultivades en T-CM ($p<0,001$)(**Figura 26a i c**). A les 48 hores, les cèl·lules H1299 crescudes en ambdós medis estaven confluents. Aquest fet va indicar que la línia H1299 tenia una capacitat proliferativa més alta que la línia A549 (**Figura 26a**). Un detall curiós va ser que les cèl·lules condicionades proliferaven lentament però si que migraven cap al centre de la ferida (**Figura 26d**).

4.3. Les cèl·lules en hEML-CM tenen menys capacitat de generar colònies en 2D

Un altre característica funcional de les cèl·lules tumorals que es podria haver alterat i es va analitzar, era la capacitat de les cèl·lules per generar colònies en 2D. Als 12 dies de realitzar el *colony formation assay*, les cèl·lules A549 sembrades en hEML-CM van mostrar una disminució del 18,5% del nombre de colònies formades respecte les sembrades en T-CM ($p=0,002$). En els cas de les H1299, als 15 dies, la disminució del nombre de colònies detectades va ser 83,7% en les hEML-CM en comparació les T-CM ($p<0,001$)(**Figura 27**).

Resultats

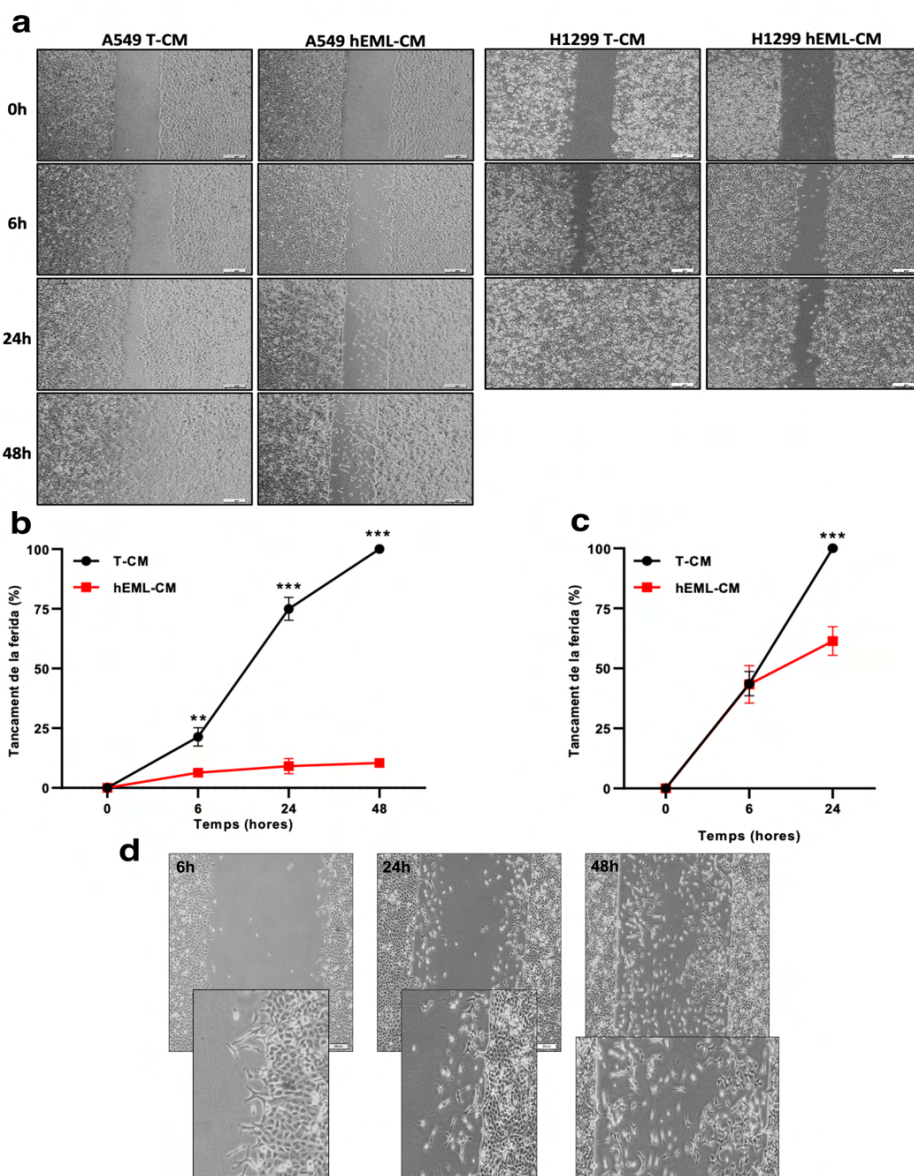


Figura 26. Scratch wound healing assay de les línies cel·lulars A549 i H1299 després de 96 hores creixent en T-CM i hEML-CM. (a) Ambdós línies van créixer fins la confluència en T-CM i hEML-CM tancant la ferida. Les fotografies es van realitzar a les 0, 6, 24 i 48 hores des de l'inici de la ferida. (b, c) Gràfics que representen el tant per cent de la ferida tancada a les diverses hores en la línia A549 i H1299, respectivament, comparant el creixement en els dos medis. Els punts representen la mitjana \pm SEM de les tres rèpliques de l'experiment a 0, 6, 24 i 48 hores. Les barres d'error representen la desviació estàndard dels tres replicats. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (d) Detall de les cèl·lules condicionades migrant de l'eix de tancament a les 6, 24 i 48 hores.

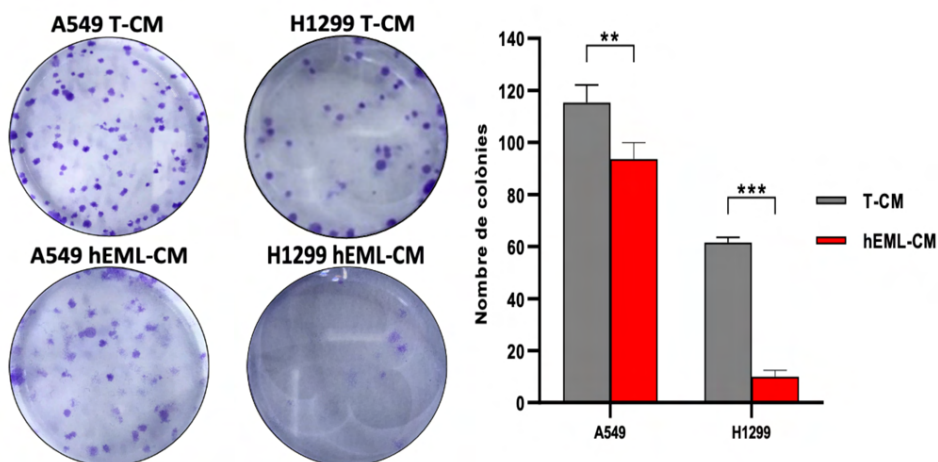


Figura 27. *Colony formation assay* (2D) de les línies cel·lulars A549 i H1299 després de 96 hores creixent en T-CM i hEML-CM. Unes imatges representatives de l'experiment que es va realitzar es poden observar a l'esquerra de la figura; mentre que a la dreta, es pot observar la representació gràfica del comptatge de colònies en 2D, on es detecta una disminució del nombre de colònies al créixer en hEML-CM. Les columnes representen la mitjana \pm SEM de les tres rèpliques de l'experiment. Les barres d'error representen la desviació estàndard dels tres replicats. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4. Les cèl·lules en hEML-CM tenen menys capacitat de generar colònies en 3D

Una prova paral·lela al *colony formation assay* va ser el *soft-agar assay*, ja que va servir per veure la capacitat de formar colònies en 3D. Als 8 dies de l'inici de l'experiment, les cèl·lules en hEML-CM van mostrar una disminució en la formació de colònies del 40,9% en A549 ($p < 0,001$) i del 20% en H1299 ($p < 0,001$) respecte les cèl·lules en T-CM (Figura 28).

4.5. Les cèl·lules en hEML-CM tenen menys capacitat tumoral *in vivo*

Inicialment, es va establir que el nombre més òptim de cèl·lules A549 a inocular subcutàniament en un ratolí B6 Rag2^{-/-} era de 1×10^6 cèl·lules, ja que ni amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules, per poques, ni amb 5×10^6 cèl·lules, per masses, es va generar tumor als 26 dies. I amb la segona prova, es va observar que les cèl·lules condicionades inoculades en hEML-CM produïen un tumor més petit que les no condicionades (Figura 29a-d). A més, l'anàlisi macroscòpic dels

Resultats

pulmons mostrava l'existència d'un component inflamatori en els ratolins injectats amb T-CM (**Figura 29e i f**).

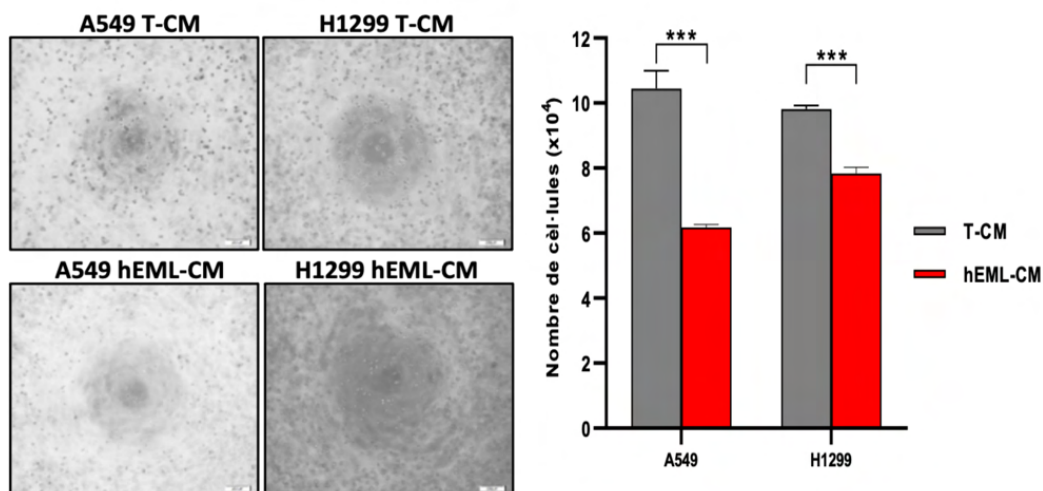


Figura 28. *Soft-agar assay* (3D) de les línies cel·lulars A549 i H1299 després de 96 hores creixent en T-CM i hEML-CM. Unes imatges representatives de l'experiment es poden observar a l'esquerra de la figura; mentre que a la dreta, es pot observar la representació gràfica del nombre de cèl·lules, on es dedueix una disminució del nombre de colònies al créixer en hEML-CM. Les columnes representen la mitjana \pm SEM i les barres d'error representen la desviació estàndard dels tres replicats. *** $p < 0,001$.

En el *xenograft tumor model*, es va poder observar com els tumors creixien significativament més quan les cèl·lules A549 estaven en T-CM respecte les condicionades i inoculades en hEML-CM. Aquest efecte inhibitori del creixement tumoral es va validar mesurant el creixement dins els ratolins *nude* (**Figura 30a**), on del dia 16 al 35 va començar a ser significativa la diferència ($p=0,004$; $p=0,013$; $p=0,027$; $p=0,001$; $p < 0,0001$) (**Figura 30b**); i, pesant i mesurant els tumors *ex vivo* als 35 dies ($p=0,0033$; $p=0,026$); tot i que histològicament ambdós tumors eren igual, formats per cèl·lules característiques d'adenocarcinoma (**Figura 30d-f**). Un detall a destacar va ser el fet de que els ratolins al que se'ls va injectar cèl·lules A549 T-CM tenien un pes significativament inferior, tot i tenir tumors significativament més grans, respecte als que se'ls van injectar les A549 hEML-CM (**Figura 30c**).

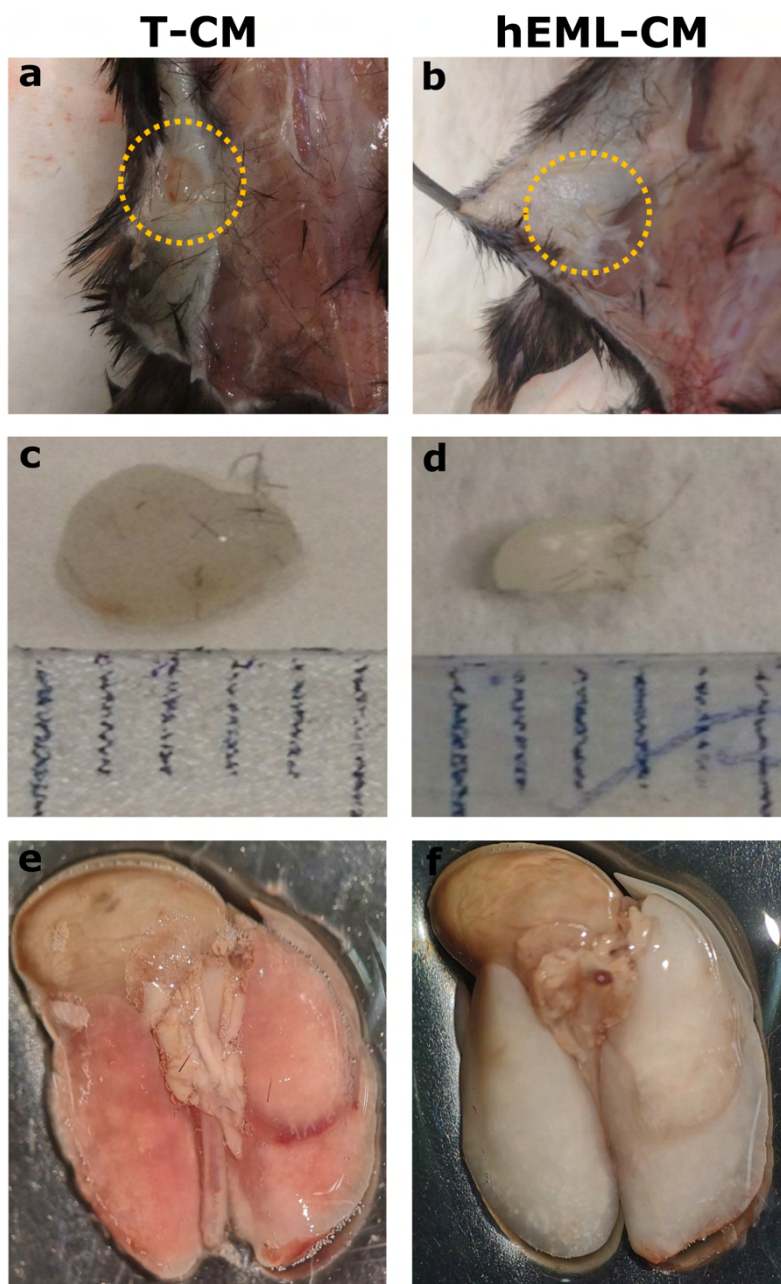


Figura 29. Prova per generar tumors en els ratolins B6 Rag2^{-/-}. (a, b) Als 26 dies de la inoculació de cèl·lules A549 en T-CM i hEML-CM, respectivament, es van dissecar els dos ratolins. (c, d) Al comparar la mida dels tumors, es va observar que el provinent de cèl·lules en T-CM era de major mida que el provinent de cèl·lules en hEML-CM. (e, f) Els pulmons del ratolí T-CM van mostrar una major pigmentació vermella que el del ratolí hEML-CM.

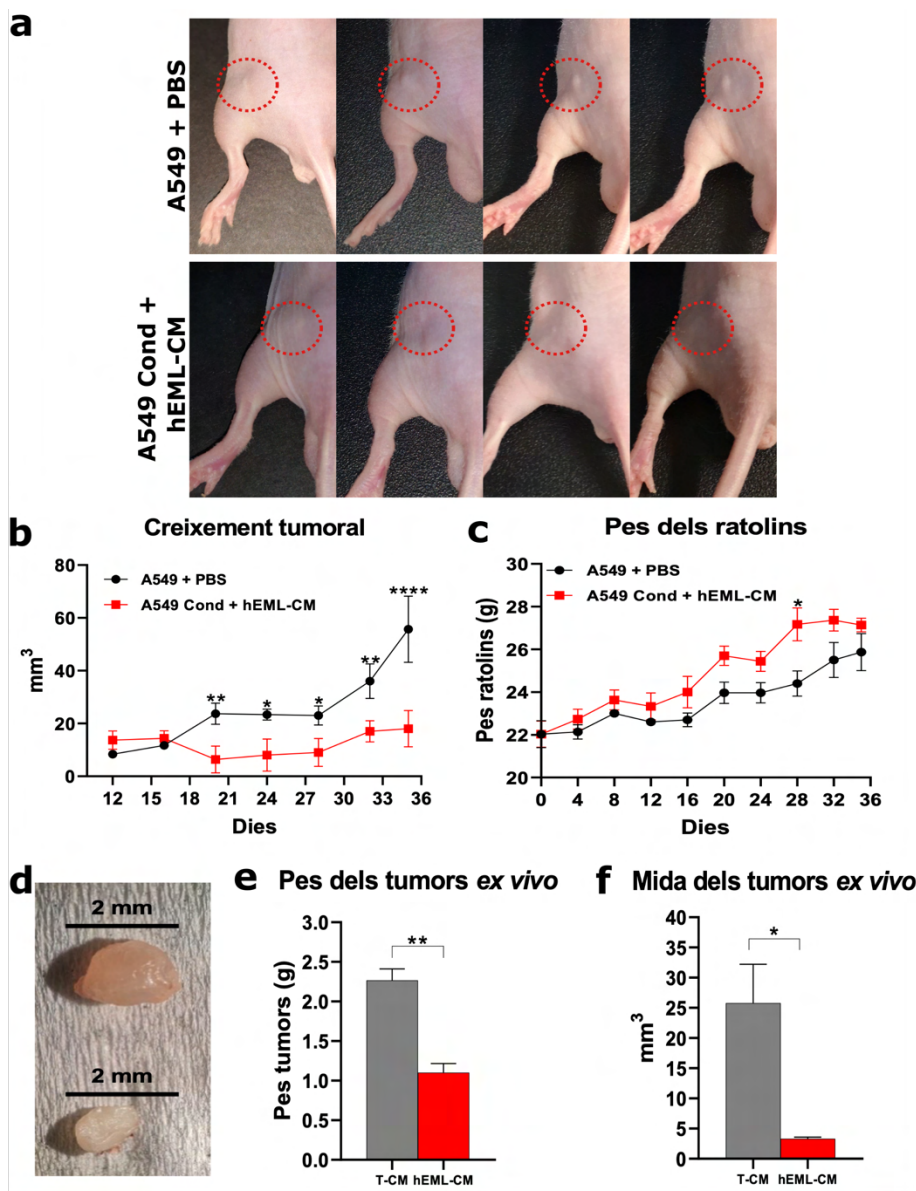


Figura 30. Estudi de la capacitat de generar tumors *in vivo* per part de les cèl·lules condicionades en ratolins *nude*. (a) Imatges representatives del creixement tumoral *in vivo* en ratolins amb cèl·lules control i condicionades. (b) Gràfic del creixement tumoral *in vivo* en ratolins amb cèl·lules control i condicionades. (c) Gràfic del pes dels ratolins amb cèl·lules control i condicionades durant els dies de l'experiment. (d) Imatge comparativa d'un tumor de ratolí amb cèl·lules control (part superior) i d'un de ratolí amb cèl·lules condicionades (part inferior). (e) Gràfic del pes dels tumors *ex vivo*. (f) Gràfic de la mida dels tumors *ex vivo*. Totes les dades representen la mitjana \pm SEM dels replicats. Les barres d'error representen la desviació estàndard dels tres replicats. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5. RESULTATS DE L'OBJECTIU 5: L'ESTUDI DE LES ALTERACIONS MOLECULARS DEL CONDICIONAMENT

5.1. Les cèl·lules en hEML-CM expressen nivells més baixos de marcadors de pluripotència (*OSKM*)

Un cop estudiades una sèrie de capacitats funcionals que es van veure alterades al condicionar, es va voler analitzar alteracions moleculars degudes al condicionament amb hEML-CM. En primer lloc es van analitzar l'expressió dels gens *OSKM* relacionats amb la pluripotència de les cèl·lules. En el cas de A549, es va observar una reducció significant al cultivar en hEML-CM respecte T-CM de tres dels quatre marcadors *OCT-3/4* ($p=0,02$), *KLF4* ($p=0,003$) i *c-MYC* ($p=0,014$). El quart marcador, *SOX2*, va patir una reducció però no va arribar a ser significativa (**Figura 31a**). Per altre banda, en H1299, només *SOX2* ($p=0,045$) i *c-MYC* ($p=0,009$) van presentar una baixada significativa en la seva expressió, ja que *OCT-3/4* i *KLF4* també van disminuir però no fins un valor prou significatiu (**Figura 31b**).

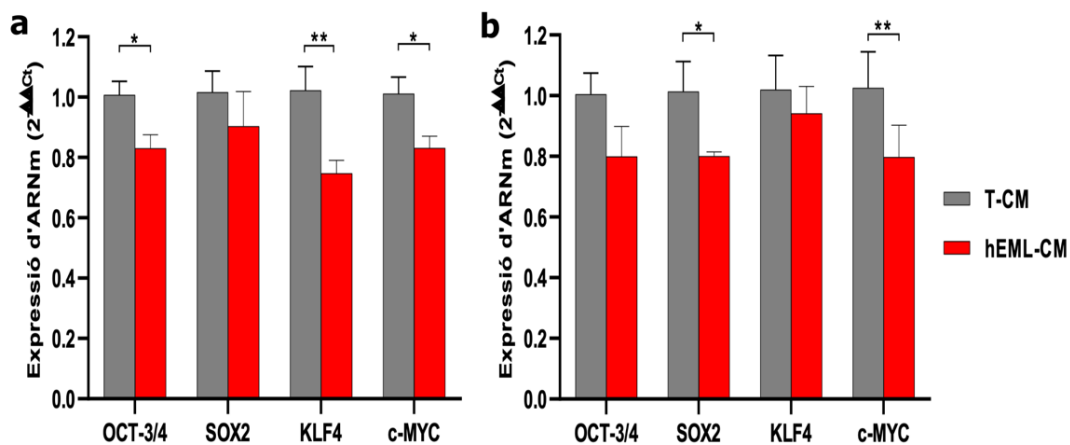


Figura 31. Expressió dels nivells de *OSKM*. (a) Gràfic dels nivells d'ARNm dels TFs *OSKM* en la línia cel·lular A549 al ser condicionada amb T-CM i hEML-CM; on es va observar la disminució significativa de *OCT-3/4*, *KLF4* i *c-MYC*. (b) Gràfic dels nivells d'ARNm dels TFs *OSKM* en les H1299 al ser condicionades amb T-CM i hEML-CM; on es va observar la disminució significativa de *SOX2* i *c-MYC*. Les columnes representen la mitjana \pm SEM i les barres d'error la desviació estàndard dels tres replicats. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

5.2. Les cèl·lules en hEML-CM expressen nivells més baixos de marcadors d'adenocarcinoma pulmonar i pulmó embrionari (*NKX2-1* i *SFTPs*)

A continuació, es van analitzar els nivells d'ARNm del marcador d'adenocarcinoma pulmonar, *NKX2-1*. A més, es va voler explorar la potencial relació entre *NKX2-1* i la síntesis de *SFTPs* pulmonars. D'aquests últims es van estudiar *SFTPA*, *SFTPB*, *SFTPC* i *SFTPD*. En ambdues línies cel·lulars van disminuir els nivells de *NKX2-1* al condicionar amb hEML-CM ($p=0,029$ en A549 i $p=0,041$ en H1299)(**Figura 32a i b**). Per altre banda, en A549 van baixar els nivells de *SFTPB* ($p=0,022$) al cultivar en hEML-CM (**Figura 32a**); mentre que en H1299 van fer-ho els nivells de *SFTPD* tot i que no van ser significatius (**Figura 32b**). No es van detectar nivells de *SFTPA* ni *SFTPC* en cap de les dues línies.

Per complementar l'anàlisi dels nivells de *SFTPs*, les dues línies van ser tenyides per detectar els nivells de lípids surfactants en el seu interior. Tant A549 com H1299 cultivades en T-CM presentaven alt marcatge en el seu citoplasma, mentre que al ser cultivades en hEML-CM no presentaven gens de marcatge (**Figura 32c i d**).

5.3. Les cèl·lules en hEML-CM expressen nivells més alts d'ADN metiltransferases (*DNMTs*)

Un altre factor que es va voler analitzar va ser la possibilitat de canvis en la metilació de les cèl·lules condicionades i un possible control per metilació de gens. Es van analitzar els nivells de dues *DNMTs*, l'*ADN metiltransferasa 3A* (*DNMT3A*) i la *3B* (*DNMT3B*). Les dues van mostrar estar sobreexpressades tant en A549 ($p=0,036$ i $p=0,042$, respectivament)(**Figura 33a**) com en H1299 ($p=0,003$ i $p=0,007$, respectivament)(**Figura 33b**) al ser cultivades en hEML-CM respecte si es comparaven amb les cultivades en T-CM.

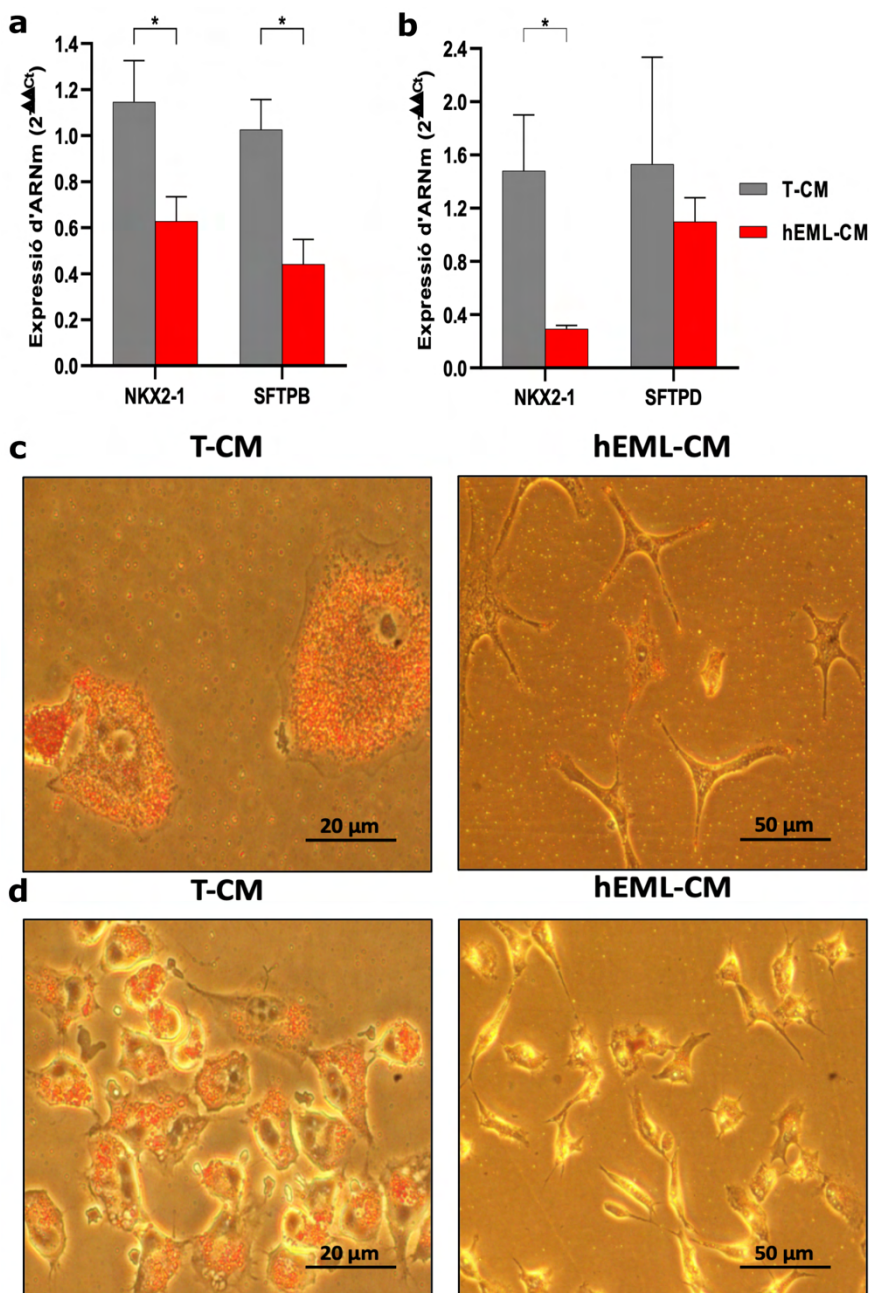


Figura 32. Expressió dels nivells de *NKX2-1* i *SFTPs*. (a, b) Gràfics dels nivells d'ARNm de *NKX2-1* i *SFTPs* de les línies cel·lulars A549, primer, i H1299, segon, al ser condicionades amb T-CM i hEML-CM; on es va observar una reducció significativa, exceptuant en *SFTPD*. Les columnes representen la mitjana \pm SEM i les barres d'error la desviació estàndard dels tres replicats. * $p < 0,05$. (c, d) Imatges de contrast de fase amb tinció Oil Red Solution de lípids, on ambdues línies mostren tinció positiva en T-CM i negativa en hEML-CM.

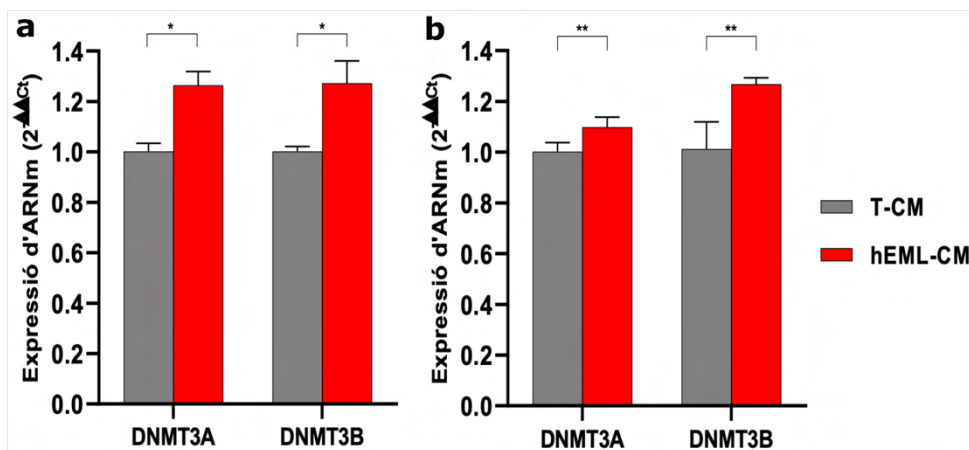


Figura 33. Expressió dels nivells de *DNMTs*. (a) Gràfic dels nivells d'ARNm de *DNMT3A* i *DNMT3B* en la línia cel·lular A549 al ser condicionada amb T-CM i hEML-CM; on es va observar un increment significatiu. (b) Gràfic dels nivells d'ARNm de *DNMT3A* i *DNMT3B* en la línia cel·lular H1299 al ser condicionada amb T-CM i hEML-CM; on es van observar també un increment significatiu. Les columnes representen la mitjana ±SEM de les tres rèpliques de l'experiment. Les barres d'error representen la desviació estàndard dels tres replicats. *p<0,05; **p<0,01.

5.4. Les cèl·lules en hEML-CM presenten un genotip diferent de les cèl·lules en T-CM

Per mitjà de l'anàlisi d'expressió diferencial es van mirar quants gens es trobaven de forma significativa ($p < 0,001$) diferencialment expressats entre les cèl·lules base i les cèl·lules en hEML-CM. La línia A549 va presentar 1.631 DEG, mentre que la línia H1299 va presentar 866. Comparant els dos grups de gens es van trobar 449 DEG que eren comuns (**Figura 34a**). Ambdós llistats complets de DEG es poden trobar al material suplementari de l'article. Tot i així, el top 100 de DEG de cada línia cel·lular es va representar en forma de *heatmap* (**Figura 34b i c**).

Resultats de l'objectiu 5: L'estudi de les alteracions moleculars del condicionament

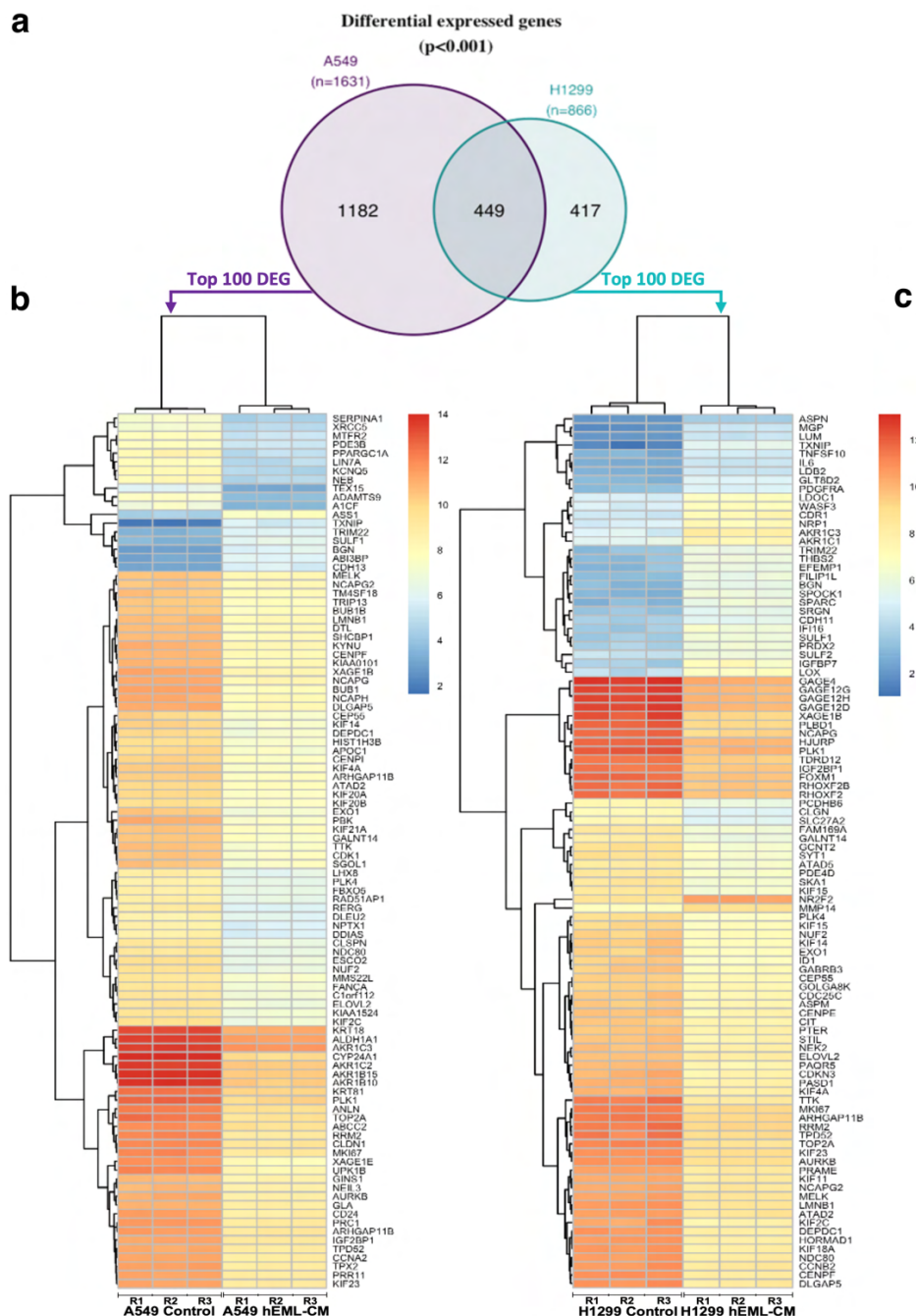


Figura 34. Anàlisi transcriptòmic per avaluar els efectes genotípics del hEML-CM. (a) Diagrama Venn que va mostrar el nombre de DEG en A549, H1299 i els comuns entre les dues línies al comparar entre la línia base i la cultivada en hEML-CM. (b, c) Heatmaps que van mostrar el top 100 DEG en A549 i H1299, respectivament.

Resultats

Adicionalment, l'anàlisi d'enriquiment per termes GO va mostrar els termes GO que contenen més DEG en cadascuna de les línies cel·lulars estudiades, es a dir, les vies més alterades degut al cultiu amb el hEML-CM (**Figura 35**). En A549 va destacar que es veiessin afectades vies que regulen el cicle cel·lular, el metabolisme dels lípids, la diferenciació epitelial, l'organització del citoesquelet i el desenvolupament de teixits. En H1299 va destacar l'afectació de vies que regulen la proliferació, la reproducció i la transcripció de l'ADN. Els llistats complets dels DEG inclosos a cada terme GO es poden trobar al material suplementari de l'article.

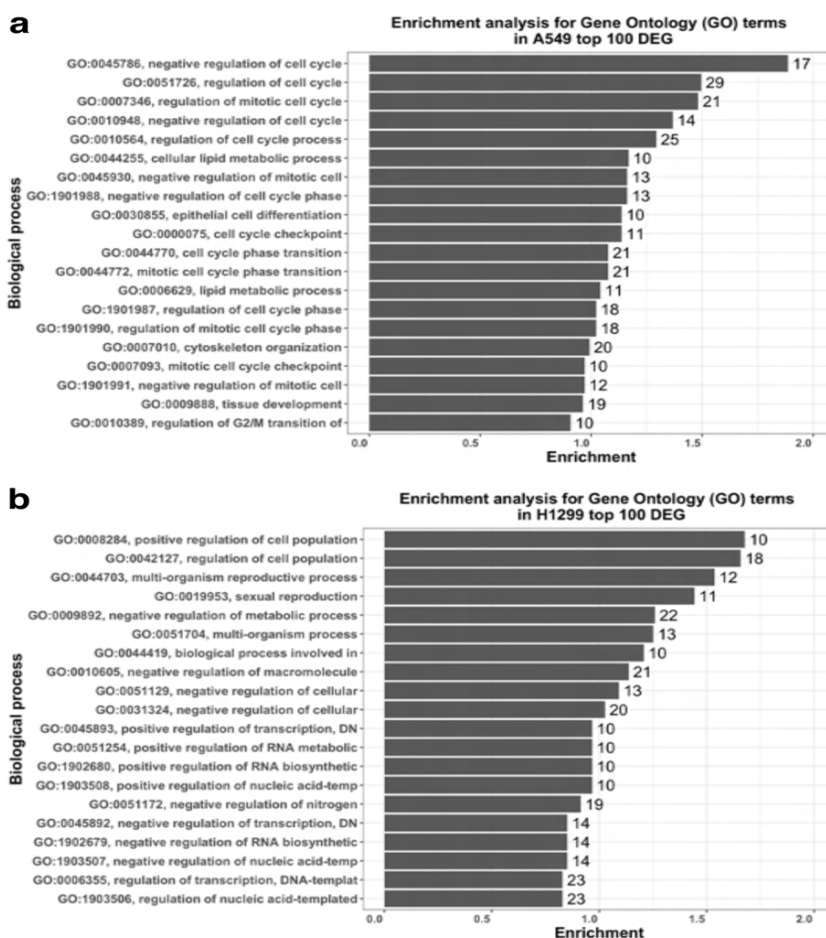


Figura 35. Anàlisi d'enriquiment per termes GO. (a, b) L'anàlisi es va realitzar amb el top 100 DEG de les línies A549 i H1299, respectivament. Els nombres al costat de cada barra van indicar el nombre de gens inclosos en cada terme GO.

6. RESULTATS DE L'OBJECTIU 6: L'ANÀLISI DE LA DIFERENCIACIÓ CAUSADA PEL CONDICIONAMENT

6.1. Les cèl·lules en hEML-CM expressen nivells més alts de marcadors mesenquimals (VIM i α -SMA)

Una de les característiques més destacables del canvi morfològic va ser la gran similitud amb cèl·lules mesenquimals. Per tal de constatar si aquestes cèl·lules presentaven o no marcadors mesenquimals, es van analitzar els nivells de VIM i α -SMA, típics de cèl·lules mesenquimals. Les cèl·lules A549 i H1299 cultivades en hEML-CM van mostrar alts nivells de marcatge respecte les cultivades en T-CM (**Figura 36**). Per part de la VIM, en A549 i H1299 es va poder observar positivitat en el marcatge al ser cultivades en hEML-CM (**Figura 36b i d**), però no en les cèl·lules en T-CM (**Figura 36a i c**). I per part de α -SMA, per ambdues línies cel·lulars també es va observar marcatge positiu en les cultivades en hEML-CM (**Figura 36f i h**), però no en les cultivades en T-CM (**Figura 36e i g**).

6.2. Les cèl·lules en hEML-CM expressen nivells més alts de marcadors miofibroblàstics (*MYH4*)

Un cop analitzats marcadors mesenquimals, es van mirar marcadors concrets de miofibroblasts. Aquestes cèl·lules es caracteritzen per expressar miosines (MYHs), aleshores es van analitzar els nivells d'ARNm de les *miosines 1, 2, 3, 4, 7 i 16* (*MYH1, MYH2, MYH3, MYH4, MYH7 i MYH16*, respectivament) en les cèl·lules en T-CM i hEML-CM. La *MYH4* es va detectar sobreexpressada en A549 ($p=0,033$) i H1299 ($p=0,032$) en les cèl·lules cultivades en hEML-CM en comparació a les cultivades en T-CM (**Figura 37a**). No es van detectar nivells d'expressió de les altres MYHs a les cèl·lules de les dues línies cel·lulars. A continuació, per immunofluorescència, les cèl·lules A549 i H1299 cultivades en hEML-CM van mostrar marcatge per la *MYH4*, tot i que les H1299 en menys intensitat. Pel contrari, les cèl·lules A549 i H1299 cultivades en T-CM no van expressar marcatge per la *MYH4* (**Figura 37b**).

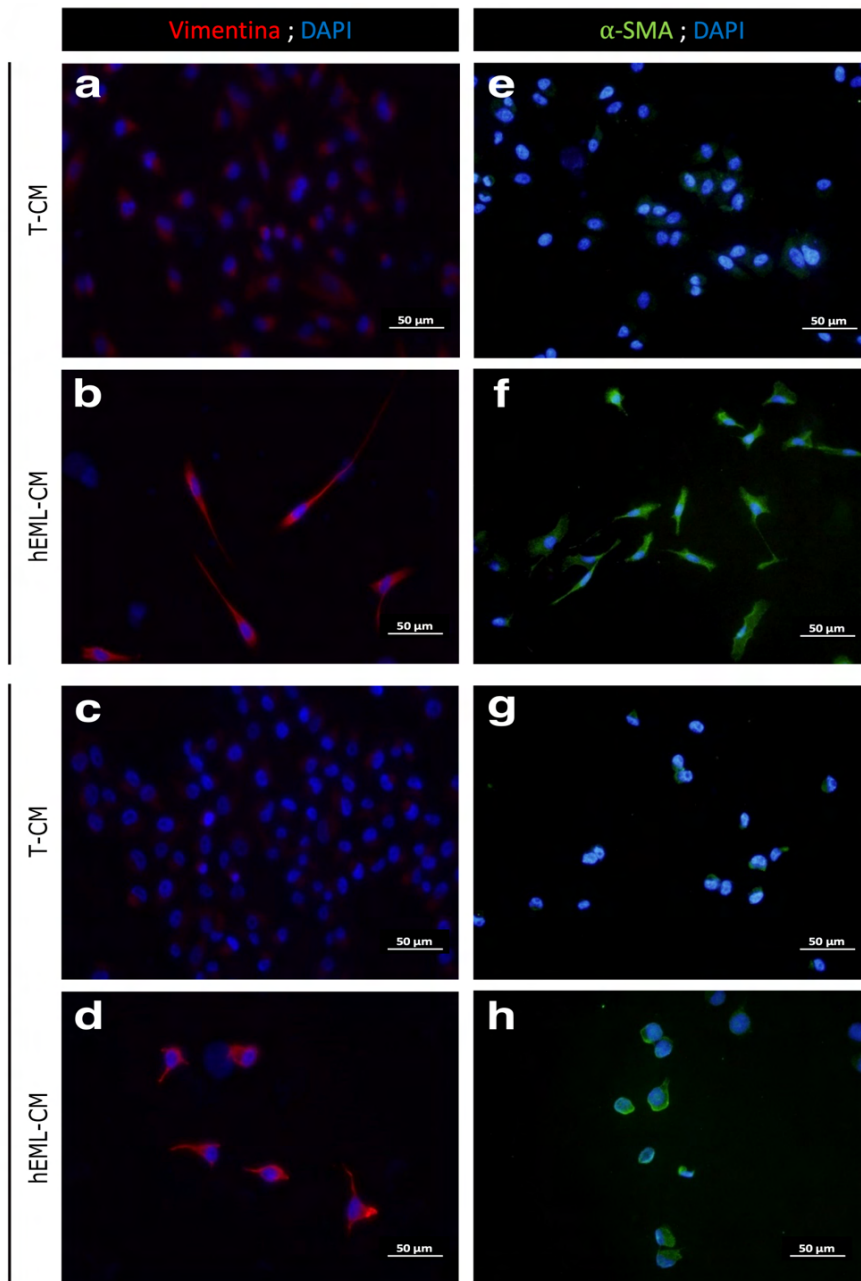


Figura 36. Immunofluorescències per a la detecció de marcadors mesenquimals en A549 i H1299. (a-d) El marcatge que es va detectar de VIM en A549 i H1299; **a, c** van mostrar marcatge negatiu de les cèl·lules cultivades en T-CM i **b, d** van mostrar marcatge positiu de les cèl·lules cultivades en hEML-CM. **(e-h)** El marcatge que es va detectar de α -SMA en A549 i H1299; **e, g** van mostrar marcatge negatiu de les cèl·lules cultivades en T-CM i **f, h** van mostrar marcatge positiu de les cèl·lules cultivades en hEML-CM. Els nuclis van ser marcats amb DAPI.

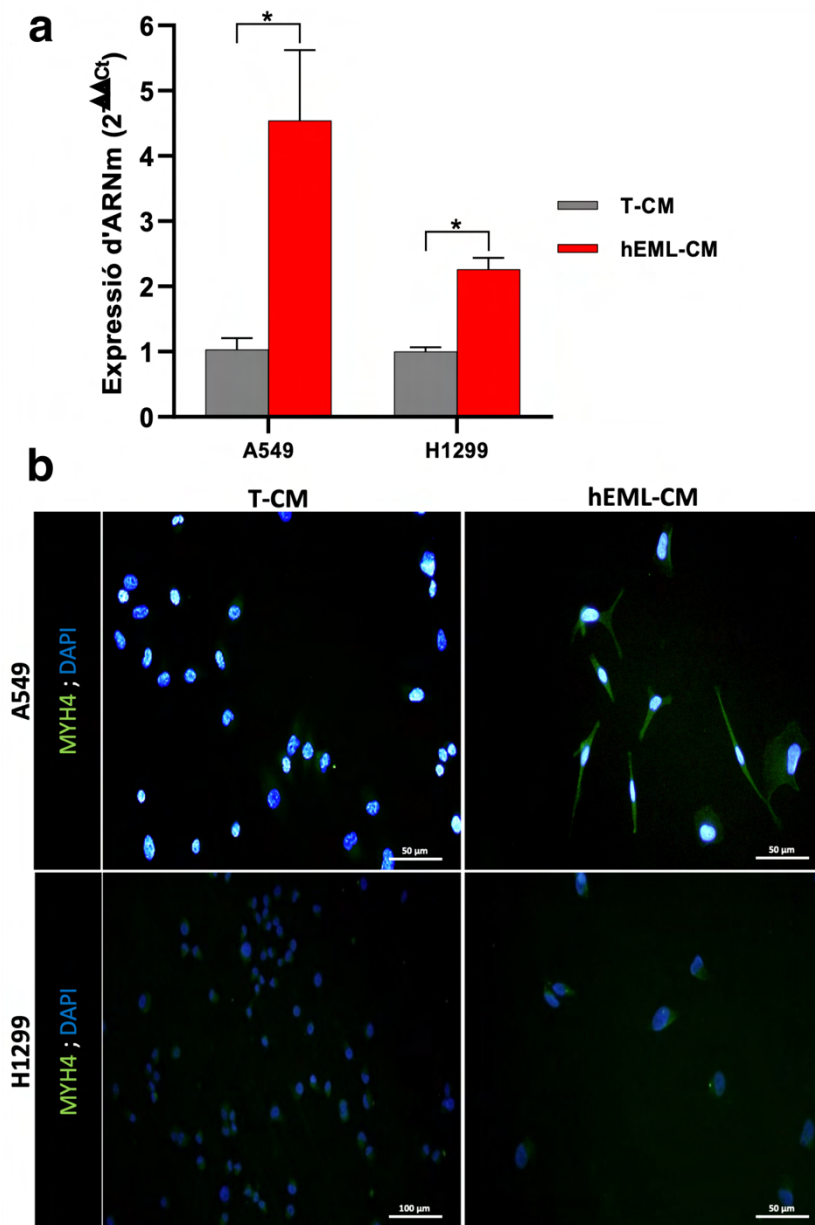


Figura 37. Expressió dels nivells de *MYH4* per qRT-PCR i immunofluorescència. (a) Gràfics dels nivells d'ARNm de *MYH4* en les línies cel·lulars A549 i H1299 al ser condicionades amb T-CM i hEML-CM; on es va observar un increment significatiu al condicionar. Les columnes representen la mitjana \pm SEM i les barres d'error representen la desviació estàndard dels tres replicats. * $p < 0,05$. (b) Immunofluorescències per la detecció de *MYH4*. Les línies cel·lulars en hEML-CM van mostrar marcatge positiu, encara que va ser més lleu en les H1299. No es va detectar marcatge en les cultivades en T-CM. Els nuclis van ser marcats amb DAPI.

6.3. Les cèl·lules en hEML-CM tendeixen a semblar-se a cèl·lules mesenquimals i fibroblàstiques

Amb els marcadors anteriors estudiats, es va intuir quina tendència de diferenciació seguien al condicionar-se; tot i així, per confirmar la nostra hipòtesis es va realitzar l'anàlisi del *multidimensional scaling plot*. No tenint en compte les cèl·lules cultivades en hEML-CM, es van poder localitzar cinc grups clarament definits d'esquerre a dreta de la dimensió 1: Grup mesenquimal (HLF i mioblasts), grup endotelial (HPAEC), grup epitelial normal (HBEC6-KT), grup A549 base i grup H1299 base. El grup més pròxim als grups de les dues línies cel·lulars tumorals base va ser el grup epitelial normal. Tenint en compte les cèl·lules cultivades en hEML-CM, es va veure que es separaven dels seus respectius grups base i del grup epitelial normal i s'aproximaven al grup endotelial i mesenquimal (**Figura 38**).

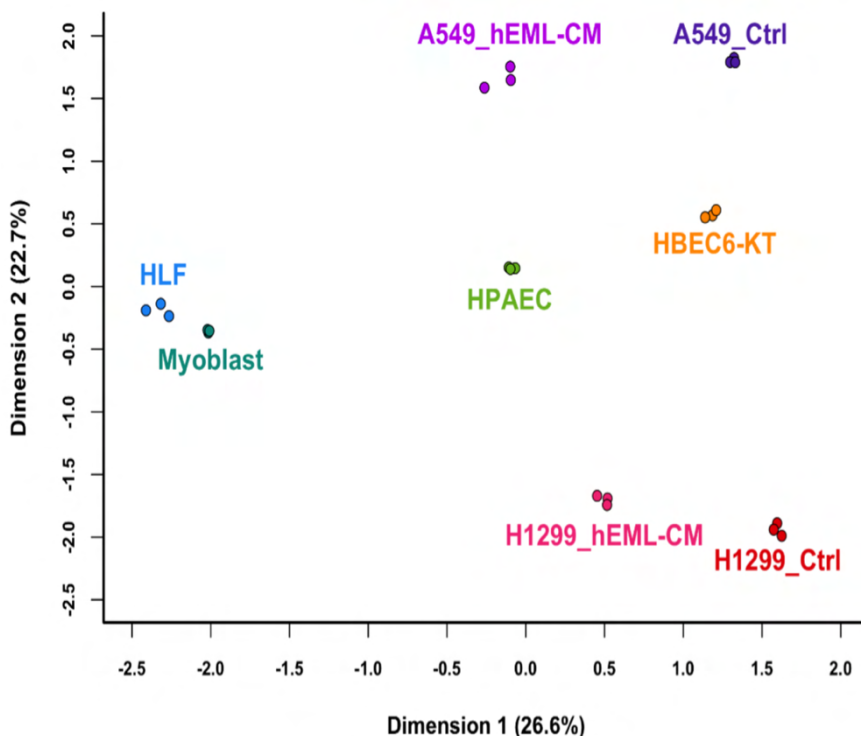


Figura 38. Multidimensional scaling plot. Es van localitzar 5 grups principals (mesenquimal, endotelial, epitelial, A549 base i H1299 base), i es va observar com les cèl·lules en hEML-CM s'aproximaven als grups endotelial i mesenquimal allunyant-se de les seves bases. De cada grup principal es van incloure tres mostres.

Resultats de l'objectiu 6: L'anàlisi de la diferenciació causada pel condicionament

Per saber més fidelment cap a quin dels grups es desplaçaven les cèl·lules en hEML-CM al separar-se del seu grup origen, es va analitzar la matriu de distàncies. A la matriu compactada es va veure que les cèl·lules A549 en hEML-CM al que més s'assemblava per proximitat era a tot el grup mesenquimal, i les cèl·lules H1299 en hEML-CM al grup mesenquimal i a les A549 en hEML-CM (**Figura 39**). A l'analitzar la matriu de distàncies completa es va veure que ambdues línies en hEML-CM tenien la major proximitat amb la seva pròpia línia base original, però acte seguit molt pròxim tenien el grup mesenquimal; mentre que ambdues línies cel·lulars sense condicionar al que més pròxim estaven era a les condicionades i al grup epitelial (**Figura 40**).

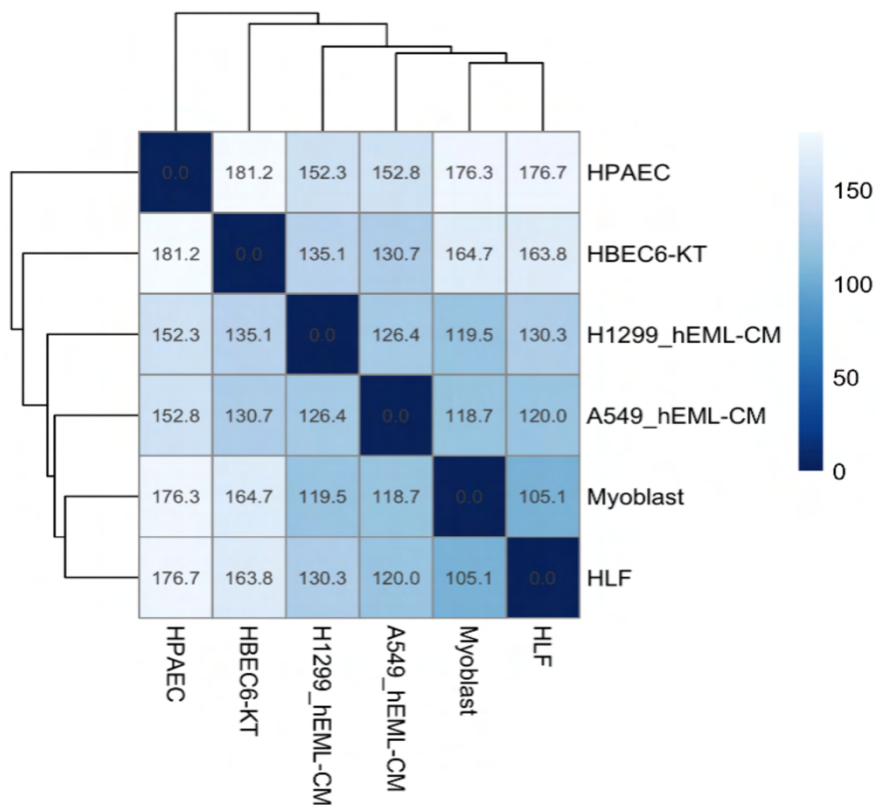


Figura 39. Matriu de distàncies simplificada. Es va observar com les línies cel·lulars en hEML-CM tenien major proximitat amb el grup mesenquimal, indicat pels valors i pel color del *heatmap*. Es va mostrar la mitjana de les tres rèpliques de cada grup.

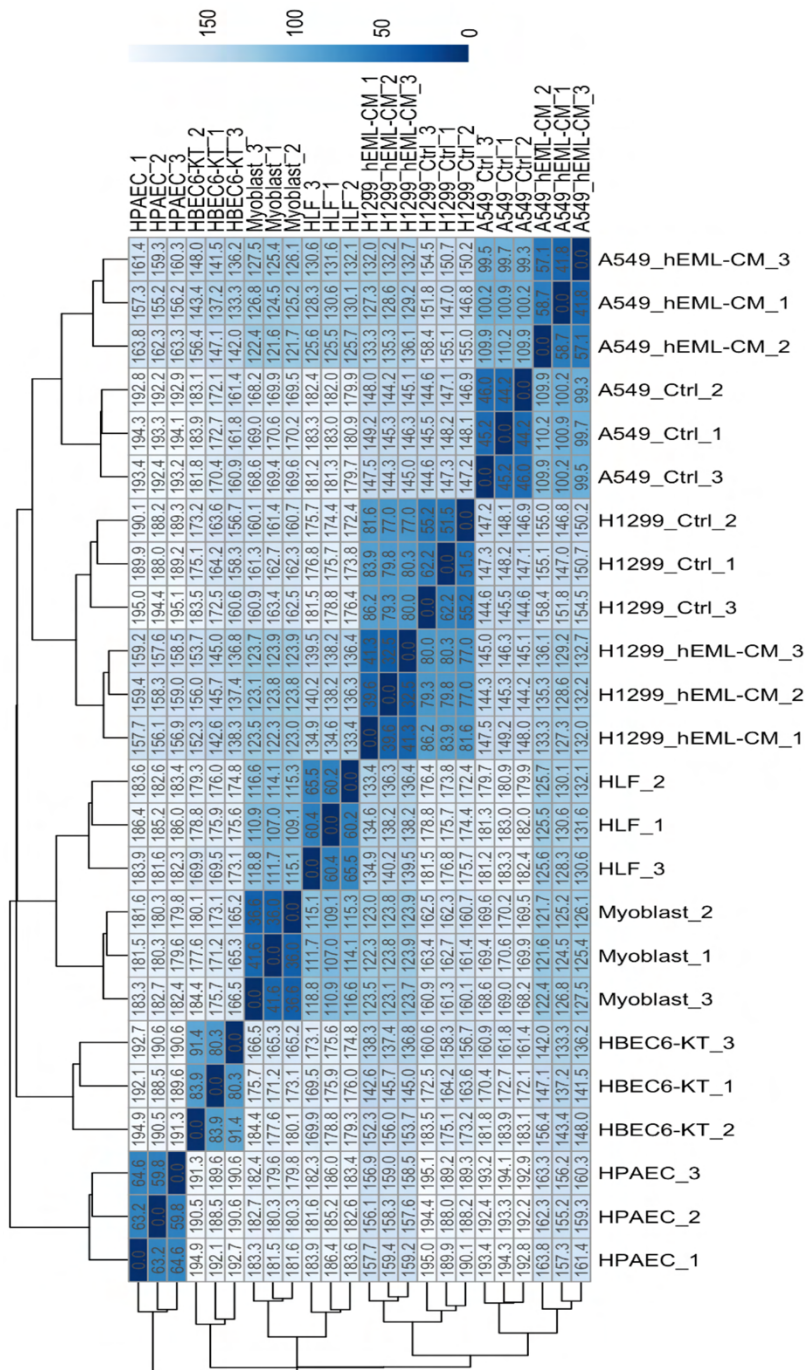


Figura 40. Matriu de distàncies completa. La matriu completa va mostrar gràcies als valors obtinguts i als colors del *heatmap* que, després de la seva pròpia línia origen, a qui més s'assemblen les cèl·lules en hEML-CM és al grup mesenquimal. De cada grup es van utilitzar tres rèpliques.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

La finalitat d'aquesta tesi doctoral ha estat comprovar si el medi embrionari que regula la organogènesis pulmonar, també pot actuar controlant el fenotip maligne de les cèl·lules de càncer de pulmó. Amb aquesta intenció es van cultivar dues línies cel·lulars de CPCNP, A549 i H1299, en un medi embrionari (hEML-CM) i en un medi control (T-CM). El que es va poder veure va ser que tant les cèl·lules A549 com les H1299 cultivades en hEML-CM adquirien característiques morfològiques i moleculars de cèl·lules mesenquimals, i que perdien capacitats funcionals de fenotip maligne. A més, mitjançant els anàlisis immunohistoquímic, transcriptòmic i *in vivo* es va observar que les cèl·lules pulmonars tumorals en contacte en un medi pulmonar embrionari, adquirien un genotip miofibroblàstic, reduïen el seu creixement en animals d'experimentació, i van permetre la identificació de fins a 1.182 en A549 i 866 en H1299 DEG. Els resultats obtinguts, que es discuteixen seguidament, estan en concordança amb els treballs del patòleg Gordon Barry Pierce que suggeria que els mateixos mecanismes que controlen la embriogènesis podrien controlar el creixement tumorals (35).

Una primer qüestió a analitzar és la naturalesa i la importància del medi de cultiu embrionari condicionat que es va utilitzar en el treball. Tenint en compte les característiques típiques, àmpliament descrites, de les cèl·lules mesenquimals, com són la morfologia allargada, l'alta expressió de VIM (un marcador característic de mesènquima), l'absència de e-caderina (un marcador de cèl·lules epitelials), i la presència de TGF- β 1 en el medi de cultiu condicionat; va confirmar que les cèl·lules aïllades del pulmó embrionari humà eren cèl·lules mesenquimals (307, 308). Amb aquest resultat, es va poder constatar que el hEML-CM utilitzat en els experiments del treball, provenia del metabolisme de les cèl·lules mesenquimals del pulmó embrionari humà i, per tant, les cèl·lules tumorals cultivades amb aquest medi van ser exposades a factors pulmonars embrionaris. Això correlaciona amb el fet que durant el desenvolupament embrionari, i per una correcta diferenciació cel·lular, són

Discussió

essencials les interaccions entre les cèl·lules mesenquimals i les epitelials (99, 100).

En aquest estudi, es va observar com les cèl·lules A549 i H1299 cultivades en hEML-CM van patir un canvi morfològic acusat a les 24 hores d'estar en contacte amb aquest medi. Per un costat les cèl·lules A549 van presentar una morfologia molt allargada en forma d'espiga o d'estrella, fet que es va relacionar estretament amb que es van trobar 20 DEG del top 100 involucrats en l'organització del citoesquelet. Per l'altre banda, les cèl·lules H1299 no destacaven tant pel seu canvi morfològic, tot i que també es va poder veure un cert allargament cel·lular, sinó que ho van fer per una pèrdua significativa de la seva característica manera de créixer formant petites colònies i creixent d'una forma més individualitzada; aquest resultat es va reforçar al fer l'estudi funcional i veure la disminució de la capacitat de generar colònies en 2D i 3D d'aquestes cèl·lules. D'una manera o una altre, ambdues línies tumorals cultivades en hEML-CM van perdre la seva morfologia epitelial, van deixar de contenir cossos lamel·lars al seu citoplasma i van adquirir característiques de les cèl·lules mesodèrmiques, inclosa l'alta expressió de VIM i α -SMA, marcadors distintius dels miofibroblasts (307, 308).

Un fet a tenir en compte va ser que el canvi morfològic es produïa independentment de si el hEML-CM provenia de cèl·lules mesenquimals pulmonars de la setmana 9, 10 o 11. Aquesta prova va ser realitzada degut a que, tot i ser setmanes incloses en l'estadi pseudoglandular del desenvolupament del pulmó (53), certs estudis han demostrat que són setmanes crítiques per l'embrió on es duen a terme esdeveniments claus en el desenvolupament i que es poden trobar diferències significatives tot i ser setmanes tant pròximes (42). Pel que es va poder observar en els resultats, aquestes setmanes són indiferents per a produir un condicionament efectiu de les cèl·lules d'adenocarcinoma pulmonar; per tant, es va considerar que els factors implicats en aquest procés actuaven durant tota la fase pseudoglandular que és crítica per la correcta diferenciació pulmonar.

Adicionalment, es va voler analitzar la implicació dels exosomes en el canvi morfològic. Els exosomes són un tipus de vesícules extracel·lulars esfèriques d'entre 30nm i 150nm formades per una bicapa lipídica (309). A l'inici de ser descoberts, es pensava que tenien un paper en l'eliminació de residus cel·lulars, però finalment es va demostrar que formaven part d'un mecanisme de comunicació cel·lular implicat en processos fisiològics o patològics (310, 311). Aquest fet que es va confirmar al veure que el seu contingut no era aleatori, es a dir, un equivalent al contingut cel·lular; sinó que la cèl·lula escull que compartimenta en aquestes vesícules. Estudis que han estudiat el contingut dels exosomes han demostrat que serveixen per transportar molècules com per exemple proteïnes, lípids i àcids nucleics (312). Al poder ser secretats per tots els tipus cel·lulars i ser localitzables en la majoria de biofluids (313-316), era una possibilitat que estiguessin dispersos pel hEML-CM i que fossin els encarregats de transportar els factors que produïen el canvi morfològic. Tot i així, al seguir produint-se el canvi un cop eliminats els exosomes del medi per ultracentrifugació, es va demostrar que no estaven implicats en el fenomen que s'estava produint. Contràriament al que s'ha detectat en aquesta tesi, altres autors indiquen en els seus estudis que s'ha pogut observar com els exosomes transportaven factors implicats en la diferenciació cel·lular (317, 318).

No obstant això, en els últims anys s'ha estat comprovant que els exosomes possiblement tenen una funció més orientada a la preparació del nínxol pre-metastàtic (NPM) i no tant en els processos de gènesis tumoral (319). En aquesta direcció, s'ha demostrat que els exosomes derivats del càncer de mama i portadors de les integrines $\alpha_v\beta_5$ són específicament captats per les cèl·lules de Kupffer del fetge facilitant la preparació del NPM per les metàstasis hepàtiques; mentre que els exosomes portadors de les integrines $\alpha_6\beta_4$ i $\alpha_6\beta_1$ són captats pels fibroblasts i les cèl·lules epitelials pulmonars que actuaran preparant el NPM per les metàstasis pulmonars. Van veure també, que la inhibició de les integrines $\alpha_6\beta_4$ i $\alpha_v\beta_5$ suposava una reducció de la captació dels exosomes i de les metàstasis hepàtiques i pulmonars (320). Complementant

Discussió

aquest estudi, uns altres investigadors van comprovar que els miARNs que transporten els exosomes tenen un paper important en la preparació el NPM per l'ancoratge i creixement metastàtic de les cèl·lules tumorals. En aquesta direcció s'ha demostrat que la sobreexpressió del miR-122 en el càncer de mama promou les metàstasis cerebrals i pulmonar a través de la reprogramació del metabolisme de la glucosa en el NPM (321). També s'ha observat que els exosomes portadors del clúster miR-23b-27b-24 promouen les metàstasis pulmonars per la inhibició d'un gen supressor tumoral que té una funció lisosòmica en l'espai extracel·lular (322). Totes aquestes observacions donarien suport a la idea de que els exosomes podrien tenir una funció més dirigida a preparar el NPM que no pas per diferenciar les cèl·lules; fet que podria explicar perquè en el present treball es comprova que no hi ha diferències morfològiques ni moleculars quan es cultiven les cèl·lules tumorals en el hEML-CM amb o lliure d'exosomes. Aquesta observació permet proposar que els exosomes no tenen un paper fonamental en la pèrdua del fenotip maligne ni en la diferenciació de les cèl·lules A549 i H1299.

Respecte al canvi morfològic comentat, estudis anteriors havien informat que cultivar cèl·lules amb la presència o l'absència de FBS comportava un impacte diferencialment substancial en el fenotip cel·lular, concretament de les cèl·lules A549 i de les cèl·lules mare embrionàries de ratolí (323). A més, les cèl·lules cultivades en un medi sense FBS adquirien característiques de pneumòcits tipus II, inclosa la presència de cossos lamel·lars al citoplasma (324-327). Per aquest mateix motiu es va crear el T-CM, per a tenir un medi control que hagués estat en contacte previ amb cèl·lules que no poguessin aportar al medi cap factor extra, però que servissin per veure si el desgast de nutrients en el medi era el veritable causant del canvi morfològic o no. Addicionalment, les cèl·lules cultivades amb el medi embrionari adquirien característiques molt diferents a les de pneumòcits tipus II, i per SEM i TEM mostraven l'absència de cossos lamel·lars i si la presència de cèl·lules en forma d'espiga amb estructures filamentoses en el seu interior, un reticle endoplasmàtic dilatat i plegat suggestiu d'una morfologia mesodèrmica; per

contra en el medi control, les cèl·lules mantenien la seva estructura epitelial original amb presència citoplasmàtica de cossos lamel·lars. Per acabar de confirmar, es van realitzar una sèrie de gradients de dilucions del medi hEML-CM, on els resultats van constatar que el canvi morfològic era degut als factors continguts en el hEML-CM aportats per les cèl·lules mesenquimals embrionàries.

Durant l'etapa pseudoglandular del desenvolupament embrionari del pulmó, les cèl·lules del mesènquima alliberen TGF- β 1, que seguidament es localitza en les àrees que envolten les cèl·lules epitelials distals. Allà s'unirà als seus receptors de membrana, que per mitjà d'una cascada de fosforilacions, activaran la via de SMAD. Aleshores s'activaran els factors de transcripció que seran essencials per la correcta ramificació de l'arbre respiratori i l'alveolització (328, 329). En l'estudi que conforma aquesta tesi, es van detectar concentracions significativament més altes de TGF- β 1 en el hEML-CM respecte el T-CM, fet que podria explicar perquè les cèl·lules condicionades van adquirir les característiques morfològiques de cèl·lules mesodèrmiques diferenciades i van augmentar els seus nivells de VIM i α -SMA. Seguint aquest plantejament, amb l'experiment de neutralització del TGF- β 1 en el hEML-CM, que va mostrar que no es produïen els mateixos grans canvis que quan no es neutralitzava, es va reforçar la possible explicació de que el TGF- β 1 sigui potencialment un dels causants de l'adquisició del fenotip mesodèrmic diferenciat. Altres estudis relacionats amb el TGF- β 1, demostren que té la capacitat d'induir l'expressió tant de VIM com de α -SMA en miofibroblasts (307, 308); que com ja s'ha comentat en aquesta discussió són dos marcadors que es van trobar sobreexpressats en les cèl·lules cultivades en hEML-CM.

Contràriament, en els teixits adults, TGF- β 1 indueix la EMT que deriva en el desenvolupament i progressió tumoral (328, 330). Estudis *in vitro* han demostrat que a l'afegir TGF- β 1 en un medi de cultiu, les subpoblacions de cèl·lules A549 comencen un procés de EMT i les cèl·lules amb un fenotip

Discussió

maligne experimenten canvis morfològics augmentant el seu creixement i augmentant els nivells de marcadors de pluripotència, com OCT-3/4 (325). Aquests últims estudis podrien estar en conflicte amb els resultats que es van obtenir en aquest estudi. No obstant això, com es discutirà més endavant, l'alta expressió de TGF- β 1 dels resultats presentats va acompanyada d'una reducció del creixement tumoral i dels factors de pluripotència, fet que no es dóna en l'estudi anteriorment comentat. Tot i així, és evident que altres factors, a més del TGF- β 1, estan implicats en aquest procés de diferenciació cel·lular.

Per la part de l'anàlisi funcional de les cèl·lules condicionades, les cèl·lules A549 i H1299 cultivades en hEML-CM van patir una disminució significativa en la capacitat de proliferació, de migració, de generar colònies en 2D i 3D, i de generar tumors *in vivo*. A més, les cèl·lules tractades també van mostrar una disminució significativa general dels gens *OSKM*, fet que es relaciona amb una pèrdua de pluripotència per part de les cèl·lules en hEML-CM. Reforçant aquests resultats, el perfil transcriptòmic va mostrar un enriquiment de termes GO relacionats amb el cicle cel·lular, la diferenciació epitelial i el desenvolupament de teixits en A549, i amb la proliferació en H1299. Aquests descobriments van portar a suggerir un altre cop que el TGF- β 1 no seria l'únic factor implicat en el control del fenotip dels diferents clons presents de les línies cel·lulars A549 i H1299. Relacionat amb la davallada en l'expressió dels gens *OSKM*, es va observar una regulació positiva de DNMT3A i DNMT3B a les cèl·lules cultivades a hEML-CM. Això suggereix que el medi embrionari pot contenir un mecanisme de control epigenètic pel qual la regulació de DNMT3A/3B podria silenciar els gens responsables de la pluripotència i activar la diferenciació cel·lular. Aquesta hipòtesi està confirmada per estudis anteriors que demostren que DNMT3A/3B cooperen en la metilació del promotor d'*OCT-3/4* i *NANOG* durant la diferenciació de cèl·lules mare embrionàries i cèl·lules de carcinoma (331). Un estudi més extens del patró de metilació de les cèl·lules condicionades podria aportar informació valuosa

sobre el poder epigenètic que té el hEML-CM i la possibilitat de detectar gens diana per a possibles teràpies.

Un altre factor implicat en tot l'exposat en aquesta tesi doctoral va ser el TF NKX2-1, el qual és essencial pel correcte desenvolupament del pulmó durant la embriogènesi. Es troba en les cèl·lules epitelials de les unitats respiratòries terminals (332), i en el teixit pulmonar normal i tumoral és l'encarregat d'activar diversos gens i vies que tenen implicació en la fisiologia del pulmó, com per exemple activant la síntesi de SFTPs (333). Més centrat en el seu paper en la tumorigènesi, NKX2-1 es troba expressat en el 70% dels adenocarcinomes pulmonars, i s'ha vist que té les funcions d'oncogen o de supressor de tumors (250, 334). Les cèl·lules A549, que es solen associar amb adenocarcinoma pulmonar, expressen SFTPs per mitjà de NKX2-1, ja que tenen característiques molt semblants als pneumòcits tipus II. Tanmateix, encara hi ha controvèrsia sobre la presència de NKX2-1 en les cèl·lules A549. Certs estudis no han detectat nivells de NKX2-1 a les cèl·lules A549 (335, 336), mentre que altres han pogut detectar la proteïna TTF-1 per immunohistoquímica (337) o una alta expressió d'ARNm de NKX2-1 per qRT-PCR (326, 338). Aquesta sèrie de troballes contradictòries entre elles poden ser degudes a la presència de diversos clons a la línia cel·lular A549, cadascun d'ells amb diferents graus de diferenciació i diferents respostes als estímuls externs (325, 326).

Si relacionem el NKX2-1 amb el ja presentat TGF- β 1, en altres estudis s'ha vist que nivells elevats de TGF- β 1 inhibeixen la síntesi de SFTPs mitjançant la interacció de SMAD3 amb NKX2-1 (339, 340). Per part de l'experimentació d'aquesta tesi, es va observar un nivell d'expressió alt de NKX2-1 a les cèl·lules A549 i H1299 cultivades en T-CM, mentre que l'expressió de NKX2-1 es va veure significativament reduïda quan es van cultivar en hEML-CM, el qual ja s'ha comentat que esta més enriquit en TGF- β 1. Aquest resultat podria implicar que les cèl·lules van perdre característiques d'adenocarcinoma pulmonar al ser condicionades. Addicionalment, en els experiments realitzats

Discussió

es va observar una disminució dels nivells de SFTPs per dues vies diferents: En l'expressió d'ARNm, que baixava l'expressió en les cèl·lules en hEML-CM; i en l'assaig amb l'*Oil Red O Solution*, que només havia tinció en el citoplasma de les cèl·lules A549 i H1299 que no van patir el canvi morfològic. Estretament lligat als resultats de l'*Oil Red O Solution*, destacar que vies que regulen el metabolisme dels lípids era un dels termes destacadament alterats en l'anàlisi d'enriquiment de termes GO de les cèl·lules A549. Si unim els coneixements d'estudis previs als resultats que es van obtenir (alts valors de TGF- β 1 al hEML-CM, nivells baixos de NKX2-1 a les cèl·lules en contacte amb aquest medi, i una baixa expressió i tinció de SFTPB a les cèl·lules A549 i de SFTPD a les cèl·lules H1299), es pot especular que la presència de TGF- β 1 va ser un factor determinant de la inhibició de SFTPB i SFTPD tenint com a intermediari NKX2-1, i reafirma un cop més que esta implicat en la transformació cel·lular que es va observar.

Diversos estudis han demostrat també que TGF- β 1 esta implicat en l'activació de gens relacionats en la diferenciació dels fibroblasts pulmonars en miofibroblasts (328, 341, 342). Com s'ha comentat anteriorment, els miofibroblasts expressen VIM i α -SMA, però també expressen diverses proteïnes MYHs (307, 343, 344). Per aquest motiu, un cop es va haver observat que les cèl·lules A549 i H1299 cultivades en hEML-CM eren positives en tinció per a VIM i α -SMA, es va analitzar l'expressió de diverses MYHs per immunofluorescència i qRT-PCR. Les cèl·lules van mostrar únicament expressió de la MYH4, la qual és expressada en humans després del naixement però no en embrions. Tanmateix, es probable que el que es va detectar fos en el fons MYH8, que només s'expressa en els músculs embrionaris, en lloc de MYH4. Aquest fet podria ser possible degut a que el 90% de la seqüència genètica d'ambdues isoformes és la mateixa (344, 345).

D'acord amb aquests resultats, es va observar que el perfil transcriptòmic de les cèl·lules en hEML-CM tendia a separar-se de la zona epitelial i s'acostava als mioblasts i als fibroblasts pulmonars. Tots aquests resultats

semblen indicar que les cèl·lules d'adenocarcinoma pulmonar A549 i H1299 cultivades en un medi pulmonar embrionari comencen a diferenciar-se en miofibroblasts. La funció dels miofibroblasts s'ha vist que depèn dels estímuls del microambient que reben. En el pulmó adult, s'han associat a diverses patologies (346) i s'han proposat com a marcadors de bon pronòstic (347) o de mal pronòstic (348) en el càncer de pulmó. En relació a aquesta línia, un estudi recent sobre l'adenocarcinoma ductal pancreàtic humà ha demostrat que l'expressió de α -SMA en miofibroblasts s'associa amb un bon pronòstic, mentre que la seva baixa expressió està relacionada amb un pitjor pronòstic (349). A més, els miofibroblasts que expressen α -SMA i diverses isoformes de MYHs durant l'etapa pseudoglandular i l'etapa canalicular del desenvolupament del pulmó embrionari, són essencials pel bon desenvolupament del sistema alveolar (350-352).

Quant s'han analitzat els animals d'experimentació injectats amb les cèl·lules tumorals, es va poder comprovar que hi havia diferències de creixement en relació a si havien estat tractades amb el hEML-CM o amb el T-CM. Com era d'esperar hi havia més volum i creixement tumoral en les cèl·lules A549 en medi control respecte a les cultivades en medi embrionari. Per contra, l'anàlisi histològic va mostrar en ambdós tumors un patró d'adenocarcinoma. Tot i així, el tumor obtingut de les cèl·lules A549 en medi embrionari, mostraven un cert teixit d'encapsulament que envoltava les cèl·lules d'adenocarcinoma. En tot cas, va ser evident que els factors del hEML-CM no eren suficients per controlar la totalitat de les cèl·lules tumorals.

Actualment, les teràpies en CP i tumors sòlids es centren generalment en induir l'apoptosi de les cèl·lules tumorals que tenen alta capacitat proliferativa. Tot i així, això comporta riscos com són l'adquisició de resistència al tractament i la toxicitat a les cèl·lules normals. Degut a això, s'estan intentant trobar noves estratègies terapèutiques que puguin evitar aquests handicaps associats al tractament del CP. Una d'elles està basada en la idea

Discussió

de reduir l'autoreplicació de les cèl·lules canceroses de pulmó diferenciant-les mitjançant factors embrionaris secretats durant el desenvolupament del pulmó. Un exemple del paradigma de les teràpies de diferenciació, que ja s'està duent a terme és en el cas de la leucèmia promielocítica, és l'ús de l'àcid retinoic, un factor important durant el desenvolupament embrionari (353). Per contra, també s'han intentat teràpies de diferenciació en altres tumors sense resultats clínics rellevants (354).

És interessant destacar que s'ha observat un possible efecte organotròpic en el control de les cèl·lules tumorals, ja que quan es van cultivar cèl·lules de càncer colorectal en el hEML-CM no es van observar canvis morfològics. Aquest fet dona lloc a suggerir la possibilitat de que els factors alliberats per les cèl·lules mesenquimals embrionàries pulmonars només tinguin efecte sobre el teixit pulmonar. Aquesta observació reforçaria els resultats d'estudis previs on es proposava que el control de la tumorigènesis podria ser depenent de l'òrgan on es desenvolupava el tumor (32-34). De ser així, permetria especular amb noves estratègies terapèutiques basades en els mecanismes moleculars característics de cada òrgan, com ja s'ha fet de forma similar en el càncer de mama i en el melanoma (36, 37, 41).

En aquesta tesi s'està intentant donar un enfoc analític diferent: L'anàlisi de factors embrionaris d'un mateix òrgan per identificar noves molècules amb potencial ús de tractament. En resum, es va observar que la transdiferenciació de línies cel·lulars de CP utilitzant un medi embrionari a partir de cèl·lules pulmonars mesenquimals embrionàries, va reduir significativament les seves capacitats malignes tant *in vitro* com *in vivo*, i va produir una alteració molecular on va destacar una reducció de la pluripotència que es va veure reflectida en un intent de diferenciació cap a miofibroblasts (**Figura 41**). Com ja s'ha anat comentant al llarg d'aquesta discussió, les dades mostrades serveixen de base per a futurs estudis que complementaran i ampliaran el present treball.

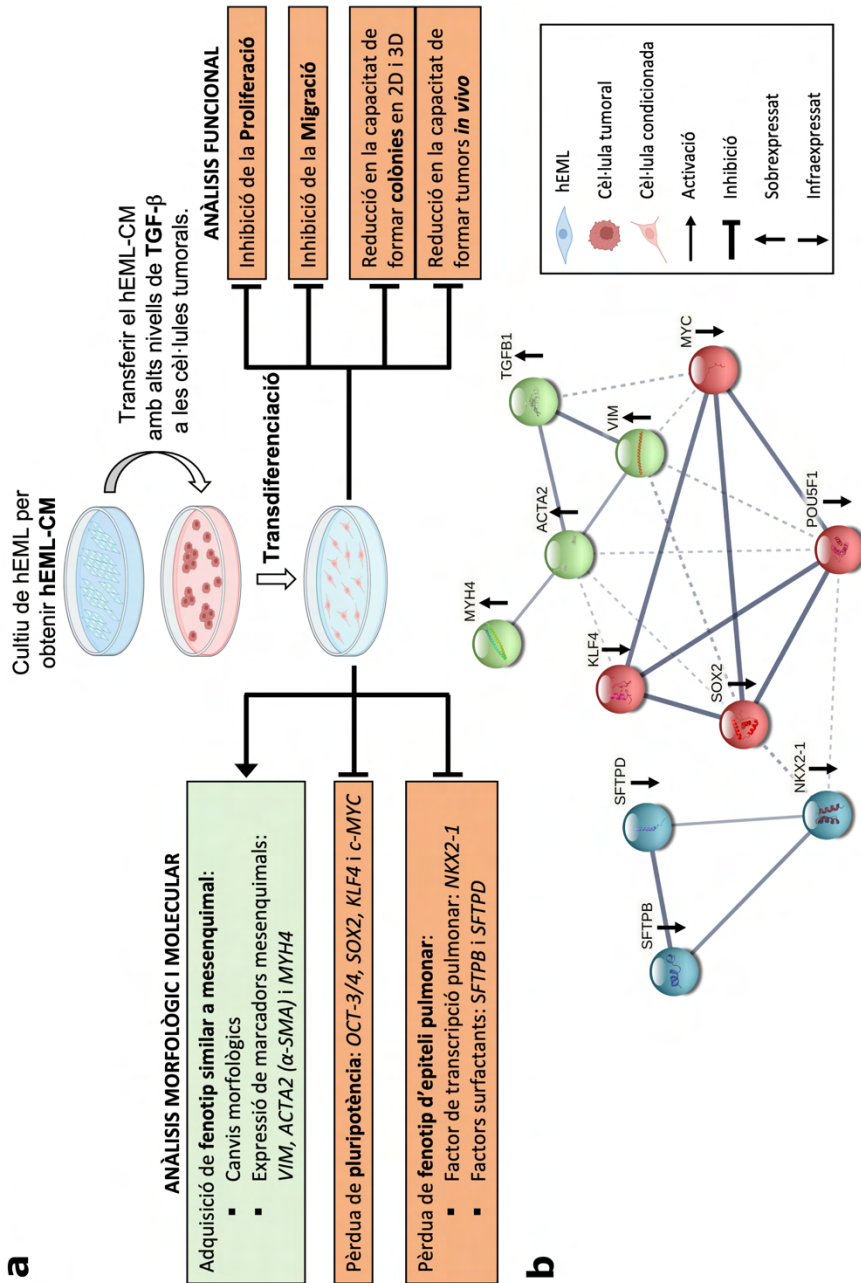


Figura 41. Resum de tot l'observat en els resultats obtinguts dels experiments d'aquesta tesi doctoral. (a) Esquema de les troballes més significatives que es van descobrir al condicionar les cèl·lules d'adenocarcinoma pulmonar amb hEML-CM. **(b)** Anàlisi *string* (<https://string-db.org>) que va mostrar la relació entre els gens investigats. Els colors de les esferes es basen en el resultat de l'anàlisi per part de l'aplicació.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. El medi de cultiu condicionat embrionari pulmonar procedent de les cèl·lules mesenquimals de pulmó embrionari humà (hEML-CM) conté nivells superiors de TGF- β 1 respecte al medi de cultiu procedent de les cèl·lules tumorals A549 i H1299.
2. Les cèl·lules tumorals A549 i H1299 quan són cultivades amb el medi condicionat embrionari pulmonar (hEML-CM) canvien el seu fenotip epitelial i adquireixen característiques morfològiques de cèl·lules mesodèrmiques per la presència de VIM, α -SMA i fibronexus.
3. Els canvis morfològics de les cèl·lules A549 i H1299 són dependents de la concentració de factors embrionaris en el medi de cultiu, com TGF- β 1, i són independents de la presència o absència d'exosomes.
4. Les cèl·lules tumorals A549 i H1299 quan són cultivades en el medi condicionat embrionari pulmonar (hEML-CM) disminueixen les seves característiques de malignitat al reduir significativament les seves capacitats funcionals tumorals; degut a una reducció significativa dels gens de pluripotència *OSKM* i dels marcadors tumorals *NKX2-1* i *SFTPs*.
5. L'alta expressió significativa de *DNMTs* en les cèl·lules tumorals cultivades en el medi condicionat embrionari pulmonar (hEML-CM) suggereix un control epigenètic en la reducció de les característiques tumorals.
6. Els anàlisis transcriptòmic i bioinformàtic mostren que les cèl·lules tumorals cultivades en el medi condicionat embrionari pulmonar (hEML-CM) adquireixen característiques mesenquimals.

Conclusions

7. Les cèl·lules tumorals cultivades en el medi condicionat embrionari pulmonar (hEML-CM) es diferencien en cèl·lules de característiques miofibroblàstiques a l'expressar alts nivells de *MYH4*.
8. L'estudi dels factors embrionaris organotròpics pot ser d'utilitat pel control de la carcinogènesi.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Peyrilhe B. Dissertation académique sur le cancer: Chez Recault; 1776.
2. Müller J. Über den feineren Bau und die Formen der krankhaften Geschwülste. Reimer, Berlin. 1838.
3. Bruch CWL. Die Diagnose der bösartigen Geschwülste: Victor V. Zabern; 1847.
4. Hannover A. Den pathologiske Anatomies Svar pan Sporgsmaalet: Hvad en Cancer? Kjobenhavn: Schultz. 1843.
5. Remak R. Ueber extracellulare Entstehung thierischer Zellen und über Vermehrung derselben durch Theilung. Arch Anat Physiol. 1852;1852:47-57.
6. Virchow R. Die krankhaften Geschwülste: dreissig Vorlesungen, gehalten während des Wintersemesters 1862-1863 an der Universität zu Berlin: Hirschwald; 1865.
7. Paget J. Lectures on surgical pathology: Delivered at the Royal College of Surgeons of England: Lindsay & Blakiston; 1865.
8. Simon J. An address on some points of science and practice concerning cancer. British medical journal. 1878;1(894):219.
9. Cohnheim J. Congenitales, quergestreiftes muskelsarkom der nieren. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin. 1875;65(1):64-9.
10. Durante F. Nesso fisio-pathologico tra la struttura dei nei materni e la genesi di alcuni tumori maligni. Arch Memor Observ Chir Pract. 1874;11:217-26.

Bibliografia

11. Falk KG, Noyes HM, Sugiura K. Studies on enzyme action: XXXIII. Lipase Actions of Extracts of the Whole Rat at Different Ages. *The Journal of general physiology*. 1925;8(2):75-88.
12. Edlbacher S, Merz K. Über den Stoffwechsel der Tumoren. I. Mitteilung. 1927.
13. Warburg O, Posener K, Negelein E. Über den stoffwechsel der carcinomzelle. *Naturwissenschaften*. 1924;12(50):1131-7.
14. Duran i Reynals F. Introduccio a l'estudi del cancer. *Monografies Mèdiques*. 1929.
15. Bierich R, Rosenbohm A. Lactic acid content of normal and cancerous tissue. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie*. 1933;214:271-80.
16. Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *The Journal of experimental medicine*. 1911;13(4):397.
17. Dolberg DS, Bissell MJ. Inability of Rous sarcoma virus to cause sarcomas in the avian embryo. *Nature*. 1984;309(5968):552-6.
18. Murphy JB, Rous P. The behavior of chicken sarcoma implanted in the developing embryo. *The Journal of experimental medicine*. 1912;15(2):119-32.
19. Milford JJ, Duran-Reynals F. Growth of a chicken sarcoma virus in the chick embryo in the absence of neoplasia. *Cancer Research*. 1943;3(9):578-84.
20. Stevens Jr LC, Little CC. Spontaneous testicular teratomas in an inbred strain of mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1954;40(11):1080.

21. Stevens LC. Experimental production of testicular teratomas in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1964;52(3):654.
22. Stevens LC. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre-and postimplantation mouse embryos. *Developmental biology*. 1970;21(3):364-82.
23. Solter D, Škreb N, DAMJANOV I. Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. *Nature*. 1970;227(5257):503-4.
24. Monzo M, Andres X, Ruano-Gil D. Morphological study of a homogenous population of teratocarcinoma cells. *Bulletin de l'Association des anatomistes*. 1983;67(198):315-23.
25. Kannagi R, Cochran NA, Ishigami F, Hakomori S-i, Andrews P, Knowles BB, et al. Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and-4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *The EMBO journal*. 1983;2(12):2355-61.
26. Monzo M, Barnadas A, de Anta JM, Ruano D. Laminin and fibronectin expression during in vivo growth of embryoid bodies derived from teratocarcinoma. *Virchows Archiv A*. 1991;418(6):509-14.
27. Mintz B, Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975;72(9):3585-9.
28. Illmensee K, Mintz B. Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1976;73(2):549-53.

Bibliografia

29. Pierce GB, Pantazis CG, Caldwell JE, Wells RS. Specificity of the control of tumor formation by the blastocyst. *Cancer Research*. 1982;42(3):1082-7.
30. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981;78(12):7634-8.
31. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *nature*. 1981;292(5819):154-6.
32. Gootwine E, Webb CG, Sachs L. Participation of myeloid leukaemic cells injected into embryos in haematopoietic differentiation in adult mice. *Nature*. 1982;299(5878):63-5.
33. Podesta AH, Mullins J, Pierce GB, Wells RS. The neurula stage mouse embryo in control of neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984;81(23):7608-11.
34. Monzo M, De Anta J, Peris B, Ruano D. Growth control of embryonic stem cells injected into mouse uterus on fifth day of pregnancy. *International journal of cancer*. 1994;56(3):387-92.
35. Pierce G. The cancer cell and its control by the embryo. Rous-Whipple Award lecture. *The American journal of pathology*. 1983;113(1):117.
36. Postovit L-M, Margaryan NV, Seftor EA, Kirschmann DA, Lipavsky A, Wheaton WW, et al. Human embryonic stem cell microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(11):4329-34.
37. He N, Feng G, Li Y, Xu Y, Xie X, Wang H, et al. Embryonic stem cell preconditioned microenvironment suppresses tumorigenic properties in breast cancer. *Stem Cell Research & Therapy*. 2016;7(1):1-13.

38. Lee LM, Seftor EA, Bonde G, Cornell RA, Hendrix MJ. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2005;233(4):1560-70.
39. Kulesa PM, Kasemeier-Kulesa JC, Teddy JM, Margaryan NV, Seftor EA, Seftor RE, et al. Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(10):3752-7.
40. Postovit LM, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ. A three-dimensional model to study the epigenetic effects induced by the microenvironment of human embryonic stem cells. *Stem cells*. 2006;24(3):501-5.
41. Topczewska JM, Postovit L-M, Margaryan NV, Sam A, Hess AR, Wheaton WW, et al. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nature medicine*. 2006;12(8):925-32.
42. Monzo M, Navarro A, Bandres E, Artells R, Moreno I, Gel B, et al. Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. *Cell research*. 2008;18(8):823-33.
43. Navarro A, Tejero R, Viñolas N, Cordeiro A, Marrades RM, Fuster D, et al. The significance of PIWI family expression in human lung embryogenesis and non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2015;6(31):31544.
44. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*. 2006;126(4):663-76.

Bibliografía

45. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell*. 2007;131(5):861-72.
46. Wuputra K, Ku C-C, Wu D-C, Lin Y-C, Saito S, Yokoyama KK. Prevention of tumor risk associated with the reprogramming of human pluripotent stem cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2020;39:1-24.
47. Storey WF, Staub NC. Ventilation of terminal air units. *Journal of Applied Physiology*. 1962;17(3):391-7.
48. Tyler WS. Comparative subgross anatomy of lungs: Pleuras, interlobular septa, and distal airways. *American Review of Respiratory Disease*. 1983;128(2P2):S32-S6.
49. Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respiration physiology*. 1978;32(2):121-40.
50. Hislop A, Reid L. Intra-pulmonary arterial development during fetal life-branching pattern and structure. *Journal of Anatomy*. 1972;113(Pt 1):35.
51. Clements JA. Surface tension of lung extracts. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1957;95(1):170-2.
52. Sano H, Kuroki Y. The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity. *Molecular immunology*. 2005;42(3):279-87.
53. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *Embriología clínica*: Elsevier; 2020.
54. Schittny J, Burri PH. *Morphogenesis of the mammalian lung: aspects of structure and extracellular matrix components*. 2004.

55. Sadler T. Langman's medical embryology. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1988;81(1):131.
56. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. *Larsen's human embryology* E-book: Elsevier; 2020.
57. Djonov V, Burri P. *Vascular development: vasculogenesis and angiogenesis. Microvascular research: biology and pathology* Elsevier, Philadelphia. 2006:91-6.
58. Wilson S, Olver R, Walters D. *Developmental regulation of luminal lung fluid and electrolyte transport. Respiratory physiology & neurobiology*. 2007;159(3):247-55.
59. Helve O, Pitkänen O, Janér C, Andersson S. *Pulmonary fluid balance in the human newborn infant. Neonatology*. 2009;95(4):347-52.
60. Burri PH. *Postnatal growth and maturation of the lung. Chest*. 1975;67(2 Suppl):2S-3S.
61. Gleason CA, Juul SE. *Avery's diseases of the newborn e-book: Elsevier Health Sciences*; 2017.
62. Jeffery PK. *The development of large and small airways. American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;157(5):S174-S80.
63. Schittny JC, Miserocchi G, Sparrow MP. *Spontaneous peristaltic airway contractions propel lung liquid through the bronchial tree of intact and fetal lung explants. American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2000;23(1):11-8.
64. Hislop A, Reid L. *Pulmonary arterial development during childhood: branching pattern and structure. Thorax*. 1973;28(2):129-35.

Bibliografia

65. Hislop AA. Airway and blood vessel interaction during lung development. *Journal of anatomy*. 2002;201(4):325-34.
66. Boyden EA. The structure of the pulmonary acinus in a child of six years and eight months. *American Journal of Anatomy*. 1971;132(3):275-99.
67. Kitaoka H, Burri PH, Weibel ER. Development of the human fetal airway tree: analysis of the numerical density of airway endtips. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. 1996;244(2):207-13.
68. Khor A, Stahlman MT, Gray ME, Whitsett J. Temporal-spatial distribution of SP-B and SP-C proteins and mRNAs in developing respiratory epithelium of human lung. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1994;42(9):1187-99.
69. Herriges M, Morrisey EE. Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development*. 2014;141(3):502-13.
70. Rogelj S, Klagsbrun M, Atzmon R, Kurokawa M, Haimovitz A, Fuks Z, et al. Basic fibroblast growth factor is an extracellular matrix component required for supporting the proliferation of vascular endothelial cells and the differentiation of PC12 cells. *The Journal of cell biology*. 1989;109(2):823-31.
71. Woods JC, Schittny JC. Lung structure at preterm and term birth. *Fetal lung development-clinical correlates & future technologies* Cambridge University Press, New York. 2016:126-40.
72. Schittny JC. Development of the lung. *Cell and tissue research*. 2017;367(3):427-44.
73. Williams MC. Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. *Annual review of physiology*. 2003;65(1):669-95.

74. Yang J, Hernandez BJ, Alanis DM, del Pilar ON, Vila-Ellis L, Akiyama H, et al. The development and plasticity of alveolar type 1 cells. *Development*. 2016;143(1):54-65.
75. Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respiratory research*. 2001;2(1):1-20.
76. Mercurio AR, Rhodin JA. An electron microscopic study on the type I pneumocyte in the cat: differentiation. *American Journal of Anatomy*. 1976;146(3):255-71.
77. Bachofen M, Weibel ER. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *American Review of Respiratory Disease*. 1977;116(4):589-615.
78. Nolen-Walston RD, Kim CF, Mazan MR, Ingenito EP, Gruntman AM, Tsai L, et al. Cellular kinetics and modeling of bronchioalveolar stem cell response during lung regeneration. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008;294(6):L1158-L65.
79. Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE. Diseases of pulmonary surfactant homeostasis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2015;10:371-93.
80. Mendelson CR. Role of transcription factors in fetal lung development and surfactant protein gene expression. *Annual review of physiology*. 2000;62(1):875-915.
81. Pryhuber GS, Hull WM, Fink I, McMahan MJ, Whitsett JA. Ontogeny of surfactant proteins A and B in human amniotic fluid as indices of fetal lung maturity. *Pediatric Research*. 1991;30(6):597-605.
82. Conkright JJ, Bridges JP, Na C-L, Voorhout WF, Trapnell B, Glasser SW, et al. Secretion of surfactant protein C, an integral membrane protein,

Bibliografia

requires the N-terminal propeptide. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(18):14658-64.

83. Guttentag S, editor *Posttranslational regulation of surfactant protein B expression*. Seminars in perinatology; 2008: Elsevier.

84. Mund SI, Stampanoni M, Schittny JC. Developmental alveolarization of the mouse lung. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2008;237(8):2108-16.

85. Tsuda A, Filipovic N, Haberthur D, Dickie R, Matsui Y, Stampanoni M, et al. Finite element 3D reconstruction of the pulmonary acinus imaged by synchrotron X-ray tomography. *Journal of Applied Physiology*. 2008;105(3):964-76.

86. Narayanan M, Owers-Bradley J, Beardsmore CS, Mada M, Ball I, Garipov R, et al. Alveolarization continues during childhood and adolescence: new evidence from helium-3 magnetic resonance. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;185(2):186-91.

87. Herring MJ, Putney LF, Wyatt G, Finkbeiner WE, Hyde DM. Growth of alveoli during postnatal development in humans based on stereological estimation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2014;307(4):L338-L44.

88. Roth-Kleiner M, Berger TM, Tarek MR, Burri PH, Schittny JC. Neonatal dexamethasone induces premature microvascular maturation of the alveolar capillary network. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2005;233(4):1261-71.

89. Schittny JC, Mund SI, Stampanoni M. Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008;294(2):L246-L54.

90. Butler JP, Loring SH, Patz S, Tsuda A, Yablonskiy DA, Mentzer SJ. Evidence for adult lung growth in humans. *New England Journal of Medicine*. 2012;367(3):244-7.
91. Gauderman WJ, Urman R, Avol E, Berhane K, McConnell R, Rappaport E, et al. Association of improved air quality with lung development in children. *N Engl J Med*. 2015;372:905-13.
92. Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, et al. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes & development*. 1996;10(1):60-9.
93. DeFelice M, Silberschmidt D, DiLauro R, Xu Y, Wert SE, Weaver TE, et al. TTF-1 phosphorylation is required for peripheral lung morphogenesis, perinatal survival, and tissue-specific gene expression. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(37):35574-83.
94. Goss AM, Tian Y, Tsukiyama T, Cohen ED, Zhou D, Lu MM, et al. Wnt2/2b and β -catenin signaling are necessary and sufficient to specify lung progenitors in the foregut. *Developmental cell*. 2009;17(2):290-8.
95. Domyan ET, Ferretti E, Throckmorton K, Mishina Y, Nicolis SK, Sun X. Signaling through BMP receptors promotes respiratory identity in the foregut via repression of Sox2. *Development*. 2011;138(5):971-81.
96. Wells JM, Melton DA. Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development*. 2000;127(8):1563-72.
97. Stafford D, Prince VE. Retinoic acid signaling is required for a critical early step in zebrafish pancreatic development. *Current Biology*. 2002;12(14):1215-20.

Bibliografia

98. Tiso N, Filippi A, Pauls S, Bortolussi M, Argenton F. BMP signalling regulates anteroposterior endoderm patterning in zebrafish. *Mechanisms of development*. 2002;118(1-2):29-37.
99. Lü J, Izvolosky KI, Qian J, Cardoso WV. Identification of FGF10 targets in the embryonic lung epithelium during bud morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(6):4834-41.
100. Desai TJ, Malpel S, Flentke GR, Smith SM, Cardoso WV. Retinoic acid selectively regulates Fgf10 expression and maintains cell identity in the prospective lung field of the developing foregut. *Developmental biology*. 2004;273(2):402-15.
101. Ishii Y, Rex M, Scotting PJ, Yasugi S. Region-specific expression of chicken Sox2 in the developing gut and lung epithelium: Regulation by epithelial-mesenchymal interactions. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 1998;213(4):464-75.
102. Tompkins DH, Besnard V, Lange AW, Keiser AR, Wert SE, Bruno MD, et al. Sox2 activates cell proliferation and differentiation in the respiratory epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;45(1):101-10.
103. Meno C, Shimono A, Saijoh Y, Yashiro K, Mochida K, Ohishi S, et al. lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal. *Cell*. 1998;94(3):287-97.
104. Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G, Hogan B. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development*. 1997;124(1):53-63.
105. Lebeche D, Malpel S, Cardoso WV. Fibroblast growth factor interactions in the developing lung. *Mechanisms of development*. 1999;86(1-2):125-36.

106. Weaver M, Dunn NR, Hogan B. Bmp4 and Fgf10 play opposing roles during lung bud morphogenesis. *Development*. 2000;127(12):2695-704.
107. Hislop A. Developmental biology of the pulmonary circulation. *Paediatric respiratory reviews*. 2005;6(1):35-43.
108. Galambos C, DeMello DE. Regulation of alveologenesi: clinical implications of impaired growth. *Pathology*. 2008;40(2):124-40.
109. Bade BC, Cruz CSD. Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine*. 2020;41(1):1-24.
110. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
111. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2016;11(1):39-51.
112. Hirsch FR, Franklin WA, Gazdar AF, Bunn PA. Early detection of lung cancer: clinical perspectives of recent advances in biology and radiology. *Clinical Cancer Research*. 2001;7(1):5-22.
113. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2019;69(1):7-34.
114. Wong MC, Lao XQ, Ho K-F, Goggins WB, Shelly L. Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-9.

Bibliografia

115. Finke I, Behrens G, Weisser L, Brenner H, Jansen L. Socioeconomic differences and lung cancer Survival—Systematic review and meta-analysis. *Frontiers in oncology*. 2018;8:536.
116. Sömmering ST. De morbis vasorum absorbentium corporis humani 1795.
117. Bouisson EF. *Tribut à la Chirurgie*: Baillière; 1858.
118. Adler I. *Primary malignant growths of the lungs and bronchi: A pathological and clinical study*: Longmans, Green; 1912.
119. Lickint F. Tabak und Tabakrauch als ätiologischer Faktor des Carcinoms. *Zeitschrift für Krebsforschung*. 1930;30(1):349-65.
120. Schairer E, Schöniger E. Lungenkrebs und tabakverbrauch. *Zeitschrift für Krebsforschung*. 1944;54(4):261-9.
121. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *International journal of cancer*. 2008;122(1):155-64.
122. Liu B-Q, Peto R, Chen Z-M, Boreham J, Wu Y-P, Li J-Y, et al. Emerging tobacco hazards in China: 1. Retrospective proportional mortality study of one million deaths. *Bmj*. 1998;317(7170):1411-22.
123. Proctor RN. Tobacco and the global lung cancer epidemic. *Nature Reviews Cancer*. 2001;1(1):82-6.
124. Rojewski AM, Tanner NT, Dai L, Ravenel JG, Gebregziabher M, Silvestri GA, et al. Tobacco dependence predicts higher lung cancer and mortality rates and lower rates of smoking cessation in the National Lung Screening Trial. *Chest*. 2018;154(1):110-8.

125. Hoffmann DH, Ilse. The changing cigarette, 1950-1995. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. 1997;50(4):307-64.
126. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(14):1194-210.
127. Smith C, Perfetti T, Rumble M, Rodgman A, Doolittle D. "IARC Group 2B carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology*. 2001;39(2):183-205.
128. Hecht SS. More than 500 trillion molecules of strong carcinogens per cigarette: use in product labelling? *Tobacco control*. 2011;20(5):387-.
129. Hecht SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chemical research in toxicology*. 1998;11(6):559-603.
130. Talaska G, Schamer M, Skipper P, Tannenbaum S, Caporaso N, Unruh L, et al. Detection of carcinogen-DNA adducts in exfoliated urothelial cells of cigarette smokers: association with smoking, hemoglobin adducts, and urinary mutagenicity. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 1991;1(1):61-6.
131. Cassidy A, Myles JP, van Tongeren M, Page R, Liloglou T, Duffy S, et al. The LLP risk model: an individual risk prediction model for lung cancer. *British journal of cancer*. 2008;98(2):270-6.
132. Spitz MR, Etzel CJ, Dong Q, Amos CI, Wei Q, Wu X, et al. An expanded risk prediction model for lung cancer. *Cancer prevention research*. 2008;1(4):250-4.
133. Lissowska J, Foretova L, Dąbek J, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, et al. Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer causes & control*. 2010;21(7):1091-104.

Bibliografia

134. Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25. 1. *Nature genetics*. 2008;40(5):616-22.
135. Butkiewicz D, Rusin M, Enewold L, Shields PG, Chorazy M, Harris CC. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis*. 2001;22(4):593-7.
136. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, Shinoda N, Watanabe J. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450 IA1 gene. *Febs Letters*. 1990;263(1):131-3.
137. Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Hoover RN, Trump BF, Sugimura H, et al. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer research*. 1992;52(23):6712-5.
138. Boffetta P, Ye W, Boman G, Nyren O. Lung cancer risk in a population-based cohort of patients hospitalized for asthma in Sweden. *European Respiratory Journal*. 2002;19(1):127-33.
139. Santillan AA, Camargo CA, Colditz GA. A meta-analysis of asthma and risk of lung cancer (United States). *Cancer Causes & Control*. 2003;14(4):327-34.
140. Park J, Kim D, Shim T, Lim C, Koh Y, Lee S, et al. Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*. 2001;17(6):1216-9.
141. Wang Y, Kuan PJ, Xing C, Cronkhite JT, Torres F, Rosenblatt RL, et al. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *The American Journal of Human Genetics*. 2009;84(1):52-9.

142. Turner MC, Chen Y, Krewski D, Calle EE, Thun MJ. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;176(3):285-90.
143. Syrjänen K. Bronchial squamous cell carcinomas associated with epithelial changes identical to condylomatous lesions of the uterine cervix. *Lung*. 1980;158(1):131-42.
144. Cao S, Wendl MC, Wyczalkowski MA, Wylie K, Ye K, Jayasinghe R, et al. Divergent viral presentation among human tumors and adjacent normal tissues. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-12.
145. Littman AJ, Jackson LA, Vaughan TL. Chlamydia pneumoniae and lung cancer: epidemiologic evidence. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2005;14(4):773-8.
146. Morris A, Crothers K, Beck JM, Huang L. An official ATS workshop report: Emerging issues and current controversies in HIV-associated pulmonary diseases. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2011;8(1):17-26.
147. Reddy KP, Kong CY, Hyle EP, Baggett TP, Huang M, Parker RA, et al. Lung cancer mortality associated with smoking and smoking cessation among people living with HIV in the United States. *JAMA internal medicine*. 2017;177(11):1613-21.
148. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *Journal of thoracic oncology*. 2015;10(9):1243-60.
149. Zheng M. Classification and pathology of lung cancer. *Surgical Oncology Clinics*. 2016;25(3):447-68.

Bibliografia

150. Lewis DR, Check DP, Caporaso NE, Travis WD, Devesa SS. US lung cancer trends by histologic type. *Cancer*. 2014;120(18):2883-92.
151. Francisci S, Minicozzi P, Pierannunzio D, Ardanaz E, Eberle A, Grimsrud TK, et al. Survival patterns in lung and pleural cancer in Europe 1999–2007: results from the EURO CARE-5 study. *European Journal of Cancer*. 2015;51(15):2242-53.
152. Travis WD. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Modern Pathology*. 2012;25(1):S18-S30.
153. Früh M, De Ruyscher D, Popat S, Crinò L, Peters S, Felip E. Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*. 2013;24:vi99-vi105.
154. Konopka KE, editor *Diagnostic pathology of lung cancer. Seminars in respiratory and critical care medicine*; 2016: Thieme Medical Publishers.
155. Battafarano RJ, Fernandez FG, Ritter J, Meyers BF, Guthrie TJ, Cooper JD, et al. Large cell neuroendocrine carcinoma: an aggressive form of non-small cell lung cancer. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2005;130(1):166-72.
156. Hironaka M, Fukayama M. Pulmonary fibrosis and lung carcinoma: a comparative study of metaplastic epithelia in honeycombed areas of usual interstitial pneumonia with or without lung carcinoma. *Pathology international*. 1999;49(12):1060-6.
157. Kreuter M, Ehlers-Tenenbaum S, Schaaf M, Oltmanns U, Palmowski K, Hoffmann H, et al. Treatment and outcome of lung cancer in idiopathic interstitial pneumonias. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2015;31(4):266-74.

158. Tatsumori T, Tsuta K, Masai K, Kinno T, Taniyama T, Yoshida A, et al. p40 is the best marker for diagnosing pulmonary squamous cell carcinoma: comparison with p63, cytokeratin 5/6, desmocollin-3, and sox2. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2014;22(5):377-82.
159. Rizzo S, Petrella F, Buscarino V, De Maria F, Raimondi S, Barberis M, et al. CT radiogenomic characterization of EGFR, K-RAS, and ALK mutations in non-small cell lung cancer. *European radiology*. 2016;26(1):32-42.
160. Sica G, Yoshizawa A, Sima CS, Azzoli CG, Downey RJ, Rusch VW, et al. A grading system of lung adenocarcinomas based on histologic pattern is predictive of disease recurrence in stage I tumors. *The American journal of surgical pathology*. 2010;34(8):1155-62.
161. Russell PA, Wainer Z, Wright GM, Daniels M, Conron M, Williams RA. Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinicopathologic study based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *Journal of Thoracic Oncology*. 2011;6(9):1496-504.
162. Tsuta K, Kawago M, Inoue E, Yoshida A, Takahashi F, Sakurai H, et al. The utility of the proposed IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma subtypes for disease prognosis and correlation of driver gene alterations. *Lung cancer*. 2013;81(3):371-6.
163. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Modern pathology*. 2011;24(5):653-64.

Bibliografia

164. Team NLSTR. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(5):395-409.
165. Walter JE, Heuvelmans MA, de Jong PA, Vliegenthart R, van Ooijen PM, Peters RB, et al. Occurrence and lung cancer probability of new solid nodules at incidence screening with low-dose CT: analysis of data from the randomised, controlled NELSON trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(7):907-16.
166. Vansteenkiste J, De Ruyscher D, Eberhardt W, Lim E, Senan S, Felip E, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*. 2013;24:vi89-vi98.
167. Bast Jr RC, Holland JF. *Holland-Frei Cancer Medicine 8: PMPH-USA*; 2010.
168. Lardinois D, Weder W, Hany TF, Kamel EM, Korom S, Seifert B, et al. Staging of non-small-cell lung cancer with integrated positron-emission tomography and computed tomography. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(25):2500-7.
169. Kim YH, Nagai H, Ozasa H, Sakamori Y, Mishima M. Therapeutic strategy for non-small-cell lung cancer patients with brain metastases. *Biomedical reports*. 2013;1(5):691-6.
170. Hirsch FR, Spreafico A, Novello S, Wood MD, Simms L, Papotti M. The prognostic and predictive role of histology in advanced non-small cell lung cancer: a literature review. *Journal of Thoracic Oncology*. 2008;3(12):1468-81.
171. Sun Z, Aubry M-C, Deschamps C, Marks RS, Okuno SH, Williams BA, et al. Histologic grade is an independent prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer: An analysis of 5018 hospital-and 712 population-based

cases. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2006;131(5):1014-20.

172. Howington JA, Blum MG, Chang AC, Balekian AA, Murthy SC. Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: diagnosis and management of lung cancer: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013;143(5):e278S-e313S.

173. Rosen JE, Keshava HB, Yao X, Kim AW, Detterbeck FC, Boffa DJ. The natural history of operable non-small cell lung cancer in the national cancer database. *The Annals of thoracic surgery*. 2016;101(5):1850-5.

174. Veluswamy RR, Ezer N, Mhango G, Goodman E, Bonomi M, Neugut AI, et al. Limited resection versus lobectomy for older patients with early-stage lung cancer: impact of histology. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(30):3447.

175. Liu S, Wang R, Zhang Y, Li Y, Cheng C, Pan Y, et al. Precise diagnosis of intraoperative frozen section is an effective method to guide resection strategy for peripheral small-sized lung adenocarcinoma. *Journal of clinical oncology*. 2016;34(4):307-13.

176. Tsitsias T, Boulemden A, Ang K, Nakas A, Waller DA. The N2 paradox: similar outcomes of pre-and postoperatively identified single-zone N2a positive non-small-cell lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2014;45(5):882-7.

177. Postmus P, Kerr K, Oudkerk M, Senan S, Waller D, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2017;28:iv1-iv21.

178. Versteegen NE, Lagerwaard FJ, Hashemi SM, Dahele M, Slotman BJ, Senan S. Patterns of disease recurrence after SABR for early stage non-small-

Bibliografia

cell lung cancer: optimizing follow-up schedules for salvage therapy. *Journal of Thoracic Oncology*. 2015;10(8):1195-200.

179. Bradley JD, Paulus R, Komaki R, Masters G, Blumenschein G, Schild S, et al. Standard-dose versus high-dose conformal radiotherapy with concurrent and consolidation carboplatin plus paclitaxel with or without cetuximab for patients with stage IIIA or IIIB non-small-cell lung cancer (RTOG 0617): a randomised, two-by-two factorial phase 3 study. *The lancet oncology*. 2015;16(2):187-99.

180. Cortés AA, Urquizu LC, Cubero JH. Adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer: state-of-the-art. *Translational lung cancer research*. 2015;4(2):191.

181. Group NM-aC. Adjuvant chemotherapy, with or without postoperative radiotherapy, in operable non-small-cell lung cancer: two meta-analyses of individual patient data. *The Lancet*. 2010;375(9722):1267-77.

182. Nana-Sinkam SP, Powell CA. Molecular biology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013;143(5):e30S-e9S.

183. Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong K-K. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nature Reviews Cancer*. 2014;14(8):535-46.

184. Raeburn C, Spencer H. A study of the origin and development of lung cancer. *Thorax*. 1953;8(1):1.

185. Sullivan JP, Minna JD, Shay JW. Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2010;29(1):61-72.

186. Sutherland KD, Berns A. Cell of origin of lung cancer. *Molecular oncology*. 2010;4(5):397-403.
187. Cheung WK, Nguyen DX. Lineage factors and differentiation states in lung cancer progression. *Oncogene*. 2015;34(47):5771-80.
188. Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Plopper CG. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. *Experimental lung research*. 2001;27(5):401-15.
189. Park K-S, Liang M-C, Raiser DM, Zamponi R, Roach RR, Curtis SJ, et al. Characterization of the cell of origin for small cell lung cancer. *Cell cycle*. 2011;10(16):2806-15.
190. Sutherland KD, Proost N, Brouns I, Adriaensen D, Song J-Y, Berns A. Cell of origin of small cell lung cancer: inactivation of Trp53 and Rb1 in distinct cell types of adult mouse lung. *Cancer cell*. 2011;19(6):754-64.
191. Giangreco A, Reynolds SD, Stripp BR. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *The American journal of pathology*. 2002;161(1):173-82.
192. Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death & Differentiation*. 2008;15(3):504-14.
193. Kerr K. Pulmonary preinvasive neoplasia. *Journal of clinical pathology*. 2001;54(4):257-71.
194. Weinberg R, Hanahan D. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.

Bibliografia

195. Wistuba II, Virmani AK, Gazdar AF, Lam S, LeRiche J, Behrens C, et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *Journal of the National Cancer Institute*. 1997;89(18):1366-73.
196. Powell CA, Klares S, O'Connor G, Brody JS. Loss of heterozygosity in epithelial cells obtained by bronchial brushing: clinical utility in lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 1999;5(8):2025-34.
197. Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Spanevello A, Resta O, Carpagnano F, Mulé G, et al. 3p microsatellite signature in exhaled breath condensate and tumor tissue of patients with lung cancer. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;177(3):337-41.
198. Chiba I, Takahashi T, Nau MM, D'Amico D, Curiel DT, Mitsudomi T, et al. Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Oncogene*. 1990;5(10):1603-10.
199. Rusin MR, Okamoto A, Chorazy M, Czyzewski K, Harasim J, Spillare EA, et al. Intragenic mutations of the p16INK4, p15INK4B and p18 genes in primary non-small-cell lung cancers. *International journal of cancer*. 1996;65(6):734-9.
200. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2008;455(7216):1069-75.
201. Lee W, Jiang Z, Liu J, Haverty PM, Guan Y, Stinson J, et al. The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient. *Nature*. 2010;465(7297):473-7.
202. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers—a different disease. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(10):778-90.

203. Sato M, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD. A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *Journal of thoracic oncology*. 2007;2(4):327-43.
204. Tang X, Shigematsu H, Bekele BN, Roth JA, Minna JD, Hong WK, et al. EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients. *Cancer research*. 2005;65(17):7568-72.
205. Weihua Z, Tsan R, Huang W-C, Wu Q, Chiu C-H, Fidler IJ, et al. Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity. *Cancer cell*. 2008;13(5):385-93.
206. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS medicine*. 2005;2(1):e17.
207. Morgillo F, Kim W-Y, Kim ES, Ciardiello F, Hong WK, Lee H-Y. Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(9):2795-803.
208. Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, Cavet G, Zhu W, Fu L, et al. Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(24):8686-98.
209. Pirker R, Szczesna A, Von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, Park K, et al. FLEX: A randomized, multicenter, phase III study of cetuximab in combination with cisplatin/vinorelbine (CV) versus CV alone in the first-line treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(15_suppl):3-.

Bibliografia

210. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in previously treated non–small-cell lung cancer. *New England journal of medicine*. 2005;353(2):123-32.
211. Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, Haber DA. Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non–small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(5):587-95.
212. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non–small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(21):2129-39.
213. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304(5676):1497-500.
214. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(36):13306-11.
215. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(11):1160-74.
216. Kim ES, Hirsh V, Mok T, Socinski MA, Gervais R, Wu Y-L, et al. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. *The Lancet*. 2008;372(9652):1809-18.
217. Godin-Heymann N, Bryant I, Rivera MN, Ulkus L, Bell DW, Riese DJ, et al. Oncogenic activity of epidermal growth factor receptor kinase mutant

alleles is enhanced by the T790M drug resistance mutation. *Cancer research*. 2007;67(15):7319-26.

218. Greulich H, Chen T-H, Feng W, Jänne PA, Alvarez JV, Zappaterra M, et al. Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and-resistant EGFR mutants. *PLoS medicine*. 2005;2(11):e313.

219. Ji H, Li D, Chen L, Shimamura T, Kobayashi S, McNamara K, et al. The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer cell*. 2006;9(6):485-95.

220. Politi K, Zakowski MF, Fan P-D, Schonfeld EA, Pao W, Varmus HE. Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes & development*. 2006;20(11):1496-510.

221. Vikis H, Sato M, James M, Wang D, Wang Y, Wang M, et al. EGFR-T790M is a rare lung cancer susceptibility allele with enhanced kinase activity. *Cancer research*. 2007;67(10):4665-70.

222. Tang X, Varella-Garcia M, Xavier AC, Massarelli E, Ozburn N, Moran C, et al. Epidermal growth factor receptor abnormalities in the pathogenesis and progression of lung adenocarcinomas. *Cancer Prevention Research*. 2008;1(3):192-200.

223. Hirsch FR, Herbst RS, Olsen C, Chansky K, Crowley J, Kelly K, et al. Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(20):3351.

Bibliografia

224. Tsao M-S, Sakurada A, Cutz J-C, Zhu C-Q, Kamel-Reid S, Squire J, et al. Erlotinib in lung cancer—molecular and clinical predictors of outcome. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(2):133-44.
225. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *Journal of clinical oncology*. 2005;23(25):5900-9.
226. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, et al. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clinical cancer research*. 2008;14(18):5731-4.
227. Yang Y, Wislez M, Fujimoto N, Prudkin L, Izzo JG, Uno F, et al. A selective small molecule inhibitor of c-Met, PHA-665752, reverses lung premalignancy induced by mutant K-ras. *Molecular cancer therapeutics*. 2008;7(4):952-60.
228. Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer research*. 2002;62(23):6997-7000.
229. Dankort D, Filenova E, Collado M, Serrano M, Jones K, McMahon M. A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes & development*. 2007;21(4):379-84.
230. West KA, Linnoila IR, Belinsky SA, Harris CC, Dennis PA. Tobacco carcinogen-induced cellular transformation increases activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway in vitro and in vivo. *Cancer research*. 2004;64(2):446-51.

231. Yamamoto H, Shigematsu H, Nomura M, Lockwood W, Sato M, Okumura N, et al. PIK3CA mutations and gene copy number in human lung cancers. *AACR*; 2008.
232. Wislez M, Spencer ML, Izzo JG, Juroske DM, Balhara K, Cody DD, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin reverses alveolar epithelial neoplasia induced by oncogenic K-ras. *Cancer research*. 2005;65(8):3226-35.
233. Zhang S, Schafer-Hales K, Khuri FR, Zhou W, Vertino PM, Marcus AI. The tumor suppressor LKB1 regulates lung cancer cell polarity by mediating cdc42 recruitment and activity. *Cancer research*. 2008;68(3):740-8.
234. Ji H, Ramsey MR, Hayes DN, Fan C, McNamara K, Kozlowski P, et al. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature*. 2007;448(7155):807-10.
235. Koivunen J, Kim J, Lee J, Rogers A, Park J, Zhao X, et al. Mutations in the LKB1 tumour suppressor are frequently detected in tumours from Caucasian but not Asian lung cancer patients. *British journal of cancer*. 2008;99(2):245-52.
236. Ghaffar H, Sahin F, Sanchez-Cepedes M, Su GH, Zahurak M, Sidransky D, et al. LKB1 protein expression in the evolution of glandular neoplasia of the lung. *Clinical cancer research*. 2003;9(8):2998-3003.
237. Weir BA, Woo MS, Getz G, Perner S, Ding L, Beroukhim R, et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2007;450(7171):893-8.
238. Kendall J, Liu Q, Bakleh A, Krasnitz A, Nguyen KC, Lakshmi B, et al. Oncogenic cooperation and coamplification of developmental transcription factor genes in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(42):16663-8.

Bibliografia

239. Tang X, Sun M, Behrens C, Prudkin L, Ozburn N, Gazdar A, et al. TTF-1 gene amplification and protein expression pattern identify adenocarcinoma of lung with worse prognosis. *AACR*; 2008.
240. Merrick DT, Haney J, Petrunich S, Sugita M, Miller YE, Keith RL, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bronchial dysplasia demonstrated by quantitative RT-PCR analysis. *Lung Cancer*. 2005;48(1):31-45.
241. Keith RL, Miller YE, Gemmill RM, Drabkin HA, Dempsey EC, Kennedy TC, et al. Angiogenic squamous dysplasia in bronchi of individuals at high risk for lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2000;6(5):1616-25.
242. Strieter RM. Out of the shadows: CXC chemokines in promoting aberrant lung cancer angiogenesis. *Cancer Prevention Research*. 2008;1(5):305-7.
243. Dowlati A, Gray R, Sandler AB, Schiller JH, Johnson DH. Cell adhesion molecules, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without bevacizumab—an eastern cooperative oncology group study. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(5):1407-12.
244. Heymach J, Hanrahan E, Mann H, Langmuir P, Natale R, Johnson B, et al. Baseline VEGF as a potential predictive biomarker of vandetanib clinical benefit in patients with advanced NSCLC. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(15_suppl):8009-.
245. Giatromanolaki A, Koukourakis M, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, et al. Relation of hypoxia inducible factor 1 α and 2 α in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *British journal of cancer*. 2001;85(6):881-90.

246. Hoogsteen I, Marres H, Van Der Kogel A, Kaanders J. The hypoxic tumour microenvironment, patient selection and hypoxia-modifying treatments. *Clinical oncology*. 2007;19(6):385-96.
247. Pore N, Jiang Z, Gupta A, Cerniglia G, Kao GD, Maity A. EGFR tyrosine kinase inhibitors decrease VEGF expression by both hypoxia-inducible factor (HIF)-1-independent and HIF-1-dependent mechanisms. *Cancer research*. 2006;66(6):3197-204.
248. Vitoria-Petit A, Crombet T, Jothy S, Hicklin D, Bohlen P, Schlaepfli JM, et al. Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis. *Cancer research*. 2001;61(13):5090-101.
249. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(24):2542-50.
250. Yamaguchi T, Hosono Y, Yanagisawa K, Takahashi T. NKX2-1/TTF-1: an enigmatic oncogene that functions as a double-edged sword for cancer cell survival and progression. *Cancer cell*. 2013;23(6):718-23.
251. Grimson A, Farh KK-H, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell*. 2007;27(1):91-105.
252. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*. 1993;75(5):843-54.
253. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 2009;19(1):92-105.

Bibliografia

254. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer cell*. 2006;9(3):189-98.
255. Landi D, Barale R, Gemignani F, Landi S. Prediction of the biological effect of polymorphisms within microRNA binding sites. *MicroRNA and Cancer*: Springer; 2011. p. 197-210.
256. Saito M, Schetter AJ, Mollerup S, Kohno T, Skaug V, Bowman ED, et al. The association of microRNA expression with prognosis and progression in early-stage, non-small cell lung adenocarcinoma: a retrospective analysis of three cohorts. *Clinical cancer research*. 2011;17(7):1875-82.
257. Boeri M, Verri C, Conte D, Roz L, Modena P, Facchinetti F, et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(9):3713-8.
258. Del Vescovo V, Cantaloni C, Cucino A, Girlando S, Silvestri M, Bragantini E, et al. MiR-205 expression levels in nonsmall cell lung cancer do not always distinguish adenocarcinomas from squamous cell carcinomas. *The American journal of surgical pathology*. 2011;35(2):268-75.
259. Bishop JA, Benjamin H, Cholak H, Chajut A, Clark DP, Westra WH. Accurate classification of non-small cell lung carcinoma using a novel microRNA-based approach. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(2):610-9.
260. Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, et al. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *Journal of clinical oncology*. 2009;27(12):2030-7.
261. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *nature*. 2001;414(6859):105-11.

262. Heguy A, O'Connor TP, Luettich K, Worgall S, Ciecuch A, Harvey B-G, et al. Gene expression profiling of human alveolar macrophages of phenotypically normal smokers and nonsmokers reveals a previously unrecognized subset of genes modulated by cigarette smoking. *Journal of molecular medicine*. 2006;84(4):318-28.
263. Borczuk AC, Powell CA. Expression profiling and lung cancer development. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2007;4(1):127-32.
264. Borczuk AC, Gorenstein L, Walter KL, Assaad AA, Wang L, Powell CA. Non-small-cell lung cancer molecular signatures recapitulate lung developmental pathways. *The American journal of pathology*. 2003;163(5):1949-60.
265. Bonner AE, Lemon WJ, Devereux TR, Lubet RA, You M. Molecular profiling of mouse lung tumors: association with tumor progression, lung development, and human lung adenocarcinomas. *Oncogene*. 2004;23(5):1166-76.
266. Liu H, Kho AT, Kohane IS, Sun Y. Predicting survival within the lung cancer histopathological hierarchy using a multi-scale genomic model of development. *PLoS medicine*. 2006;3(7):e232.
267. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(31):12771-5.
268. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(38):16281-6.

Bibliografia

269. Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Molecular cancer research*. 2009;7(3):330-8.
270. Kim CFB, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*. 2005;121(6):823-35.
271. Schenk T, Ackermann J, Brunner C, Schenk P, Zojer N, Roka S, et al. Detection of chromosomal aneuploidy by interphase fluorescence in situ hybridization in bronchoscopically gained cells from lung cancer patients. *Chest*. 1997;111(6):1691-6.
272. Sokolova IA, Bubendorf L, O'Hare A, Legator MS, Jacobson KK, Grilli BS B, et al. A fluorescence in situ hybridization-based assay for improved detection of lung cancer cells in bronchial washing specimens. *Cancer Cytopathology: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 2002;96(5):306-15.
273. Nakamura H, Aute I, Kawasaki N, Taguchi M, Ohira T, Kato H. Quantitative detection of lung cancer cells by fluorescence in situ hybridization: comparison with conventional cytology. *Chest*. 2005;128(2):906-11.
274. Halling KC, Rickman OB, Kipp BR, Harwood AR, Doerr CH, Jett JR. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of lung cancer in bronchoscopic specimens. *Chest*. 2006;130(3):694-701.
275. Yendamuri S, Vaporciyan AA, Zaidi T, Feng L, Fernandez R, Bekele NB, et al. 3p22. 1 and 10q22. 3 deletions detected by fluorescence in situ hybridization (FISH): a potential new tool for early detection of non-small cell lung Cancer (NSCLC). *Journal of Thoracic Oncology*. 2008;3(9):979-84.

276. Varella-Garcia M, Kittelson J, Schulte AP, Vu KO, Wolf HJ, Zeng C, et al. Multi-target interphase fluorescence in situ hybridization assay increases sensitivity of sputum cytology as a predictor of lung cancer. *Cancer detection and prevention*. 2004;28(4):244-51.
277. Bubendorf L, Müller P, Joos L, Grilli B, Vogel S, Herzog M, et al. Multitarget FISH analysis in the diagnosis of lung cancer. *American journal of clinical pathology*. 2005;123(4):516-23.
278. Chang JW-C, Liu H-P, Hsieh M-H, Fang Y-F, Hsieh M-S, Hsieh J-J, et al. Increased epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number is strongly associated with EGFR mutations and adenocarcinoma in non-small cell lung cancers: a chromogenic in situ hybridization study of 182 patients. *Lung Cancer*. 2008;61(3):328-39.
279. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561-6.
280. Solomon B, Varella-Garcia M, Camidge DR. ALK gene rearrangements: a new therapeutic target in a molecularly defined subset of non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology*. 2009;4(12):1450-4.
281. Just P-A, Cazes A, Audebourg A, Cessot A, Pallier K, Danel C, et al. Histologic subtypes, immunohistochemistry, FISH or molecular screening for the accurate diagnosis of ALK-rearrangement in lung cancer: a comprehensive study of Caucasian non-smokers. *Lung Cancer*. 2012;76(3):309-15.
282. Maier S, Wilbertz T, Braun M, Scheble V, Reischl M, Mikut R, et al. SOX2 amplification is a common event in squamous cell carcinomas of different organ sites. *Human pathology*. 2011;42(8):1078-88.

Bibliografia

283. Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, Verhaak RG, et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nature genetics*. 2009;41(11):1238-42.
284. Tsuta K, Tanabe Y, Yoshida A, Takahashi F, Maeshima AM, Asamura H, et al. Utility of 10 immunohistochemical markers including novel markers (desmocollin-3, glypican 3, S100A2, S100A7, and Sox-2) for differential diagnosis of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the Lung. *Journal of Thoracic Oncology*. 2011;6(7):1190-9.
285. Wilbertz T, Wagner P, Petersen K, Stiedl A-C, Scheble VJ, Maier S, et al. SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Modern pathology*. 2011;24(7):944-53.
286. Sholl LM, Barletta JA, Yeap BY, Chirieac LR, Hornick JL. Sox2 protein expression is an independent poor prognostic indicator in stage I lung adenocarcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2010;34(8):1193.
287. Tessema M, Belinsky SA. Mining the epigenome for methylated genes in lung cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2008;5(8):806-10.
288. Toyooka S, Tokumo M, Shigematsu H, Matsuo K, Asano H, Tomii K, et al. Mutational and epigenetic evidence for independent pathways for lung adenocarcinomas arising in smokers and never smokers. *Cancer research*. 2006;66(3):1371-5.
289. Kim JS, Kim JW, Han J, Shim YM, Park J, Kim D-H. Cohypermethylation of p16 and FHIT promoters as a prognostic factor of recurrence in surgically resected stage I non-small cell lung cancer. *Cancer research*. 2006;66(8):4049-54.

290. Toyooka S, Toyooka KO, Maruyama R, Virmani AK, Girard L, Miyajima K, et al. DNA methylation profiles of lung tumors. *Molecular cancer therapeutics*. 2001;1(1):61-7.
291. Sterlacci W, Tzankov A, Veits L, Zelger B, Bihl MP, Foerster A, et al. A comprehensive analysis of p16 expression, gene status, and promoter hypermethylation in surgically resected non-small cell lung carcinomas. *Journal of thoracic oncology*. 2011;6(10):1649-57.
292. Walter K, Holcomb T, Januario T, Du P, Evangelista M, Kartha N, et al. DNA methylation profiling defines clinically relevant biological subsets of non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(8):2360-73.
293. Leng S, Stidley CA, Liu Y, Edlund CK, Willink RP, Han Y, et al. Genetic determinants for promoter hypermethylation in the lungs of smokers: a candidate gene-based study. *Cancer research*. 2012;72(3):707-15.
294. Ostrow KL, Hoque MO, Loyo M, Brait M, Greenberg A, Siegfried JM, et al. Molecular analysis of plasma DNA for the early detection of lung cancer by quantitative methylation-specific PCR. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(13):3463-72.
295. Liu Z, Li W, Lei Z, Zhao J, Chen X-F, Liu R, et al. CpG island methylator phenotype involving chromosome 3p confers an increased risk of non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2010;5(6):790-7.
296. Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, Han Y, Guo M, Ames S, et al. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(11):1118-28.
297. Belinsky SA, Liechty KC, Gentry FD, Wolf HJ, Rogers J, Vu K, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer research*. 2006;66(6):3338-44.

Bibliografia

298. Belinsky S, Grimes M, Casas E, Stidley C, Franklin W, Bocklage T, et al. Predicting gene promoter methylation in non-small-cell lung cancer by evaluating sputum and serum. *British journal of cancer*. 2007;96(8):1278-83.
299. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes—bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(11):839-49.
300. Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2006;1:119-50.
301. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews cancer*. 2009;9(4):239-52.
302. Borczuk AC, Sole M, Lu P, Chen J, Wilgus M-L, Friedman RA, et al. Progression of human bronchioloalveolar carcinoma to invasive adenocarcinoma is modeled in a transgenic mouse model of K-ras-induced lung cancer by loss of the TGF- β type II receptor. *Cancer research*. 2011;71(21):6665-75.
303. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Cunha G, Hein P, et al. Carcinoma-associated fibroblasts stimulate tumor progression of initiated human epithelium. *Breast Cancer Research*. 2000;2(1):1-.
304. Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, Peng H, Lehr H-A, Delaloye J-F, et al. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*. 2012;481(7379):85-9.
305. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005;438(7069):820-7.
306. Castellano JJ, Canals J, Han B, Díaz T, Monzo M, Navarro A. LncRNA Quantification from Extracellular Vesicles Isolated from Blood Plasma or

Conditioned Media. Long Non-Coding RNAs in Cancer: Springer; 2021. p. 285-304.

307. Desmoulière A, Badid C, Mounier N, Costa A. Role of myofibroblasts during normal tissue repair and excessive scarring: interest of their assessment in nephropathies. *Histology and histopathology*. 2000;15(1):269-80.

308. Zavadil J, Böttinger EP. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*. 2005;24(37):5764-74.

309. Johnstone RM, Adam M, Hammond J, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(19):9412-20.

310. Simons M, Raposo G. Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology*. 2009;21(4):575-81.

311. Wortzel I, Dror S, Kenific CM, Lyden D. Exosome-mediated metastasis: communication from a distance. *Developmental cell*. 2019;49(3):347-60.

312. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M, editors. *Sorting it out: regulation of exosome loading*. *Seminars in cancer biology*; 2014: Elsevier.

313. Caby M-P, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International immunology*. 2005;17(7):879-87.

314. Pisitkun T, Shen R-F, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(36):13368-73.

Bibliografia

315. Grigor'Eva A, Tamkovich S, Eremina A, Tupikin A, Kabilov M, Chernykh V, et al. Exosomes in tears of healthy individuals: Isolation, identification, and characterization. *Biochemistry (Moscow) supplement series B: biomedical chemistry*. 2016;10(2):165-72.
316. Fu M, Gu J, Jiang P, Qian H, Xu W, Zhang X. Exosomes in gastric cancer: roles, mechanisms, and applications. *Molecular cancer*. 2019;18(1):1-12.
317. Goulet CR, Bernard G, Tremblay S, Chabaud S, Bolduc S, Pouliot F. Exosomes induce fibroblast differentiation into cancer-associated fibroblasts through TGF β signaling. *Molecular Cancer Research*. 2018;16(7):1196-204.
318. Huang C-C, Narayanan R, Alapati S, Ravindran S. Exosomes as biomimetic tools for stem cell differentiation: applications in dental pulp tissue regeneration. *Biomaterials*. 2016;111:103-15.
319. Chen W, Hoffmann AD, Liu H, Liu X. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *NPJ precision oncology*. 2018;2(1):1-12.
320. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015;527(7578):329-35.
321. Fong MY, Zhou W, Liu L, Alontaga AY, Chandra M, Ashby J, et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nature cell biology*. 2015;17(2):183-94.
322. Ell B, Qiu Q, Wei Y, Mercatali L, Ibrahim T, Amadori D, et al. The microRNA-23b/27b/24 cluster promotes breast cancer lung metastasis by targeting metastasis-suppressive gene prosaposin. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(32):21888-95.

323. Winkler ME, Mauritz C, Groos S, Kispert A, Menke S, Hoffmann A, et al. Serum-free differentiation of murine embryonic stem cells into alveolar type II epithelial cells. *Cloning and stem cells*. 2008;10(1):49-64A-C.
324. Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research*. 1998;243(2):359-66.
325. Tirino V, Camerlingo R, Bifulco K, Irollo E, Montella R, Paino F, et al. TGF- β 1 exposure induces epithelial to mesenchymal transition both in CSCs and non-CSCs of the A549 cell line, leading to an increase of migration ability in the CD133+ A549 cell fraction. *Cell death & disease*. 2013;4(5):e620-e.
326. Kondo H, Miyoshi K, Sakiyama S, Tangoku A, Noma T. Differential regulation of gene expression of alveolar epithelial cell markers in human lung adenocarcinoma-derived A549 clones. *Stem cells international*. 2015;2015.
327. Cooper JR, Abdullatif MB, Burnett EC, Kempell KE, Conforti F, Tolley H, et al. Long term culture of the A549 cancer cell line promotes multilamellar body formation and differentiation towards an alveolar type II pneumocyte phenotype. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164438.
328. Saito A, Horie M, Nagase T. TGF- β signaling in lung health and disease. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(8):2460.
329. Bartram U, Speer CP. The role of transforming growth factor β in lung development and disease. *Chest*. 2004;125(2):754-65.
330. Chen X-F, Zhang H-J, Wang H-B, Zhu J, Zhou W-Y, Zhang H, et al. Transforming growth factor- β 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancer cells via PI3K/Akt and MEK/Erk1/2 signaling pathways. *Molecular biology reports*. 2012;39(4):3549-56.

Bibliografia

331. Li J-Y, Pu M-T, Hirasawa R, Li B-Z, Huang Y-N, Zeng R, et al. Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of Oct4 and Nanog. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(24):8748-59.
332. Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *The American journal of surgical pathology*. 2002;26(6):767-73.
333. Yan C, Whitsett JA. Protein kinase A activation of the surfactant protein B gene is mediated by phosphorylation of thyroid transcription factor 1. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(28):17327-32.
334. Moisés J, Navarro A, Santasusagna S, Viñolas N, Molins L, Ramirez J, et al. NKX2-1 expression as a prognostic marker in early-stage non-small-cell lung cancer. *BMC pulmonary medicine*. 2017;17(1):1-9.
335. Tanaka H, Yanagisawa K, Shinjo K, Taguchi A, Maeno K, Tomida S, et al. Lineage-specific dependency of lung adenocarcinomas on the lung development regulator TTF-1. *Cancer research*. 2007;67(13):6007-11.
336. Kathuria H, Millien G, McNally L, Gower AC, Tagne J-B, Cao Y, et al. NKX2-1-AS1 negatively regulates CD274/PD-L1, cell-cell interaction genes, and limits human lung carcinoma cell migration. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-15.
337. Fujita J, Ohtsuki Y, Bandoh S, Ueda Y, Kubo A, Tojo Y, et al. Expression of thyroid transcription factor-1 in 16 human lung cancer cell lines. *Lung Cancer*. 2003;39(1):31-6.
338. Chen P-M, Wu T-C, Cheng Y-W, Chen C-Y, Lee H. NKX2-1-mediated p53 expression modulates lung adenocarcinoma progression via modulating IKK β /NF- κ B activation. *Oncotarget*. 2015;6(16):14274.

339. Li C, Zhu N-L, Tan RC, Ballard PL, Derynck R, Mino P. Transforming growth factor- β inhibits pulmonary surfactant protein B gene transcription through SMAD3 interactions with NKX2. 1 and HNF-3 transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(41):38399-408.
340. Lopez-Rodriguez E, Boden C, Echaide M, Perez-Gil J, Kolb M, Gauldie J, et al. Surfactant dysfunction during overexpression of TGF- β 1 precedes profibrotic lung remodeling in vivo. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2016;310(11):L1260-L71.
341. Willis BC, duBois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006;3(4):377-82.
342. Angourani KJ, Mazhari S, Farivar S, Mahini DS, Rouintan A, Baghaei K. Fibroblast-myofibroblast crosstalk after exposure to mesenchymal stem cells secretome. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*. 2018;11(Suppl 1):S73.
343. Rice NA, Leinwand LA. Skeletal myosin heavy chain function in cultured lung myofibroblasts. *The Journal of cell biology*. 2003;163(1):119-29.
344. Lee LA, Karabina A, Broadwell LJ, Leinwand LA. The ancient sarcomeric myosins found in specialized muscles. *Skeletal muscle*. 2019;9(1):1-15.
345. Schiaffino S, Rossi AC, Smerdu V, Leinwand LA, Reggiani C. Developmental myosins: expression patterns and functional significance. *Skeletal muscle*. 2015;5(1):1-14.
346. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American journal of pathology*. 2007;170(6):1807-16.

Bibliografia

347. Matsubara D, Morikawa T, Goto A, Nakajima J, Fukayama M, Niki T. Subepithelial myofibroblast in lung adenocarcinoma: a histological indicator of excellent prognosis. *Modern Pathology*. 2009;22(6):776-85.
348. Karvonen HM, Lehtonen ST, Sormunen RT, Lappi-Blanco E, Sköld CM, Kaarteenaho RL. Lung cancer-associated myofibroblasts reveal distinctive ultrastructure and function. *Journal of Thoracic Oncology*. 2014;9(5):664-74.
349. Chen Y, Kim J, Yang S, Wang H, Wu C-J, Sugimoto H, et al. Type I collagen deletion in α SMA+ myofibroblasts augments immune suppression and accelerates progression of pancreatic cancer. *Cancer cell*. 2021;39(4):548-65. e6.
350. Yamada T, Suzuki E, Gejyo F, Ushiki T. Developmental changes in the structure of the rat fetal lung, with special reference to the airway smooth muscle and vasculature. *Archives of histology and cytology*. 2002;65(1):55-69.
351. McCulley D, Wienhold M, Sun X. The pulmonary mesenchyme directs lung development. *Current opinion in genetics & development*. 2015;32:98-105.
352. Chen L, Wilson R, Bennett E, Zosky GR. Identification of vitamin D sensitive pathways during lung development. *Respiratory research*. 2016;17(1):1-11.
353. de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t (15; 17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus. *Nature*. 1990;347(6293):558-61.
354. de Thé H. Differentiation therapy revisited. *Nature Reviews Cancer*. 2018;18(2):117-27.

ANNEX

ANNEX: ARTICLE

Canals et al. *J Exp Clin Cancer Res* (2022) 41:37
<https://doi.org/10.1186/s13046-021-02206-z>

Journal of Experimental &
 Clinical Cancer Research

RESEARCH

Open Access



Human embryonic mesenchymal lung-conditioned medium promotes differentiation to myofibroblast and loss of stemness phenotype in lung adenocarcinoma cell lines

Jordi Canals¹, Alfons Navarro^{1,2}, Cristina Vila^{3,4,5}, Josep M. Canals^{3,4,5}, Tania Díaz¹,
 Melissa Acosta-Plasencia¹, Coralí Cros-Font¹, Bing Han¹, Yangyi He^{1,6} and Mariano Monzó^{1,2*}

Abstract

Background: When genes responsible for normal embryonic development are abnormally expressed in adults, it can lead to tumor development. This can suggest that the same mechanism that controls embryonic differentiation can also control tumor differentiation. We hypothesize that the malignant phenotype of lung cancer cells could acquire benign characteristics when in contact with an embryonic lung microenvironment. We cultured two lung cancer cell lines in embryonic lung mesenchyme-conditioned medium and evaluated morphological, functional and molecular changes.

Methods: The human embryonic mesenchymal lung-conditioned medium (hEML-CM) was obtained by culturing lung cells from embryos in the pseudoglandular stage of development. The NSCLC cell lines A549 and H1299 were cultured in the hEML-CM and in a tumor-conditioned medium. Morphological changes were analyzed with optical and transmission electron microscopy. To evaluate the functional effect of conditioned medium in tumor cells, we analyzed cell proliferation, migration, colony formation capacity in 2D and 3D and in vivo tumor growth capacity. The expression of the pluripotency genes OSKM, the adenocarcinoma marker NKX2-1, the lung surfactant proteins SFTP, the myofibroblast marker MYH and DNMT3A/3B was analyzed with qRT-PCR and the presence of the myofibroblast markers vimentin and α -SMA with immunofluorescence. Transcriptomic analysis was performed using Affymetrix arrays.

Results: The A549 and H1299 cells cultured in hEML-CM lost their epithelial morphology, acquired mesodermal characteristics, and decreased proliferation, migration, and colony formation capacity in 2D and 3D, as well as reduced its capacity to grow in vivo. The expression of OSKM, NKX2-1 and SFTP decreased, while that of DNMT3A/3B, vimentin, α -SMA and MYH increased. Distant matrix analysis based on transcriptomic profile showed that conditioned cells were closer to myoblast and human lung fibroblast than to normal epithelial immortalized lung cells. A total of 1631 for A549 and 866 for H1299 differentially expressed genes between control and conditioned cells were identified.

Conclusions: To the best of our knowledge, this is the first study to report that stimuli from the embryonic lung can modulate the malignant phenotype of lung cancer cells, control their growth capacity and activate their differentiation into myofibroblasts. These findings could lead to new strategies for lung cancer management.

*Correspondence: mmonzo@ub.edu

²Thoracic Oncology Unit, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Keywords: NSCLC, Lung development, Embryonic microenvironment, Reprogramming, Myofibroblast, OSKM, NKX2-1, MYH

Background

The relationship between embryonic and tumor cells has long been of interest to investigators. The earliest study, by Durante and Cohnheim in the nineteenth century [1, 2], proposed the Embryonic Rest Hypothesis, which suggested that the remains of embryonic cells in adult tissues could cause the formation of malignant tumors. This theory gave rise to subsequent studies exploring whether the embryonic environment could control tumor growth, reprogramming and differentiation. In the first known experimental study, the Rous sarcoma virus was injected into chicken embryos and into adult chickens. The embryos did not develop sarcoma, while the adults did [3–5]. Later studies in chimeric mice found that injecting embryonic carcinoma cells into the blastocyst [6, 7] or the uterus of pregnant mice [8, 9] caused the cells to lose their malignant capacity – known as “stemness” – and become differentiated tissue. More recently, similar results were found when human malignant melanoma cells were injected into the neural crest of chickens [10] or transplanted into zebrafish embryos [11, 12]. The four master embryonic transcription factors are octamer-binding transcription factor-3/4 (OCT-3/4), SRY-box transcription factor 2 (SOX2), Kruppel-like factor 4 (KLF4) and c-MYC. In the early phases of embryonic development, these master transcription factors, known collectively as OSKM, play a fundamental role in the regulation of embryonic cell self-renewal and in the capacity to turn back the biological clock and reprogram somatic cells to pluripotency [13, 14]. In vitro studies have shown that melanoma and breast cancer cells lose their aggressive capacity when cultured in human embryonic stem cell (hESC)-conditioned medium [10–15]. Taken together, these findings indicate that the embryonic environment is capable of reprogramming the phenotype of both somatic and tumor cells and that our DNA is not hermetic, immovable and unidirectional but rather has a high degree of plasticity, making it receptive to the stimuli it receives.

Cellular crosstalk between tissues is essential to the development of the embryonic lung. During the pseudoglandular stage of development (at weeks E9, E10 and E11), crosstalk between the mesodermal cells surrounding the endoderm promotes bronchial branching and the organization of the lung mesenchyme [16, 17]. The OSKM transcription factors play a crucial role in this process: OCT-3/4 acts to maintain the totipotency of the endodermal cells [18]; SOX2 and NK2 homeobox 1

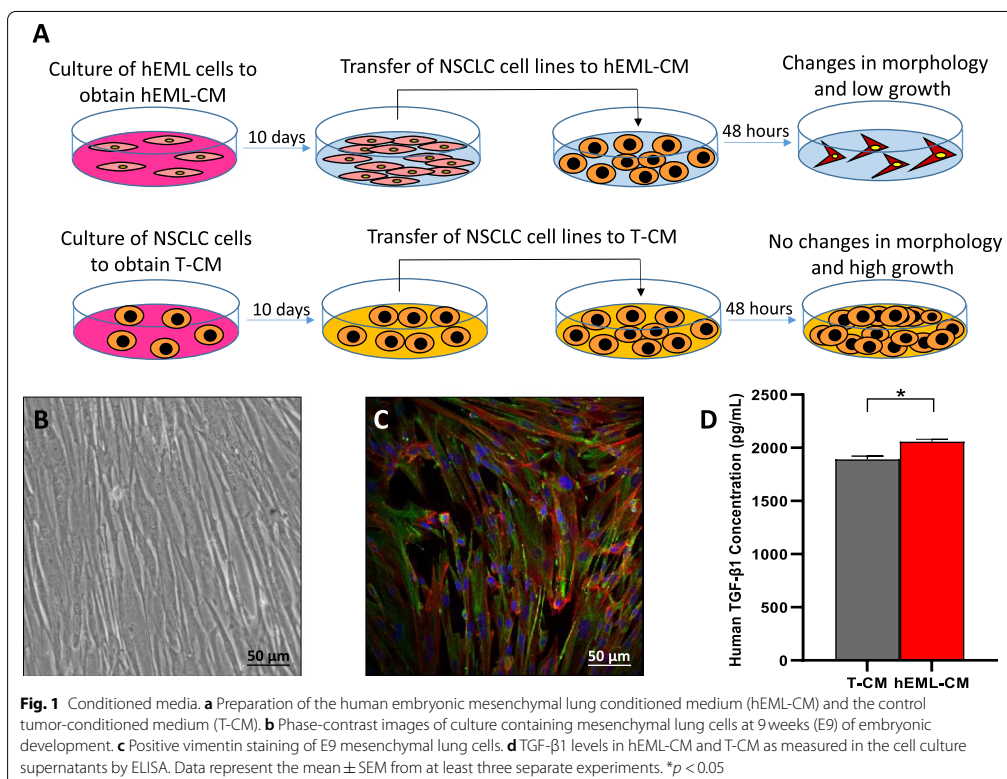
(NKX2-1; also known as thyroid transcription factor 1 [TTF-1]), promote the differentiation of the proximal and ventral endoderm [19, 20]; and KLF4 promotes mesodermal differentiation [21, 22]. In contrast, the abnormal expression of these same transcription factors in the adult lung is related to tumorigenesis. Overexpression of OCT-3/4, SOX2 and c-MYC in patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC) is associated with a decrease in cellular differentiation, an increase in metastases and poor prognosis [23–25]. NKX2-1 and KLF4 can act as oncogenes [26, 27] or tumor suppressors [28, 29] depending on the type of tissue and the microenvironment.

Based on the fact that the embryonic development of the lung generates the correct signals for the formation and correct differentiation of the adult lung, we hypothesized that the malignant phenotype of lung cancer cells could acquire benign characteristics when in contact with an embryonic lung microenvironment. To explore this hypothesis, we analyzed two NSCLC cell lines: A549 and H1299. These cell lines express OSKM, the hESC markers of pluripotency [30, 31], as well as high levels of NKX2-1 and lung surfactant proteins (SFTPs) [31, 32]. The cell lines were cultured in pseudoglandular lung mesenchyme-conditioned medium and the expression levels of OSKM, NKX2-1 and lung SFTPs were analyzed. Changes in expression level were correlated with changes in cell morphology, growth and differentiation.

Methods

Isolation and characterization of human embryonic mesenchymal lung (hEML) cells

Human embryonic lungs were obtained from terminations of pregnancy donated to the Body Donation Service of the Department of Human Anatomy and Embryology of the School of Medicine of the University of Barcelona for morphological and molecular studies. Lungs were dissected from embryos in the pseudoglandular stage of development (weeks E9, E10 and E11). The lungs were treated with dispase II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and the lung mesenchyme was separated from the bronchial tree. Cell images were taken by IX53 inverted microscope using cellSense Entry 1.7 software (Olympus, Center Valley, PA, USA). Mesenchymal cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS 1x) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and immunostained using monoclonal mouse anti-vimentin clone V9 ready-to-use and monoclonal



mouse anti-human e-cadherin clone NCH-38 ready-to-use (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) in order to confirm the mesenchymal characteristics of the cells.

Preparation of the human embryonic mesenchymal lung-conditioned medium (hEML-CM) and tumor-conditioned medium (T-CM)

Figure 1a depicts the methodology used in the preparation of the CM. The hEML cells were cultured for 10 days in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Invitrogen) and 1% Penicillin/Streptomycin (PS) (Sigma-Aldrich), and grown under the recommended conditions of 37°C in 5% CO₂ and 95% relative humidity. The resulting hEML-CM was used in further analyses.

The human lung adenocarcinoma cell lines A549 and H1299 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were cultured for 10 days: A549 in DMEM and H1299 in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640) (Invitrogen), both supplemented with 10%

FBS and 1% PS and grown at 37°C in 5% CO₂ and 95% relative humidity. The resulting T-CM was used as control medium in further analyses.

Exosome depletion was performed on day 10 in both hEML-CM and T-CM, as previously described [33, 34], by sequential centrifugation at 4°C (300G 5', 2500G 20', 10,000G 30') followed by ultracentrifugation 100,000G 2h. The hEML-CM and T-CM, with and without exosomes, were used in further analyses.

Analysis of hEML-CM and T-CM

The hEML-CM and T-CM were analyzed with Human TGF-β1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's protocol for the analysis of TGF-β1 levels. Briefly, all reagents, standard dilutions and activated samples were prepared and 50 μL of assay diluent RD1-21 and 50 μL of control and activated samples were added to each well and incubated 2 h at room temperature (RT). Samples were then removed and washed three times. Next, 100 μL

of TGF- β 1 conjugate was added to each well and incubated 2 h at RT, after which the reagent was removed and washed three times again. Then 100 μ L of substrate solution was added to each well and incubated 30 min at RT protected from light; 100 μ L of stop solution was added to each well. Finally, after 30 min, the optical density was determined using VersaMax Tunable Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) to 450 nm.

Transmission electron microscopy

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in DPBS 1x, post-fixed in 1% osmium tetroxide and 0.8% potassium ferrocyanide, dehydrated with acetone, and flat-embedded in epoxy resin. Ultrathin sections for transmission electron microscopy were cut and stained with 2% uranyl acetate for 10 min and with a lead-staining solution for 2 min. Images from stained ultrathin sections were acquired using a JEOL JEM-1010 transmission electron microscope coupled with a Gatan Orius SC1000 (model 832) digital camera.

Neutralization of TGF- β 1

TGF- β 1 levels in the medium were neutralized using 3.75 μ g/mL of TGF beta-1,2,3 Monoclonal Antibody (1D11) (Invitrogen). 5×10^4 cells were cultured in a 12-well plate with or without the neutralizing antibody and the morphological study was performed at 48 h.

Scratch wound healing assay

Proliferation was evaluated by a scratch wound healing assay using culture-insert 2 well in μ -Dish 35 mm (Ibidi, Gräfelfing, Germany) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 70 μ L of 3×10^5 cells/mL cell suspensions was applied in each well and incubated 24 h under the recommended conditions. Differences between cells growing in hEML-CM and T-CM were assessed with images taken at 6, 24 and 48 h using IX53 inverted microscope and analyzed using cellSense Entry 1.7 software.

Clonogenic assays (2D and 3D)

In colony formation assay (2D) one hundred cells were cultured for each condition in 6-well plates during 12 and 15 days for A549 and H1299, respectively. At the end of the experiment colonies were stained with 0.5% crystal violet (Sigma-Aldrich) and cell colonies were counted under the stereoscopic microscope.

For Soft-agar assay (3D) Cell Transformation Assay Kit (Colorimetric) (ab235698, Abcam, Cambridge, MA, USA) was used following manufacturing recommendations. Briefly, 2×10^4 cells were cultured in soft-agar during 8 days. At the end of the experiment cell number was quantified by spectrophotometry at 450 nm after addition of the WST Working Solution provided. Representative

images were obtained under the microscope after addition of the Staining Solution provided in the kit.

In vivo xenograft study

A xenograft tumor model was generated to evaluate differences in tumor formation and growth of control and conditioned A549 cells. 5-week-old male athymic nude mice (Rj:ATHYM-Foxn1nu/nu) were purchased (Janvier), and housed in sterile cages under laminar airflow hoods in a local SPF experimental animal facility with a 12h light/dark cycle and constant temperature (to about 25°C) and relative humidity (to about 50%). All animals were allowed to have free access to normal mouse chow and water.

A549 T-CM cells resuspended in PBS and A549 hEML-TM cells resuspended in hEML-CM were subcutaneously inoculated (1×10^6 cells/100 μ l) into both flanks. Three biological replicates (with 2 technical replicates per sample) were used for each genotype. Tumor volume was measured by a caliper every 4 days, and their volumes were calculated using the following equation: tumor volume (mm^3) = $0.5 \times \text{length} \times \text{width}^2$. Mice were anesthetized and intracardially perfused with 4%PFA 35 days after inoculation. Tumors were dissected and measured at the end of the study.

RNA extraction and gene expression analysis

Total RNA was isolated from cell lines using TRIzol Reagent (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) according to the manufacturer's protocol. The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used to obtain cDNA using 500 ng of total RNA. Relative expression was determined by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) using the StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Taqman Gene Expression Assays (Life Technologies) were used to quantify the expression of OCT-3/4 (Hs04260367_gH), SOX2 (Hs01053049_s1), KLF4 (Hs00358836_m1), c-MYC (Hs00153408_m1), NKX2-1 (Hs00968940_m1), SFTPA (Hs01652580_g1), SFTPB (Hs00167036_m1), SFTPC (Hs00951326_g1) and SFTPD (Hs01108490_m1), DNMT3A (Hs01027166_m1), DNMT3B (Hs00171876_m1), MYH1 (Hs00428500_m1), MYH2 (Hs00430042_m1), MYH4 (Hs00757977_m1), MYH7 (Hs00165276_m1), MYH16 (Hs01385213_m1). Relative quantification was calculated using $2^{-\Delta\Delta C_t}$. CDKN1 β (Hs01597588_m1) was used as endogenous control.

Oil red O solution staining

In order to assess the presence or absence of lung SFTPs, the A549 and H1299 cells were stained with Oil Red O Solution (Sigma-Aldrich). On day 0, 5×10^4 cells were

seeded in 12-well plates. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in DPBS 1x and stained with Oil Red O Solution after 48h of culture in hEML-CM or T-CM. Cell images were taken by IX53 Inverted Microscope using cellSense Entry 1.7 software.

Immunofluorescence

Cells seeded on coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde in DPBS at RT followed by permeabilization with 0.5% of Triton X-100 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) in DPBS 1x (PBTx) at RT for 5 min. Fixed cells were then blocked with 1% Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) and 5% Normal Donkey Serum (NDS) (Sigma-Aldrich) in PBTx for 30 min at RT in darkness and incubated with primary antibodies diluted in blocking solution overnight at 4°C in darkness. After primary antibody washing, secondary antibodies diluted in blocking solution were incubated for an hour at RT in darkness. Cells were stained and mounted on microscope slides using Fluoroshield with DAPI (Sigma-Aldrich). Immunostaining was performed using the following primary antibodies: rabbit anti-vimentin (1:500; Proteintech, Manchester, UK), mouse anti-alpha smooth muscle actin (α -SMA) (1:1000; Abcam) and mouse anti-myosin 4 (1:500; Invitrogen). Secondary antibodies were conjugated to Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Immunofluorescence analysis was performed using Olympus BX51 Fluorescence Microscope (Olympus) and cell images were acquired by DPController and DPManager software (Olympus).

Statistical analyses

Paired t-tests were used for comparisons between cells cultured in hEML-CM and those cultured in T-CM. ANOVA test for repetitive measures was used for comparisons between A549 T-CM and A549 hEML-TM tumor xenografts. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.

Transcriptomic analysis

Affymetrix Clariom S Human arrays have been performed in the IDIBAPS Functional genomics core facility using three samples per group of each conditioned experiment. Raw .cel files were provided which were used for further analysis. Moreover, public available data from GEO database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and ArrayExpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) were used for the following samples: HBEC6-KT (a normal immortalized cell line derived from lung bronchial epithelial cells) (GSE150541); primary human pulmonary artery endothelial cells (HPAECs) (GSE125508); Myoblast (GSE121023); and human lung fibroblasts

(HLF) (E-MTAB-8488); A549 (GSE181088) and H1299 (GSE99993). Raw .cel files were downloaded for further analysis.

Bioinformatic analysis was performed using R version 4.1.1 and Bioconductor 4.1.0. Package *oligo* was used for raw data processing and normalization with *rma* method. *removeBatchEffect* function from *limma* package was used to remove batch effects. Multidimensional scaling plot was performed using *plotMDS* function from *limma*. Distance matrix computation was done using *dist* function from *stats* package and graphically represented using *heatmap* package. Differential expression analysis was performed using *limma* package and considering all genes with an adjusted *p*-value <0.001. Venn diagrams were plotted using *VennDiagram* package. Hierarchical cluster analysis (Euclidean distance) of top 100 differentially expressed genes (DEG) were plotted using *heatmap* package. Enrichment analysis for Gene Ontology (GO) terms was performed using *topGO* package from Bioconductor.

Results

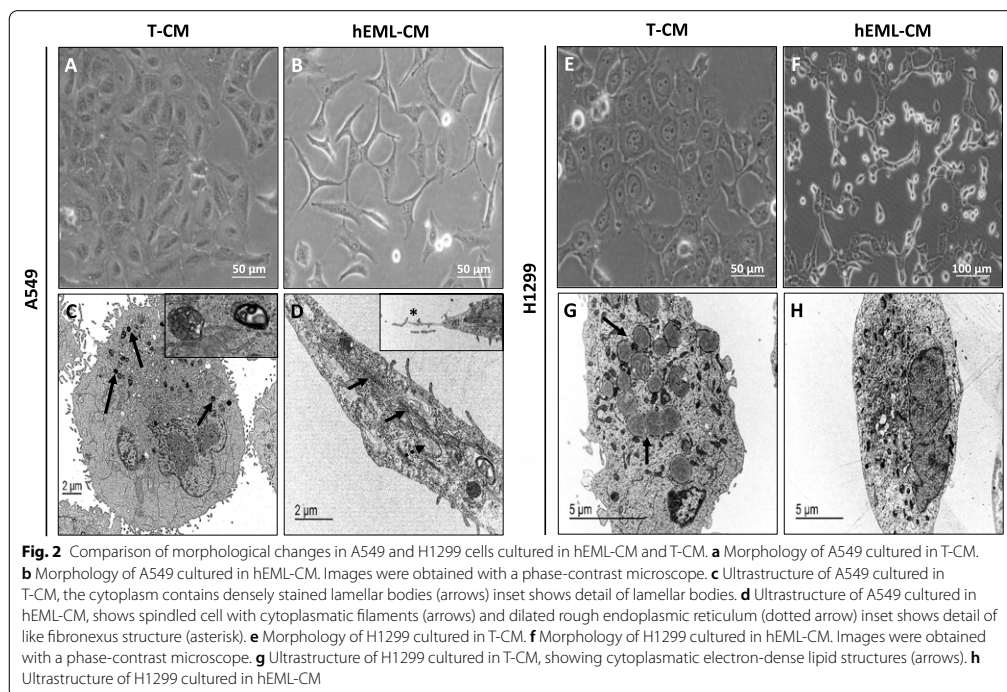
E-cadherin and vimentin in embryonic cells and in hEML-CM

We analyzed the presence of E-cadherin and vimentin in human embryos in the pseudoglandular stage of development prior to obtaining embryonic mesenchymal cells. Confocal microscopy revealed that the mesodermal cells surrounding the endodermal cells were vimentin-positive while the endodermal cells themselves were E-cadherin-positive (Fig. S1). Once the mesenchymal cells had been separated from the epithelial cells, we analyzed the expression of vimentin in the mesenchymal cells and the presence of TGF- β 1 in the culture. The mesenchymal cells displayed the morphological characteristics of mesodermal cells (Fig. 1b), with a high expression of vimentin (Fig. 1c). In addition, TGF- β 1 expression was higher in the hEML-CM than in the T-CM ($p = 0.013$) (Fig. 1d).

Morphological changes in NSCLC cells cultured in hEML-CM

Morphological changes were observed in the A549 and H1299 cells after 24h in the hEML-CM but not in the T-CM (Fig. 2). No significant changes in results were observed between the hEML-CM with and without exosomes or between the T-CM with and without exosomes, indicating that the differences in results between the hEML-CM and the T-CM were not due to the presence or absence of exosomes.

While the A549 cells cultured in T-CM showed no morphological changes (Fig. 2a), those cultured in hEML-CM lost their intercellular junctions and acquired spindle-cell or stellate-cell morphology (Fig. 2b). The



A549 cells cultured in T-CM were round and displayed multilamellar bodies (MLBs) in their cytoplasm (Fig. 2c), while those cultured in hEML-CM did not have MLBs and displayed microfilaments similar to track-like fibronexus structures (Fig. 2d).

The H1299 cells cultured in T-CM grew in a single layer and displayed no morphological changes (Fig. 2e), while those cultured in hEML-CM lost their round morphology and formed long interconnected extensions (Fig. 2f). Those cultured in T-CM showed abundant lipid structures (Fig. 2g), which were not observed in those cultured in hEML-CM (Fig. 2h).

Finally, we performed a TGF- β 1 neutralizing experiment and evaluated the morphology changes in both cell lines (Fig. S2). After neutralization of TGF- β 1 in the hEML-CM no relevant morphological changes were observed in any of the cell lines.

Inhibited cell proliferation and migration in NSCLC cells cultured in hEML-CM

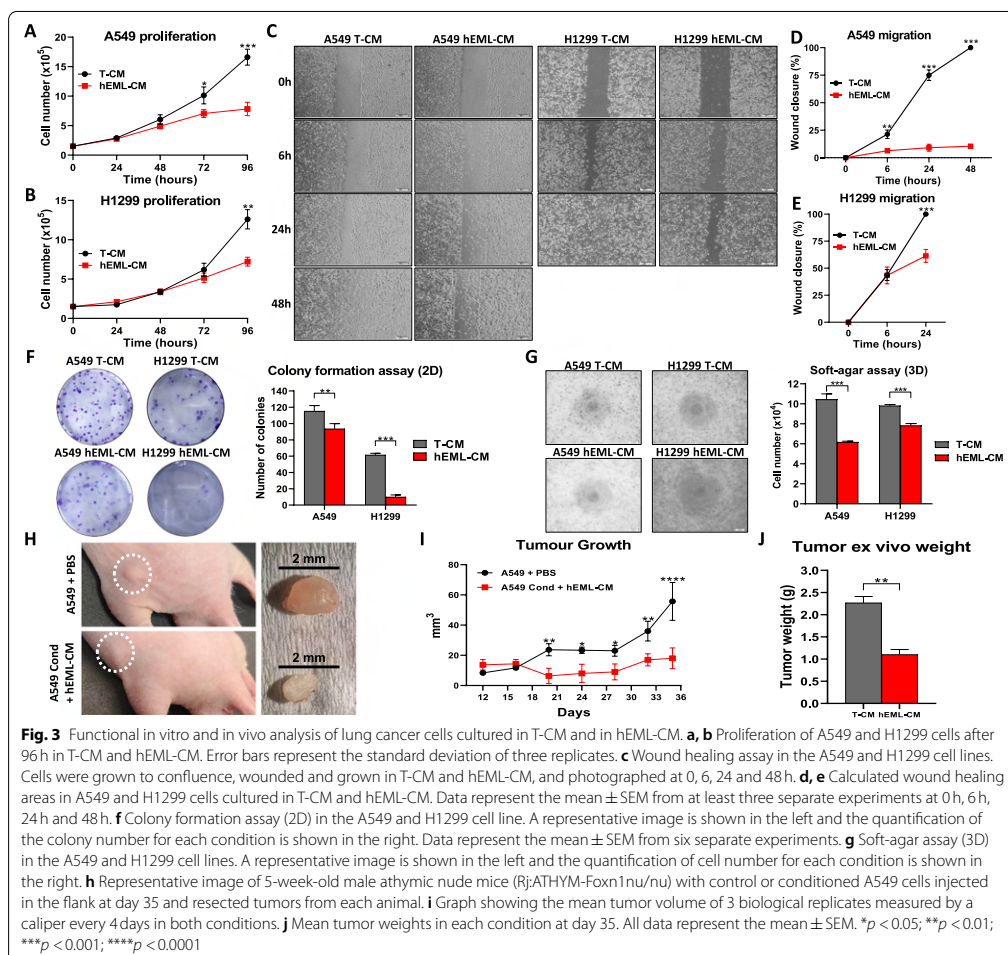
At 48 h, the A549 cells cultured in hEML-CM showed a slightly decreased proliferation compared to those cultured in T-CM. This difference in cell proliferation was significant at 72 h ($p = 0.04$) and 96 h ($p < 0.001$) (Fig. 3a).

At 48 h, the H1299 cells cultured in hEML-CM showed no difference in proliferation compared to those cultured in T-CM. However, at 72 h, there was a slight difference in proliferation, which was significant at 96 h ($p = 0.001$) (Fig. 3b).

The scratch wound healing assay showed that the A549 cells cultured in hEML-CM maintained their mesenchymal morphology and were not confluent at 48 h (Fig. 3c and d). Mesenchymal cells migrate but proliferate very slowly, and these A549 cells migrated towards the center of the scratch wound as in the healing process (Fig. S3). In contrast, the A549 cells cultured in T-CM were completely confluent at 48 h (Fig. 3c). At 24 h, the H1299 cells cultured in hEML-CM were not confluent but those cultured in T-CM were ($p < 0.001$). At 48 h, the H1299 cells were confluent in both in hEML-CM and T-CM, indicating that the H1299 cell line has a higher cell proliferation rate than the A549 cell line (Fig. 3c and e).

Inhibited clonogenic capacity in NSCLC cells cultured in hEML-CM

Clonogenic capacity in 2D and 3D was evaluated using colony formation assay and soft agar assay



respectively. Colony formation assay at 12 days, the A549 cells cultured in hEML-CM showed a mean decrease of 18.5% in the number of colonies compared to those cultured in T-CM ($p = 0.002$; Fig. 3f). At 15 days, the H1299 cells cultured in hEML-CM showed a mean decrease of 83.7% in the number of colonies compared to those cultured in T-CM ($p < 0.001$; Fig. 3f).

In Soft agar-assay at 8 days, the cells cultured in hEML-CM showed a mean decrease of 40.9% for A549 ($p < 0.001$) and 20% for H1299 ($p < 0.001$) in the number of cells compared to those cultured in T-CM (Fig. 3g).

Inhibited in vivo tumor growth of NSCLC cells cultured in hEML-CM

To evaluate the capacity of conditioned cell to growth in vivo, we injected control and conditioned A549 cells subcutaneously in the flank of athymic nude mice and measure the volume each 4 days until day 35. We observed that conditioned medium exerted a significant inhibitory effect on tumor volume in vivo compared with the control group that can be observed from day 16 to 35 ($p < 0.05$ for all measured points; Fig. 3i). Tumors were resected at day 35 from tumor-bearing mice, and a representative image of the flank and of the resected tumor in control and conditioned group can be observed in

Fig. 3h. The weight measure of resected tumors revealed to be significantly lower in the hEML-CM treated group compared with the control group ($p = 0.0033$; Fig. 3j).

Downregulation of OSKM, NKX2-1 and SFTPs, and upregulation of DNMT3A/3B in NSCLC cells cultured in hEML-CM

In the A549 cells cultured in hEML-CM, we observed a significant downregulation of OCT-3/4 ($p = 0.02$), KLF4 ($p = 0.003$) and *c-MYC* ($p = 0.014$), compared to the cells cultured in T-CM, while the downregulation of SOX2 was not significant (Fig. 4a). In the H1299 cells cultured in hEML-CM, only SOX2 ($p = 0.045$) and *c-MYC* ($p = 0.009$) were significantly downregulated compared to the cells cultured in T-CM, while the downregulation of OCT-3/4 and KLF4 was not significant (Fig. 4b).

In order to explore the potential relationship between NKX2-1 levels and the synthesis of lung SFTPs, we analyzed the mRNA expression levels of NKX2-1, SFTPA, SFTPB, SFTPC and SFTPD. NKX2-1 was downregulated in both A549 ($p = 0.029$) and H1299 ($p = 0.041$)

cells cultured in hEML-CM but upregulated in those cultured in T-CM (Fig. 4c and d). SFTPB was downregulated in A549 ($p = 0.022$) cells cultured in hEML-CM and upregulated in those cultured in T-CM (Fig. 4c). SFTPD was downregulated in H1299 cells cultured in hEML-CM compared to those cultured in T-CM but the difference was not significant (Fig. 4d). SFTPA and SFTPC were not expressed in either of the cell lines.

We then analyzed the expression levels of DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) and DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) to explore changes in genes controlling methylation. Both DNMT3A and DNMT3B were upregulated in the A549 cells ($p = 0.036$ and $p = 0.042$, respectively) and in the H1299 cells ($p = 0.003$ and $p = 0.007$, respectively) cultured in hEML-CM compared to those cultured in T-CM (Fig. 4e and f).

In order to detect the surfactant lipid, the A549 and H1299 cells were stained with Oil Red O Solution. Both cell lines cultured in T-CM had a high degree of cytoplasmic staining, while those cultured in hEML-CM showed no staining (Fig. 4g and h).

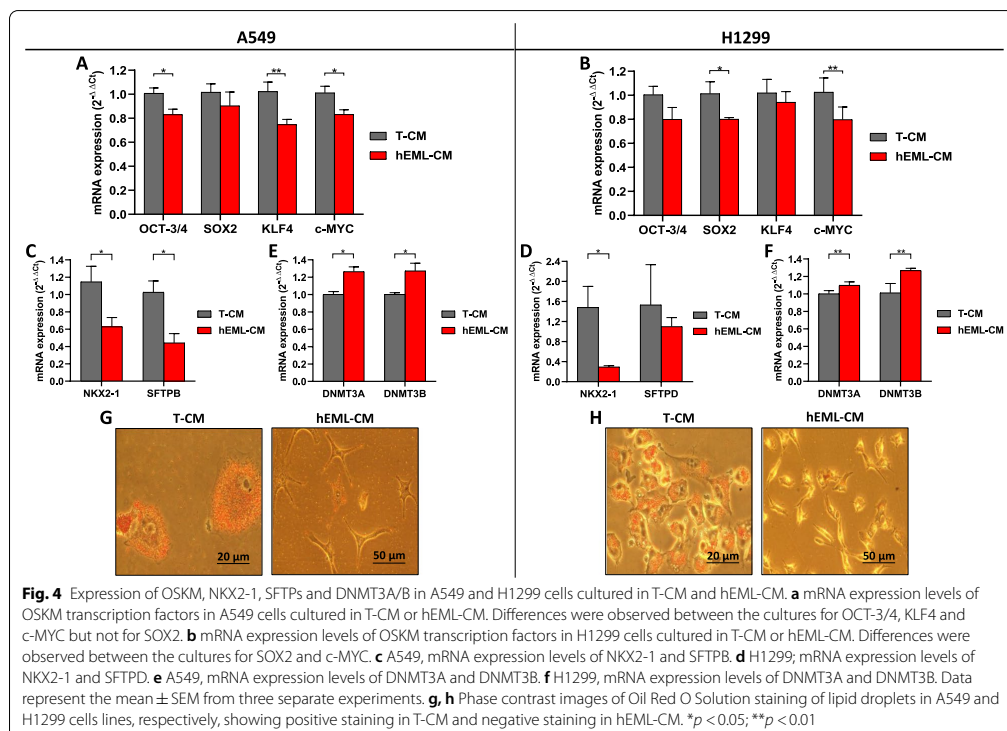
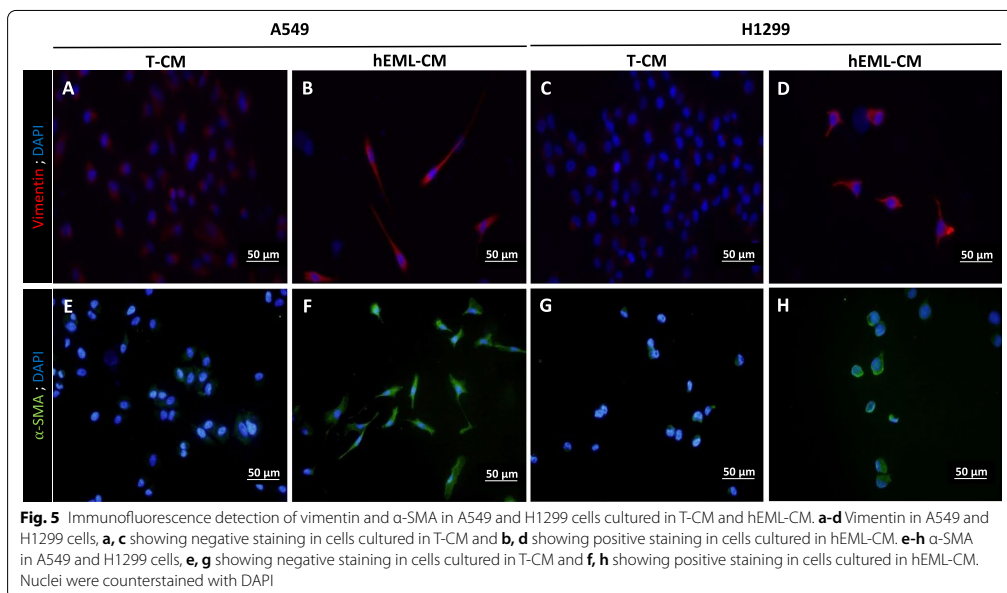


Fig. 4 Expression of OSKM, NKX2-1, SFTPs and DNMT3A/B in A549 and H1299 cells cultured in T-CM and hEML-CM. **a** mRNA expression levels of OSKM transcription factors in A549 cells cultured in T-CM or hEML-CM. Differences were observed between the cultures for OCT-3/4, KLF4 and *c-MYC* but not for SOX2. **b** mRNA expression levels of OSKM transcription factors in H1299 cells cultured in T-CM or hEML-CM. Differences were observed between the cultures for SOX2 and *c-MYC*. **c** A549, mRNA expression levels of NKX2-1 and SFTPB. **d** H1299; mRNA expression levels of NKX2-1 and SFTPD. **e** A549, mRNA expression levels of DNMT3A and DNMT3B. **f** H1299, mRNA expression levels of DNMT3A and DNMT3B. Data represent the mean \pm SEM from three separate experiments. **g, h** Phase contrast images of Oil Red O Solution staining of lipid droplets in A549 and H1299 cells lines, respectively, showing positive staining in T-CM and negative staining in hEML-CM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$



Expression of myofibroblast markers and myosin 4 (MYH4) in NSCLC cells cultured in hEML-CM

The morphology of the A549 and H1299 cells cultured in hEML-CM was similar to that of myofibroblasts. In order to assess the presence or absence of myofibroblast markers in these cells, we analyzed vimentin and α -SMA. The A549 and H1299 cells cultured in hEML-CM showed a higher degree of staining of both markers than those cultured in T-CM (Fig. 5). Vimentin in A549 and H1299 cells, showing positive staining in cells cultured in hEML-CM (Fig. 5b and d), but not in cells cultured in T-CM (Fig. 5a and c). α -SMA in A549 and H1299 cells, showing positive staining in cells cultured in hEML-CM (Fig. 5f and h), but not in cells cultured in T-CM (Fig. 5e and g).

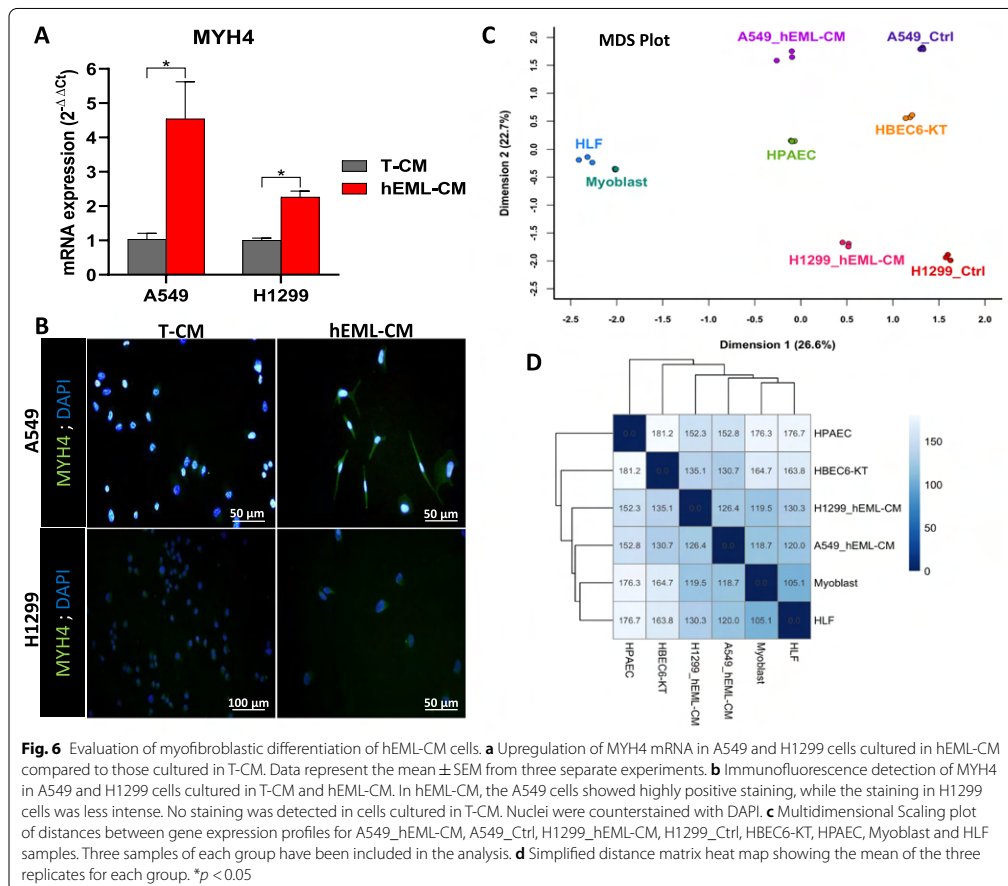
Since myofibroblasts also express myosin heavy chain (MHC) isoforms, we then analyzed the mRNA expression of MYH1, MYH2, MYH3, MYH4, MYH7 and MYH16 in these cells. MYH4 was upregulated in the A549 ($p = 0.033$) and the H1299 ($p = 0.032$) cells cultured in hEML-CM compared to those cultured in T-CM (Fig. 6a). MYH1, MYH2, MYH3, MYH7 and MYH16 were not expressed in either of the cell lines. The A549 cells cultured in hEML-CM showed highly positive staining for MYH4, while the staining in H1299 cells cultured in hEML-CM was less intense. Neither the A549 nor the H1299 cells cultured in T-CM showed staining for MYH4 (Fig. 6b).

Transcriptomic analysis showed that hEML-CM cells approach to myoblasts and lung fibroblasts

In Fig. 6c are showed the results of the Multidimensional cluster analysis performed using the transcriptomic data. Not including hEML-CM cells, we can observe five basic groups from left to right in the graph (Dimension 1): mesenchymal group (HLF and myoblasts); endothelial group (HPAEC); normal epithelial group (HBEC6-KT); A549; and H1299. The closest group to both cancer cell lines was the normal epithelial group. However, the hEML-CM cells (A549 and H1299) moved away from their own control group and from normal epithelial cells, and approaches to the endothelial and mesenchymal groups. The distance matrix analysis revealed that the closest group to hEML-CM cell was the mesenchymal group (Fig. 6d and Fig. S4).

Identification of DEGs between control and hEML-CM treated cells

Differential expression analysis showed that 1631 and 866 genes were differentially expressed ($p < 0.001$; Table S1) in A549 and H1299 cells after treatment with hEML-CM, respectively (Fig. 7a). The top significant 100 DEG for each cell line are showed in Fig. 7b and c. The enrichment analysis for GO terms (Fig. 7d, e and Table S2) showed that the most significantly enriched



GO terms for A549 were related to cell cycle regulation (GO terms: GO:0045786, GO:0051726) and for H1299 with proliferation regulation (GO:0008284, GO:0042127).

Discussion

In his 1983 Rous-Whipple Award Lecture [35], the pathologist GB Pierce proposed for the first time that malignant tumors originated in the stem cells of healthy

tissue. He further suggested that the same mechanisms that control tissue development during embryogenesis also controlled growth and differentiation of tumor stem cells. Following this line of research, in the present study, we have cultured two NSCLC cell lines (A549 and H1299) in hEML-CM and T-CM and explored whether hEML-CM could alter the malignant phenotype of the tumor cells. We observed that both the A549 and H1299 cells cultured in hEML-CM lost their malignant phenotype

(See figure on next page.)

Fig. 7 Transcriptomic analysis to evaluate the effect of hEML-CM. **a** Venn diagram showing the number of common differentially expressed genes between control and hEML-CM treated cells in both cell lines. **b, c** Heat map of top 100 differentially expressed genes in A549 and H1299, respectively. **d, e** Enrichment analysis for Gene Ontology (GO) terms using the top 100 differentially expressed genes in A549 and H1299 cell lines. The numbers indicated in the bars indicate the number of genes included in each GO term

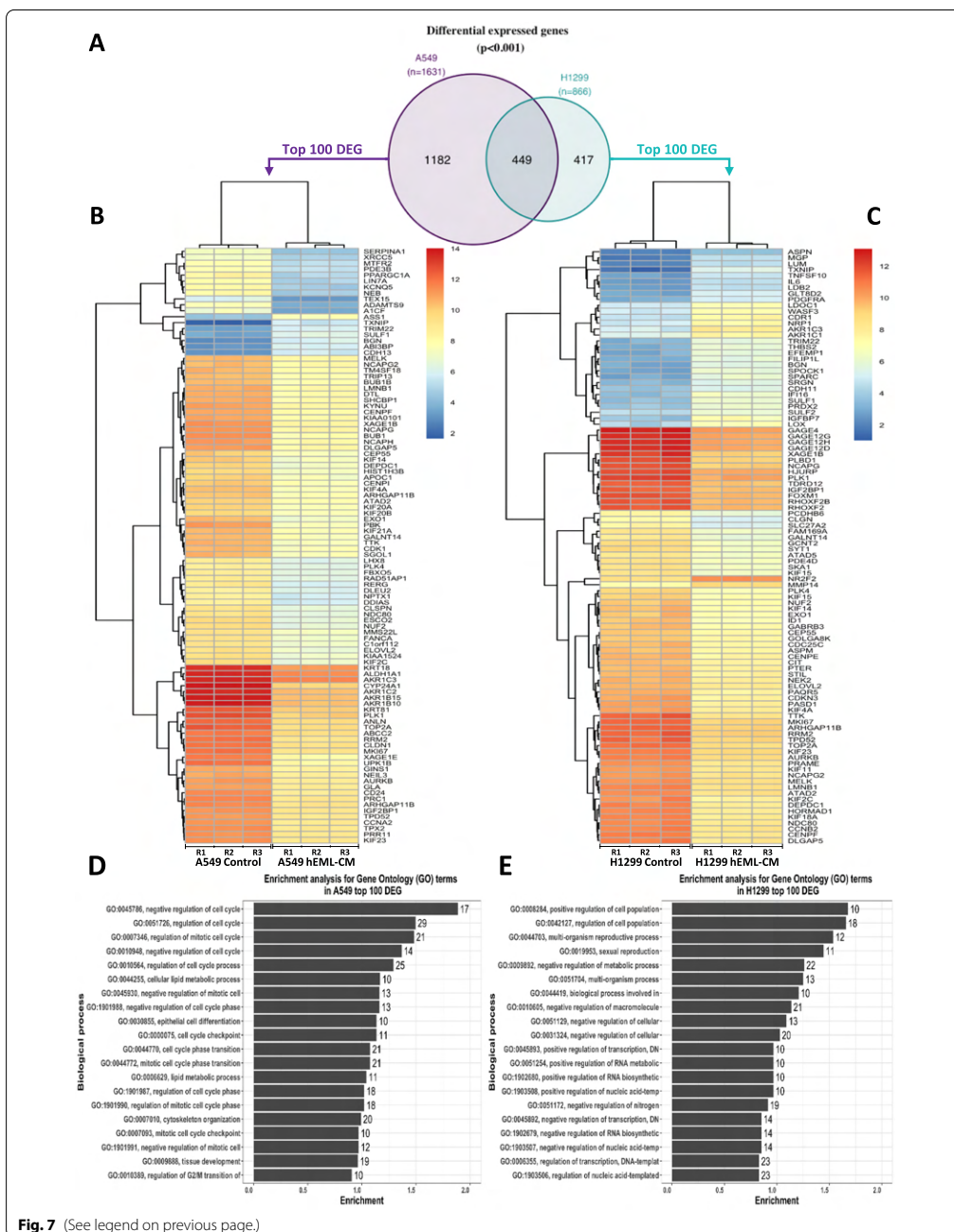


Fig. 7 (See legend on previous page.)

and acquired morphological and molecular characteristics similar to those of mesenchymal cells. Moreover, up to 1182 genes in A549 and 866 genes in H1299 were observed differentially expressed after treatment with hEML-CM. Previous studies had reported that cultures with or without fetal serum had a substantial differential impact on the phenotypes of A549 cells and of murine embryonic stem cells [36], where those cultured in a medium without fetal serum acquired characteristics of alveolar epithelial type II (AII) cells, including the presence of MLBs in the cytoplasm [37–40]. In the present study, the A549 and H1299 cells cultured in hEML-CM lost their epithelial morphology, did not contain MLBs in the cytoplasm, and acquired characteristics of mesodermal cells, including the presence of vimentin and α -SMA, which are hallmarks of myofibroblasts [41, 42]. In contrast, the A549 and H1299 cells cultured in T-CM maintained their epithelial morphology. Moreover, since these morphological changes occurred regardless of whether the hEML-CM contained exosomes, we can speculate that soluble factors - not exosomes - are responsible for the changes.

In the pseudoglandular stage of development of the embryonic lung, the release of TGF- β 1 by mesenchymal cells is essential to lung branching and alveolarization [43]. In our study, the hEML-CM contained high concentrations of TGF- β 1, which could explain why the cells acquired the mesodermal characteristics and increased vimentin and α -SMA expression. In this line, our TGF- β 1 neutralizing experiment (Fig. S2) showing that after inhibition of TGF- β 1 in the hEML-CM no morphological changes were observed, reinforced the potential role of TGF- β 1 in the acquisition of the mesodermal phenotype.

Previous studies showed that TGF- β 1 induces the expression of both vimentin and α -SMA in myofibroblasts [41, 42]. During embryonic development, TGF- β 1 expression is necessary for epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is crucial to normal embryonic development [44]. In adult tissues, however, abnormal TGF- β 1-induced EMT leads to tumor development and progression [43, 45]. In vitro studies have shown that when TGF- β 1 is added to a culture medium, subpopulations of A549 cells begin EMT and cells with a malignant phenotype (stemness) undergo morphological changes, increase their growth, and overexpress pluripotent markers such as OCT-3/4 [38].

In our study, the A549 and H1299 cells cultured in hEML-CM decreased their growth and clonogenic capacity. In this line the results of the transcriptomic profile showed an enrichment of GO terms related with cell cycle and proliferation regulation. Moreover, the treated cells also underexpressed OCT-3/4, SOX2, KLF4 and c-MYC, leading to loss of pluripotency.

These findings lead us to suggest that in addition to TGF- β 1, other factors in hEML-CM must be involved in controlling the phenotype of the different clones present in the A549 and H1299 cell lines. In addition to the downregulation of the OSKM genes, we observed an upregulation of DNMT3A and DNMT3B in the cells cultured in hEML-CM, suggesting that the embryonic medium may contain an epigenetic control mechanism whereby DNMT3A/3B upregulation could silence the genes responsible for pluripotency and activate cell differentiation. This hypothesis is borne out by previous studies demonstrating that DNMT3A/3B cooperate in OCT-3/4 and NANOG promoter methylation during the differentiation of embryonic stem cells and carcinoma cells [46].

The transcription factor NKX2-1, which is essential for the correct development of the embryonic lung, is located in the terminal respiratory units of the epithelial cells [26], where it activates several genes involved in lung physiology, including the lung surfactants SFTPA, SFTPB, SFTPC and SFTPD [47]. NKX2-1 is expressed in 70% of lung adenocarcinomas and can act either as an oncogene or tumor suppressor [27, 48]. The A549 cells have characteristics similar to those of AII cells, including the NKX2-1 mediated expression of lung surfactants. However, the presence of NKX2-1 in A549 cells is still not clear. Some studies have not detected NKX2-1 in A549 cells [49, 50], while others have detected the TTF-1 protein by immunohistochemistry [51] and high NKX2-1 mRNA expression by qRT-PCR [39, 52]. These contradictory findings may be due to the presence of various clones in the A549 cell line, each having different degrees of differentiation and different responses to external stimuli [38, 39]. Along these lines, we have observed a high level of NKX2-1 expression in the A549 and H1299 cells cultured in T-CM, while NKX2-1 expression was downregulated in the majority of cells cultured in hEML-CM. In addition, the assay with Oil Red O Solution showed lung SFTP staining in the cytoplasm of the A549 and H1299 cells that did not undergo morphological changes. In normal and tumor lung tissue, high NKX2-1 levels activate SFTP synthesis [47], but high TGF- β 1 levels inhibit NKX2-1, leading to low SFTP expression [53]. In our study, low levels of NKX2-1 in the cells cultured in hEML-CM were associated with corresponding low staining of SFTPB in the A549 cells and of SFTPD in the H1299 cells. We can speculate that the presence of TGF- β 1 in the hEML-CM is a determining factor in the inhibition of SFTPB and SFTPD and in the morphological transformation of the cells. Previous studies in this line have shown that TGF- β 1 inhibits the synthesis of SFTPs through the interaction of SMAD3 with NKX2-1 [53, 54] and that TGF- β 1 activates genes that are involved in the

differentiation of lung fibroblasts into myofibroblasts [43, 55, 56].

In addition to vimentin and α -SMA, myofibroblasts express several MHC proteins [41, 57, 58]. For this reason, having observed that the A549 and H1299 cells cultured in hEML-CM had positive staining for vimentin and α -SMA, we then analyzed MHC isoform expression by immunofluorescence and qRT-PCR and found that the cells expressed only MYH4, which is expressed in humans after birth but not in embryos. However, we may well have detected MYH8 rather than MYH4, since 90% of the genetic sequence of MYH4 is the same as that of MYH8, which is only expressed in embryonic muscles [58, 59]. In line with these results, we observed that the transcriptomic profile of the hEML-CM cells approaches to myoblasts and to lung fibroblasts. All these results seem to indicate that the lung adenocarcinoma A549 and H1299 cells cultured in an embryonic lung medium begin to differentiate into myofibroblasts. The function of myofibroblasts depends on the microenvironmental stimuli they receive. In the adult lung, they

are associated with several pathologies [60] and have been proposed as markers of good [61] or poor [62] prognosis in lung cancer. Along these lines, a recent study in human pancreatic ductal adenocarcinoma has shown that expression of α -SMA in myofibroblasts is associated with good prognosis, while low expression of α -SMA is linked to worse prognosis [63]. Additionally, in the pseudoglandular and canalicular stages of embryonic lung development, myofibroblasts expressing α -SMA [64, 65] and various MHC isoforms are essential for normal development of the alveolar system [66].

The current therapies in lung cancer and solid tumors in general are mostly focused in inducing apoptosis of highly proliferating tumor cells with the associated handicaps of acquisition of treatment resistance and normal cell-related toxicity. The present results could lead to think new strategies in terms of lung cancer treatment based on the idea of reducing self-replication of lung cancer cells by differentiating them using embryonic factors secreted during lung development. The paradigm of

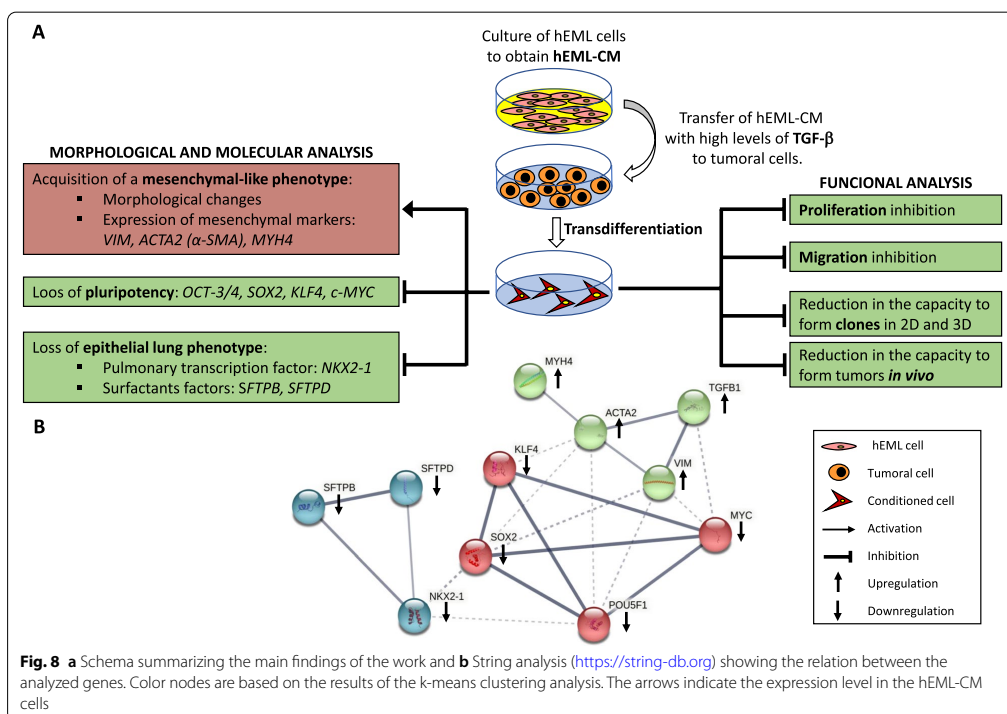


Fig. 8 a Schema summarizing the main findings of the work and b String analysis (<https://string-db.org>) showing the relation between the analyzed genes. Color nodes are based on the results of the k-means clustering analysis. The arrows indicate the expression level in the hEML-CM cells

differentiation therapies is the use of retinoic acid in promyelocytic leukemia [67], which is an important gene during embryonic development. Although, differentiation therapies have been also attempted in other tumors with no relevant clinical results [68], here we are using a different analytical approach: the analysis of embryonic factors from the same organ to identify new molecules with potential treatment use. We have observed that transdifferentiating lung cancer cell lines using embryonic media from embryonic mesenchymal lung cells, significantly reduced their malignant capacities both *in vitro* and *in vivo* (summarized in Fig. 8). Our data serves as a foundation for future studies that will include the identification of the whole set of molecules responsible for the efficiency of this potential therapy and the evaluation of the potential clinical use.

Conclusions

In summary, lung adenocarcinoma cells cultured in an embryonic lung medium lose their epithelial morphology, reduce the expression of the adenocarcinoma markers NKX2-1 and SFTPs, decrease proliferation, downregulate the expression of the OSKM transcription factors, upregulate the expression of DNMT3A/3B and develop mesodermal features that are characteristic of myofibroblasts. Taken together, these findings lead us to conclude that stimuli from the embryonic lung can modulate the malignant phenotype of lung cancer cells. Further studies are warranted to identify the specific embryonic stimuli influencing this process and to determine if there is an embryonic organotropic mechanism that controls tumorigenesis and growth. These findings could lead to new strategies for early detection and treatment of lung cancer tumors.

Abbreviations

NSCLC: Non-small-cell lung cancer; hEML-CM: Human embryonic mesenchymal lung-conditioned medium; OCT-3/4: Octamer-binding transcription factor-3/4; SOX2: SRY-box transcription factor 2; KLF4: Kruppel-like factor 4; OSKM: OCT-3/4, SOX2, KLF4 and c-MYC; hESC: Human embryonic stem cell; NKX2-1: NK2 homeobox 1; TTF-1: Thyroid transcription factor 1; SFTPs: Surfactant proteins; hEML: Human embryonic mesenchymal lung; DPBS 1x: Dulbecco's phosphate buffered saline; T-CM: Tumor-conditioned medium; DMEM: Dulbecco's modified eagle medium; FBS: Fetal bovine serum; PS: Penicillin/Streptomycin; RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640 medium; qRT-PCR: Real-time polymerase chain reaction; PBTx: 0.5% of Triton X-100 in DPBS 1x; BSA: Bovine serum albumin; NDS: Normal donkey serum; α -SMA: Alpha smooth muscle actin; HPAEC: Primary human pulmonary artery endothelial cells; HLF: Human lung fibroblasts; DEG: Differentially expressed genes; GO: Gene Ontology; MLBs: Multilamellar bodies; DNMT3A: DNA methyltransferase 3A; DNMT3B: DNA methyltransferase 3B; MYH4: Myosin 4; MHC: Myosin heavy chain; ATI: Alveolar epithelial type II; EMT: Epithelial-mesenchymal transition.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02206-z>.

Additional file 1 : Figure S1. Human embryonic lung. **a** Confocal image of human embryonic lung in the pseudoglandular stage (E9). **b** Detail showing intensive positive staining for E-cadherin in epithelial cells. **c** Detail showing positive staining for vimentin in mesenchymal cells. The mesenchymal cells were then isolated and cultured for the preparation of the hEML-CM.

Additional file 2 : Figure S2. Morphological study at 48 h after neutralizing TGF- β 1 in A549 and H1299 cultured in T-CM and hEML-CM. When neutralizing antibody was used the morphological changes were considerably reduced in the hEML-CM condition.

Additional file 3 : Figure S3. Scratch wound healing assay in A549 cells cultured in hEML-CM. **a** At 6 h, the cells differentiate and migrate to the center of the scratch wound. **b** At 24 h and **c** 48 h, the cells continue to migrate but there is no cell growth to heal the wound.

Additional file 4 : Figure S4. Complete distance matrix heat map including all analyzed samples.

Additional file 5 : Table S1. List of DEG between control and conditioned cells.

Additional file 6 : Table S2. GO terms identified in the enrichment analysis and the list of DEG genes included in each GO term.

Acknowledgements

The authors thank: Dr. S. Barambio for comments on embryology, D. Fuster for technical help, R. Grupp for language revision. The Body Donation Service of the Department of Human Anatomy and Embryology of the School of Medicine of the University of Barcelona for providing funds for the purchase of laboratory materials. Finally, JC is an APIF fellow from University of Barcelona.

Authors' contributions

J.C. performed the research, the molecular analyses and the statistical and bioinformatic analyses, and wrote the manuscript. A.N. contributed to the study design, supervised the molecular analyses and the statistical and bioinformatic analyses. C.V. and J.M.C. performed the *in vivo* xenograft study. T. D, M.A-P, C.C-F, B.H. and Y.H. collaborated in the research. M.M. designed the study, wrote the manuscript and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the molecular and data analysis. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Funding

This work was supported by grants from the Ministry of Economy, Industry, and Competition, "Agencia Estatal de Investigación" co-financed with the European Union FEDER funds under project no. SAF2017-88606-P (AEI/FEDER, UE) to A.N.; Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Spain), under projects no. RTI2018-099001-B-I00 (J. M. C.); Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades and European Regional Development Fund (ERDF) [CIBERNED and RETICS (Red de Terapia Celular, RD16/0011/0012 to J. M. C.)], Spain; Generalitat de Catalunya (2017SGR-1408 to J. M. C.), Spain.

Availability of data and materials

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Clínic de Barcelona (project approval number HCB/2017/1052). All procedures involving the use of animals were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona and Generalitat de Catalunya (#10995) in compliance with the Spanish (RD 53/2013 & RD

1386/2018) and European (2010/63/EU) regulations for the care and use of experimental animals.

Consent for publication

Clinically aborted embryos and fetuses were donated with written informed consent to the Body Donation Service of the Department of Human Anatomy and Embryology of the School of Medicine of the University of Barcelona for morphological and molecular studies. The consent forms will be provided upon request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript or in the decision to publish the results.

Author details

¹Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain. ²Thoracic Oncology Unit, Hospital Clinic, Barcelona, Spain. ³Laboratory of Stem Cells and Regenerative Medicine, Department of Biomedical Sciences, Creatio, Production and Validation Center of Advanced Therapies, Faculty of Medicine and Health Sciences, Institute of Neurosciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁴August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Barcelona, Spain. ⁵Networked Biomedical Research Centre for Neurodegenerative Disorders (CIBERNED), Barcelona, Spain. ⁶University of Cheng Du, Cheng Du 610106, China.

Received: 20 May 2021 Accepted: 6 December 2021

Published online: 26 January 2022

References

- Cohnheim J. Congenitales, quergestreiftes muskelsarkom der nieren. *Arch Pathol Anatomie Physiol Klin Med.* 1875;65:64–9.
- Durante F. Nesso fisio-patologico tra la struttura dei nei materni e la genesi di alcuni tumori maligni. *Arch Membr Observ Chir Pract.* 1874;1:217–26.
- Murphy JB, Rous P. The behavior of chicken sarcoma implanted in the developing embryo. *J Exp Med.* 1912;15:119–32.
- Milford JJ, Duran-Reynals F. Growth of a chicken sarcoma virus in the chick embryo in the absence of neoplasia. *Cancer Res.* 1943;3:578–84.
- Dolberg DS, Bissell MJ. Inability of Rous sarcoma virus to cause sarcomas in the avian embryo. *Nature.* 1984;309:552–6.
- Mintz B, Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1975;72:3585–9.
- Illmensee K, Mintz B. Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. *Proc Natl Acad Sci.* 1976;73:549–53.
- Monzo M, De Anta J, Peris B, Ruano D. Growth control of embryonic stem cells injected into mouse uterus on fifth day of pregnancy. *Int J Cancer.* 1994;56:387–92.
- Diez-Torre A, Andrade R, Eguizabal C, López E, Arluzea J, Silió M, et al. Reprogramming of melanoma cells by embryonic microenvironments. *Int J Dev Biol.* 2009;53:1563–8.
- Kulesa PM, Kasemeier-Kulesa JC, Teddy JM, Margaryan NV, SefTOR EA, SefTOR RE, et al. Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103:3752–7.
- Lee LM, SefTOR EA, Bonde G, Cornell RA, Hendrix MJ. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev Dyn.* 2005;233:1560–70.
- Hendrix MJ, SefTOR EA, SefTOR RE, Kasemeier-Kulesa J, Kulesa PM, Postovit L-M. Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:246–55.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126:663–76.
- Zhou S, Abdouh M, Arena V, Arena M, Arena GO. Reprogramming malignant cancer cells toward a benign phenotype following exposure to human embryonic stem cell microenvironment. *PLoS One.* 2017;12:e0169899.
- Park I-H, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature.* 2008;451:141–6.
- Hines EA, Sun X. Tissue crosstalk in lung development. *J Cell Biochem.* 2014;115:1469–77.
- Zepp JA, Morrisey EE. Cellular crosstalk in the development and regeneration of the respiratory system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20:551–66.
- Guo Y, Costa R, Ramsey H, Starnes T, Vance G, Robertson K, et al. The embryonic stem cell transcription factors Oct-4 and FoxD3 interact to regulate endodermal-specific promoter expression. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99:3663–7.
- Gontan C, de Munck A, Vermeij M, Grosveld F, Tibboel D, Rottier R. Sox2 is important for two crucial processes in lung development: branching morphogenesis and epithelial cell differentiation. *Dev Biol.* 2008;317:296–309.
- Herriges M, Morrisey EE. Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development.* 2014;141:502–13.
- Bialkowska AB, Yang VW, Mallipattu SK. Krüppel-like factors in mammalian stem cells and development. *Development.* 2017;144:737–54.
- Jean J-C, George E, Kaestner KH, Brown LAS, Spira A, Joyce-Brady M. Transcription factor Klf4, induced in the lung by oxygen at birth, regulates perinatal fibroblast and myofibroblast differentiation. *PLoS One.* 2013;8:e54806.
- Zhang X, Han B, Huang J, Zheng B, Geng Q, Aziz F, et al. Prognostic significance of OCT4 expression in adenocarcinoma of the lung. *Jpn J Clin Oncol.* 2010;40:961–6.
- Li X, Wang J, Xu Z, Ahmad A, Li E, Wang Y, et al. Expression of sox2 and oct4 and their clinical significance in human non-small-cell lung cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13:7663–75.
- Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature.* 2008;455:1069–75.
- Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2002;26:767–73.
- Moisés J, Navarro A, Santasusagna S, Viñolas N, Molins L, Ramirez J, et al. NKX2-1 expression as a prognostic marker in early-stage non-small-cell lung cancer. *BMC Pulmon Med.* 2017;17:1–9.
- Rowland BD, Bernards R, Peepers DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol.* 2005;7:1074–82.
- Limame R, de Beecq KO, Lardon F, De Wever O, Pauwels P. Krüppel-like factors in cancer progression: three fingers on the steering wheel. *Oncotarget.* 2014;5:529.
- Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddlston JM, Pinna CM, et al. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res.* 2011;71:4640–52.
- Leung EL-H, Fiscus RR, Tung JW, Tin VP-C, Cheng LC, Sihoe AD-L, et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One.* 2010;5:e14062.
- Kim I-J, Quigley D, To MD, Pham P, Lin K, Jo B, et al. Rewiring of human lung cell lineage and mitotic networks in lung adenocarcinomas. *Nat Commun.* 2013;4:1–11.
- Ruiz-Martinez M, Navarro A, Marrades RM, Viñolas N, Santasusagna S, Muñoz C, et al. YKTe expression, exosome release, and survival in non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2016;7:51515.
- Castellano JJ, et al. LncRNA quantification from extracellular vesicles isolated from blood plasma or conditioned media. *Long Non-Coding RNAs in Cancer.* New York: Humana; 2021. p. 285–304.
- Pierce G. The cancer cell and its control by the embryo. Rous-Whipple award lecture. *Am J Pathol.* 1983;113:117.
- Winkler ME, Mauritz C, Groos S, Kispert A, Menke S, Hoffmann A, et al. Serum-free differentiation of murine embryonic stem cells into alveolar type II epithelial cells. *Cloning Stem Cells.* 2008;10:49–64A-C.
- Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res.* 1998;243:359–66.
- Tirino V, Camerlingo R, Bifulco K, Irollo E, Montella R, Paino F, et al. TGF-β 1 exposure induces epithelial to mesenchymal transition both in CSCs and non-CSCs of the A549 cell line, leading to an increase of migration ability in the CD133+ A549 cell fraction. *Cell Death Dis.* 2013;4:e620.
- Kondo H, Miyoshi K, Sakiyama S, Tangoku A, Noma T. Differential regulation of gene expression of alveolar epithelial cell markers in human lung adenocarcinoma-derived A549 clones. *Stem Cells Int.* 2015;2015:165867. <https://doi.org/10.1155/2015/165867>.

40. Cooper JR, Abdullatif MB, Burnett EC, Kempell KE, Conforti F, Tolley H, et al. Long term culture of the A549 cancer cell line promotes multimellar body formation and differentiation towards an alveolar type II pneumocyte phenotype. *PLoS One*. 2016;11:e0164438.
41. Badid C, Mounier N, Costa A, Desmoulière A. Role of myofibroblasts during normal tissue repair and excessive scarring: interest of their assessment in nephropathies. *Histol Histopathol*. 2000;15:269–80.
42. Zavadil J, Böttlinger EP. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*. 2005;24:5764–74.
43. Saito A, Horie M, Nagase T. TGF- β signaling in lung health and disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19:2460.
44. Katsuno Y, Derynck R. Epithelial plasticity, epithelial-to-mesenchymal transition, and the TGF- β family. *Dev Cell*. 2021;56:726–46.
45. Chen X-F, Zhang H-J, Wang H-B, Zhu J, Zhou W-Y, Zhang H, et al. Transforming growth factor- β 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancer cells via PI3K/Akt and MEK/Erk1/2 signaling pathways. *Mol Biol Rep*. 2012;39:3549–56.
46. Li J-Y, Pu M-T, Hirasawa R, Li B-Z, Huang Y-N, Zeng R, et al. Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of Oct4 and Nanog. *Mol Cell Biol*. 2007;27:8748–59.
47. Yan C, Whitsett JA. Protein kinase A activation of the surfactant protein B gene is mediated by phosphorylation of thyroid transcription factor 1. *J Biol Chem*. 1997;272:17327–32.
48. Yamaguchi T, Hosono Y, Yanagisawa K, Takahashi T. NKX2-1/TTF-1: an enigmatic oncogene that functions as a double-edged sword for cancer cell survival and progression. *Cancer Cell*. 2013;23:718–23.
49. Tanaka H, Yanagisawa K, Shinjo K, Taguchi A, Maeno K, Tomida S, et al. Lineage-specific dependency of lung adenocarcinomas on the lung development regulator TTF-1. *Cancer Res*. 2007;67:6007–11.
50. Kathuria H, Millien G, McNally L, Gower AC, Tagne J-B, Cao Y, et al. NKX2-1-AS1 negatively regulates CD274/PD-L1, cell-cell interaction genes, and limits human lung carcinoma cell migration. *Sci Rep*. 2018;8:1–15.
51. Fujita J, Ohtsuki Y, Bando S, Ueda Y, Kubo A, Tojo Y, et al. Expression of thyroid transcription factor-1 in 16 human lung cancer cell lines. *Lung Cancer*. 2003;39:31–6.
52. Chen P-M, Wu T-C, Cheng Y-W, Chen C-Y, Lee H. NKX2-1-mediated p53 expression modulates lung adenocarcinoma progression via modulating IKK β /NF- κ B activation. *Oncotarget*. 2015;6:14274.
53. Li C, Zhu N-L, Tan RC, Ballard PL, Derynck R, Minoo P. Transforming growth factor- β inhibits pulmonary surfactant protein B gene transcription through SMAD3 interactions with NKX2.1 and HNF-3 transcription factors. *J Biol Chem*. 2002;277:38399–408.
54. Lopez-Rodriguez E, Boden C, Echaide M, Perez-Gil J, Kolb M, Gauldie J, et al. Surfactant dysfunction during overexpression of TGF- β 1 precedes profibrotic lung remodeling in vivo. *Am J Phys Lung Cell Mol Phys*. 2016;310:L1260–71.
55. Willis BC, duBois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:377–82.
56. Angourani KJ, Mazhari S, Farivar S, Mahini DS, Rouintan A, Baghaei K. Fibroblast-myofibroblast crosstalk after exposure to mesenchymal stem cells secretome. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2018;11:573.
57. Rice NA, Leinwand LA. Skeletal myosin heavy chain function in cultured lung myofibroblasts. *J Cell Biol*. 2003;163:119–29.
58. Lee LA, Karabina A, Broadwell LJ, Leinwand LA. The ancient sarcomeric myosins found in specialized muscles. *Skelet Muscle*. 2019;9:1–15.
59. Schiaffino S, Rossi AC, Smerdu V, Leinwand LA, Reggiani C. Developmental myosins: expression patterns and functional significance. *Skelet Muscle*. 2015;5:1–14.
60. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*. 2007;170:1807–16.
61. Matsubara D, Morikawa T, Goto A, Nakajima J, Fukayama M, Niki T. Subepithelial myofibroblast in lung adenocarcinoma: a histological indicator of excellent prognosis. *Mod Pathol*. 2009;22:776–85.
62. Karvonen HM, Lehtonen ST, Sormunen RT, Lappi-Blanco E, Sköld CM, Kaarteenoja RL. Lung cancer-associated myofibroblasts reveal distinctive ultrastructure and function. *J Thorac Oncol*. 2014;9:664–74.
63. Chen Y, Kim J, Yang S, et al. Type I collagen deletion in α SMA+ myofibroblasts augments immune suppression and accelerates progression of pancreatic cancer. *Cancer Cell*. 2021;39(4):548–65.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.02.007>.
64. Yamada T, Suzuki E, Gejyo F, Ushiki T. Developmental changes in the structure of the rat fetal lung, with special reference to the airway smooth muscle and vasculature. *Arch Histol Cytol*. 2002;65:55–69.
65. McCulley D, Wienhold M, Sun X. The pulmonary mesenchyme directs lung development. *Curr Opin Genet Dev*. 2015;32:98–105.
66. Chen L, Wilson R, Bennett E, Zosky GR. Identification of vitamin D sensitive pathways during lung development. *Respir Res*. 2016;17:1–11.
67. de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus. *Nature*. 1990;347:558–61.
68. de Thé H. Differentiation therapy revisited. *Nat Rev Cancer*. 2018;18:117–27.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

