



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

“ESTUDIO DE LOS MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES IMPLICADOS EN LA ADHESIÓN Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE CARCINOMA PULMONAR NO MICROCÍTICO INDUCIDAS POR TGF β ”

ELIZABETH SALVO BRUGAROLAS



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

“ESTUDIO DE LOS MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES IMPLICADOS EN LA ADHESIÓN Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE CARCINOMA PULMONAR NO MICROCÍTICO INDUCIDAS POR TGF β ”

MEMORIA PRESENTADA POR D^a ELIZABETH SALVO BRUGAROLAS PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE NAVARRA

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Oncología del Centro de Investigación Médica Aplicada y en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Navarra y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 12 de marzo de 2013

Dra. Ana Rouzaut Subirá
Director

Este trabajo ha sido realizado con las siguientes ayudas:

“Ayuda para la formación de personal investigador”, de la Fundación para la Investigación Médica Aplicada (FIMA).

Ministerio de Educación y Ciencia. PET 2007-0269-01.

Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). Ministerio de Ciencia e Innovación.
PI10/02131.

A mi marido Axel

A Sofia

A mi madre

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que de una u otra manera han hecho posible la realización de esta tesis doctoral. En primer lugar, agradezco a la Universidad de Navarra, a la Facultad de Ciencias y al área de Oncología del CIMA, por la oportunidad que me han brindado para realizar este trabajo.

Quiero dar las gracias a mi directora de tesis, Ana Rouzaut, por todo lo que ha hecho por mí durante estos años, por su tiempo, ayuda y esfuerzo para que el trabajo saliera adelante, por sus consejos tanto dentro como fuera del laboratorio. Agradezco también a mis compañeros de laboratorio por su ayuda, su amistad, y por todos los buenos y malos momentos que hemos pasado juntos: a Rafa, por estar siempre tan dispuesto a echar una mano, por compartir y debatir conmigo sobre el mundo de las integrinas; a Álvaro, por su sentido del humor y sus conocimientos sobre casi todo; a Xabi, por su alegría y creatividad que contribuyen mucho al buen ambiente del laboratorio; y de una forma muy especial agradezco a Saray por su gran aportación en la realización de este proyecto, por todo lo que pacientemente me ha enseñado, por sus ideas, su constancia y fortaleza en los momentos difíciles, y por tantas horas que trabajamos juntas en el animalario, que a su lado se me hacían amenas. También quiero agradecer a mis antiguos compañeros del laboratorio: Leti, Marta, Erik, Iván, Eva, Natalia, así como a todos los alumnos internos que han pasado por el departamento.

Quiero dar las gracias también a Digna Biotech, a Javier Dotor, a Esperanza Feijoo y a Iñaki Monreal por facilitarnos los péptidos inhibidores de TGF β , por enseñarnos como utilizarlos y contribuir en el planeamiento de los ensayos con animales. También agradezco al Dr. Peter Altevogt y a John Hazin del German Cancer Research Center (DKFZ), por facilitarnos los anticuerpos inhibidores de LICAM.

Me gustaría también dar las gracias a las personas que comparten el laboratorio 1.03 con nosotros: Ignacio Gil, Inés y Víctor, Maite, Jovanna, Yolanda, Oskar, Alejandro y Francesco; a nuestros vecinos de la sala de cultivos: Karmele, Carolina, Cristina, Suzana, Silve, y Naiara; y a todas las demás personas del departamento de Oncología. Gracias también a las personas del laboratorio 4.07: Elena, María, Ainhoa, Sarai, Daniela e Iker, con

quienes me reuní muchos días a la hora de comer y pasé muy buenos ratos; a las secretarias de nuestro departamento: Marisol y Leticia; al servicio de morfología e imagen: Ainhoa, Cristina y Kino; a Marije, Sylvie, de recepción; al personal del animalario, de mantenimiento y limpieza, ya que sin el trabajo de todos ellos sería muy difícil realizar el nuestro. Además no puedo olvidarme de mis compañeros de máster con quienes compartí los primeros pasos de la tesis: Fer, Olalla, Mariana, José Luis, Marina, Yendi, Iván y Miriam.

También como alumna de “Personal Investigador en Formación” quiero agradecer al departamento de Bioquímica por la oportunidad que me ha brindado para conocer más de cerca la docencia y descubrir cómo de bonita es la tarea de un profesor; la verdad es que he disfrutado mucho ayudando en las clases. Gracias Silvia y a todos mis compañeros de prácticas.

A lo largo de estos años en Pamplona también he podido conocer a mucha gente increíble y hacer buenos amigos, quienes me han ayudado a que me sintiera como en casa: a mis ex-compañeras de piso: Elena, Leti, Laura, Susana, Mónica, Teresa, Maria Grazia y a sus novios, ahora ya maridos: César, Maxi, Eduardo, David y Federico; a mis compañeras de pádel y de tenis Marian y Miriam, a D. Fermín, por sus consejos y apoyo, a los profesores de pintura Rudi y Manolo; a Stephi, Camilo, Fabio, Juliana, Pablo, Helen, Alex, Pini, Orlando, Alejandra, Camila, José Antonio, Teresa... Agradezco también a mis amigos en Brasil, que a pesar de la distancia física siempre han estado cerca, con su amistad y apoyo.

Muchas gracias a mi querida familia de Panamá: mis suegros y cuñados, los tíos y primos de mi marido, por su cariño e interés por nosotros. Muchas gracias Mechy por venir a cuidar de Sofía y de nosotros en verano, lo disfrutamos mucho. Agradezco también a mis tíos Ignacio, Beatriz, Manolo, Clara, Inma, Ramón, Antonio, Concepción, Javier, Joana y todos mis primos, por los días de vacaciones en verano que hemos pasado juntos, y los partidos de *King* que jugamos durante esos días: ¡Muchas gracias por todo!

Quiero agradecer también de todo corazón a mi madre por todo lo que ha hecho y sigue haciendo por mí, por todo su ánimo y apoyo en todos los momentos, a mis queridos hermanos y cuñados: Pat y Nando, Bato y Fe, y Alex y Le, y todos mis sobrinos: Bel, Laura, Gui, Helena, Tomás, Henrique, Felipe, Rodrigo, João y Malu.

Finalmente, quiero agradecer de una manera muy especial a las dos personas más importantes de mi vida: mi marido Axel por estar siempre a mi lado, por su gran ayuda, su optimismo y buen humor; y a Sofía, que es la alegría de nuestra casa. ¡Cuando sea mayor, ya le contaré sobre la tesis, seguro que le encantará!

ABREVIATURAS

ActR	Receptores de activina
ADAMTS	Desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina
AKT	Proteína quinasa B (PKB)
ALK	Quinasa de linfoma anaplásico
AMHR-II	Receptor de la hormona antimulleriana tipo II
angptl4	Proteína 4 de tipo angiopoyetina
AP-1	Proteína activadora 1
BCA	Ácido bicinconínico
BMP	Proteína morfogénica de hueso
CCL	Ligando de quimiocina CC
CCR	Receptor de quimiocina CC
CD31 (PECAM-1)	Molécula de adhesión plaquetaria y endotelial
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
CXCL	Ligando de quimiocina CXC
CXCR	Receptor de quimiocina CXC
DAB	Diaminobencidina
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERK	Quinasas MAP reguladas por señal extracelular
ESAM	Molécula de adhesión de la célula endotelial
FAK	Quinasa de adhesión focal
FGFR	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FOXC2	Proteína con dominio de cabeza de horquilla C2
GFP	Proteína fluorescente verde
hFGF	Factor de crecimiento fibroblástico humano
HIF1- α	Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia

ICAM	Molécula de adhesión intracelular
IGF2	Factor de crecimiento insulínico de tipo 2
IL-1	Interleucina-1
ITG	Integrina
JAM-A	Molécula de adhesión celular de unión tipo A
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
LAMB1	Laminina, subunidad β 1
LAP	Péptido Asociado a la Latencia
LEC	Célula endotelial linfática
LTBP	Proteína de Unión al TGF β Latente
LYVE-1	Receptor hialurónico endotelial vascular linfático tipo 1
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MMP	Metaloproteasa
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol
NF κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NSCLC	Carcinoma pulmonar no microcítico
PAL-E	Pathologische anatomie Leiden-endothelium, marcador de endotelio vascular.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
RGD	Dominio formado por los aminoácidos Arg-Gly-Asp
ROCK	Proteína Rho quinasa
SELE	E-selectina
SPARC	Proteína ácida secretada y rica en cisteínas
SRC	Familia de proteínas tirosina quinasa
T β R	Receptor de TGF β
TBS	Tampón tris salino
TEM	Transición epitelio-mesénquima

TGF β	Factor de crecimiento transformante β
TGFBI	Proteína inducida por TGF β
THBS	Trombospondina 1
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteasas
TKI	Inhibidor de tirosina quinasa
TM	Temperatura de fusión
TNC	Tenascina C
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
TRITC	Isotiocianato de tetrametilrodamina
TSP-1	Trombospondina 1
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular tipo 1
VCAN	Versicano
VE-cadherina	Cadherina tipo 2 del endotelio vascular
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
ZEB	Proteína de dedos de Zinc con homeodominio potenciador de la proteína de unión

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. El Factor de Crecimiento transformante beta (TGFβ)	3
1.1. Receptores de TGFβ	4
1.2. Vías de señalización mediadas por TGFβ	5
1.2.1. Vía de señalización canónica	5
1.2.2. Vía de señalización no canónica	6
1.3. El TGFβ en el desarrollo tumoral	7
1.3.1. Resistencia a la citostasis y progresión del ciclo celular inducidos por TGF β	9
1.3.2. Escape a la vigilancia inmunológica	10
1.3.3. Función del TGF β en la supervivencia de las células tumorales	10
1.3.4. Función del TGF β en la angiogénesis tumoral	11
1.3.5. TGF β e inestabilidad genómica	12
1.3.6. Inmortalidad de las células tumorales mediada por TGF β	12
1.3.7. Participación del TGF β en la reprogramación del metabolismo energético	13
1.3.8. Inducción por TGF β de la TEM de células tumorales de origen epitelial	14
1.3.9. Efecto del TGF β en la invasión tisular y metástasis	15
2. Los vasos linfáticos como vía de metástasis tumoral	15
2.1. Estructura y función de los vasos linfáticos	15
2.2. Mecanismos que contribuyen a la metástasis linfática	17
3. La adhesión y migración celular en la progresión tumoral	18

4. El papel de las integrinas en la regulación de la adhesión y migración celular	19
4.1. Función de las integrinas en la regulación de la respuesta celular frente al TGFβ	20
4.2. Participación de las integrinas en la progresión tumoral	21
4.2.1. Regulación de la supervivencia celular y apoptosis mediadas por integrinas	21
4.2.2. Función de las integrinas expresadas por células del estroma tumoral	22
4.2.3. Bloqueo de integrinas como terapia frente al cáncer	23
5. Cáncer de pulmón	24
5.1. Epidemiología y factores de riesgo	24
5.2. Clasificación de los tipos de cáncer de pulmón	26
5.3. Diagnóstico y el sistema TNM de estadificación del cáncer	26
5.4. Tratamiento del cáncer de pulmón	27
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. Cultivos celulares de líneas tumorales y de endotelio linfático de pulmón humano	35
2. Tratamientos celulares utilizados	35
2.1. Tratamiento con TGF β y sus inhibidores	35
2.2. Tratamientos sobre HMVEC-Lly	36
2.3. Tratamientos con quimioterápicos	36
3. Determinación de la viabilidad celular	37
3.1. Ensayo de caspasa 3/7	37

3.2. Medida de la viabilidad por incorporación del colorante vital rojo neutro	37
3.3. Ensayo de proliferación celular MTT	38
4. Determinación de la expresión génica	39
4.1. Extracción y purificación de RNA total	39
4.2. Retrotranscripción	39
4.3. Reacción en cadena de la polimerasa, PCR convencional	39
4.4. Electroforesis de DNA en geles horizontales de agarosa	40
4.5. Detección de la expresión génica mediante arrays basados en PCR cuantitativo	41
4.6. PCR a tiempo real	42
4.7. Transfecciones estables de células H157	43
5. Determinación de la expresión de proteínas	47
5.1. Extracción de proteínas y Western Blot	47
5.2. Citometría de flujo	50
6. Ensayos funcionales	50
6.1. Actividad proteolítica	50
6.1.1. Zimografía	50
6.1.2. Ensayo de degradación de matriz de gelatina fluorescente	51
6.2. Ensayos de adhesión	52
6.2.1. Adhesión de células H157 a proteínas de matriz extracelular	52
6.2.2. Adhesión de células H157 al endotelio linfático de pulmón	53

6.3. Ensayos de migración	53
6.3.1. Migración a través de proteínas de matriz extracelular	53
6.3.2. Transmigración a través de monocapas de endotelio linfático de pulmón	54
6.3.3. Boqueo de transmigración con agentes químicos o anticuerpos bloqueantes	54
6.3.4. Ensayo de proliferación independiente de sustrato en agar blando	54
7. Experimentos en modelos animales	55
7.1. Modelo de metástasis a ganglios poplíteos	55
7.2. Modelo ortotópico de inyección de células de carcinoma escamoso de pulmón humano H157 en pulmones de ratones atímicos	56
7.3. Análisis de la afectación pulmonar mediante micro-tomografía axial computarizada	57
7.4. Análisis histológico	57
7.5. Análisis del crecimiento del tumor primario en los pulmones de los ratones	58
8. Análisis por microscopía de fluorescencia	58
8.1. Microscopía de fluorescencia	58
8.2. Microscopía láser de barrido confocal	59
8.3. Microscopía confocal a tiempo real	60
9. Análisis estadístico	60
RESULTADOS	61
PARTE 1- Estudio in vitro de las alteraciones en la capacidad de adhesión y migración de células de NSCLC humano tratadas con TGFβ.	65
1.1. Activación de la vía de señalización del TGFβ en células de NSCLC	63

1.2. Ensayos funcionales	64
1.2.1. Efecto del tratamiento con TGF β en la proliferación y resistencia a la apoptosis	64
1.2.2. Cambios en el citoesqueleto de NSCLC tras el tratamiento con TGF β	65
1.2.3. Ensayos de resistencia a quimioterápicos mediada por TGF β	66
1.2.4. Efectos del TGF β en la adhesión de células de carcinoma de pulmón a distintas matrices	67
1.2.5. Influencia del TGF β en la migración de células NSCLC	68
1.2.6. Actividad metaloproteasa inducida por TGF β	69
1.2.7. Ensayo de formación de colonias independiente de anclaje	70
1.3. Estudio de los cambios en la expresión de integrinas y en la adhesión a monocapas de endotelio linfático tras el tratamiento con TGFβ	71
1.3.1. Análisis de la expresión de diferentes integrinas en la superficie de las células de NSCLC tratadas con TGF β	71
1.3.2. Activación de vías de señalización inducidas por integrinas implicadas en adhesión y migración	72
1.3.3. Efecto del TGF β en la adhesión y trans migración de células H157 a través del endotelio linfático	73
1.4. Expresión de receptores de quimiocinas y quimiotaxis de células tumorales H157 hacia células de endotelio linfático	75
1.5. Estudio transcriptómico restringido a la expresión de moléculas de adhesión y de proteínas de la matriz extracelular por células H157 tratadas con TGFβ	76
PARTE 2- Intervención de la integrina β3 en las alteraciones en la motilidad y adhesividad de células de NSCLC tratadas con TGFβ	78
2.1. Uso de anticuerpos bloqueantes frente a integrinas en experimentos de trans migración de células H157	78
2.2. Silenciamiento en células H157 de la expresión de la integrina β3	79
2.3. Estudio dinámico de la migración y trans migración de células de NSCLC pretratadas con TGFβ. Relevancia de la expresión de la integrina β3	81

PARTE 3- Estudio morfológico de la unión de células tumorales al endotelio linfático	86
3.1. Estudio de la expresión de ligandos de integrina en células de endotelio linfático tratadas con TGFβ	86
3.2. Unión de células tumorales al endotelio linfático. Posible participación de la integrina αvβ3	87
3.3. Ruta de trans migración de células H157 a través de LECS	89
PARTE 4- Establecimiento de un modelo murino ortotópico de cáncer de pulmón y estudio de la aparición de metástasis en ganglios linfáticos	91
4.1. Inyección de células tumorales en las almohadillas de las patas traseras del ratón	91
4.2. Implantación ortotópica de células tumorales en el pulmón	92
4.2.1. Efecto de los tratamiento con los inhibidores de TGFβ p17 y p144 en la cicatrización post-cirugía de los animales	92
4.2.2. Estudio del crecimiento tumoral y supervivencia de los ratones	94
<i>Curvas de supervivencia</i>	94
<i>Área tumoral y micro-CT</i>	96
4.2.3. Metástasis de células tumorales a ganglios linfáticos	99
DISCUSIÓN	105
1. Integración de la respuesta fenotípica y genómica de células de NSCLC a TGFβ	107
2. El tratamiento con TGFβ incrementa el dinamismo celular	110
3. Estudio <i>in vivo</i> del efecto del TGFβ y de la participación de la integrina β3 en la progresión tumoral	113
4. La vía de señalización del TGFβ como diana terapéutica frente al cáncer	119
5. Crítica al modelo experimental utilizado	121
CONCLUSIONES	127

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
ANEXOS	153
PUBLICACIONES	165

INTRODUCCIÓN

1. El factor de crecimiento transformante beta (TGF β)

La familia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) está constituida por una serie de proteínas integradas por más de 35 citoquinas que incluye las activinas, las inhibinas, la proteína morfogénica de hueso (BMP), la hormona antimulleriana, una glicoproteína presente en los embriones masculinos responsable de la inhibición del desarrollo de los conductos de Müller, y el factor de crecimiento transformante β . Todas ellas regulan una gran cantidad de actividades biológicas, como son la proliferación, la migración y la apoptosis de diferentes tipos celulares, tanto en el estado adulto como durante el desarrollo embrionario (Hinck, 2012).

El TGF β es considerado una citoquina multifuncional (pleiotrópica) debido a los efectos que tiene sobre los diferentes tipos celulares. En mamíferos, se han descrito tres isoformas del TGF β (β 1, β 2 y β 3) que son altamente homólogas entre sí y comparten una región C-terminal rica en cisteínas. Aunque hay una gran similitud entre ellas, los genes que los codifican están localizados en cromosomas diferentes (regiones cromosómicas 19q13, 1q41 y 14q24 respectivamente). Las distintas isoformas del TGF β comparten funciones biológicas entre las que destacan el control de la proliferación celular y la inducción de síntesis de colágeno. Sin embargo, también varían su expresión según las necesidades del organismo, por ejemplo, el TGF β 1 se expresa principalmente en respuesta a un daño, mientras que la expresión de las isoformas 2 y 3 se relaciona con procesos fisiológicos, como el control hormonal y la diferenciación celular (Hinck, 2012; Sporn y Roberts, 1992).

El factor TGF β 1 es el inhibidor más potente de proliferación de células mieloides, mesenquimales, epiteliales, linfoides, endoteliales y varios tipos de células transformadas. Por el contrario, puede estimular la proliferación de fibroblastos normales y de células no epiteliales. Otra función destacada es la síntesis y el depósito de proteínas de la matriz extracelular y la inducción de la expresión de integrinas y receptores que median las interacciones celulares con la matriz extracelular (Horbelt *et al*, 2012). El TGF β también es capaz de regular la expresión de genes como jun-B, c-fos y c-Myc, y de regular la actividad de proteínas transductoras de señales intracelulares como por ejemplo, el recambio de inositol trifosfato (IP3), la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb) o la activación de proteínas G (Peralta *et al*, 2001).

El factor TGF β se sintetiza como una molécula inactiva unida al péptido asociado a la latencia (LAP). Este péptido se encuentra anclado a la matriz extracelular mediante la proteína de unión al TGF β latente (LTBP). El TGF β se activa para unirse a su receptor cuando se separa de estas moléculas por proteólisis que puede ser inducida por varios factores, como son el pH extremo, las altas temperaturas, la contracción celular o la desglicosilación de LAP (Buscemi *et al*, 2011; Ignatz y Honeyman, 2000). También existe un mecanismo particular de activación iniciado por la unión del complejo latente del TGF β 1 a la glicoproteína de matriz extracelular llamada trombospondina 1 (TSP-1) (Gálvez-Gastlum *et al*, 2004).

1.1. Receptores de TGF β

Se han descrito tres tipos de receptores de TGF β : T β RI, T β RII y T β RIII. El genoma humano codifica siete receptores de tipo I (ALKs 1-7) y cinco receptores de tipo II (ActR-IIA, ActR-IIB, BMPR-II, AMHR-II y T β RII) que se dimerizan en diferentes combinaciones formando los complejos receptores para los diversos miembros de la familia del TGF β . En células de mamíferos, los receptores T β RI ALK 5 y T β RII son los responsables de los efectos biológicos del TGF β 1 (Massagué, 2012).

Los receptores tipo I y tipo II son bastante similares entre sí, ambos son glicoproteínas transmembrana de un único segmento, en las que el dominio citoplasmático C-terminal contiene proteínas serina-tirosina quinasa mientras que la región extracelular de estos receptores contiene diez o más cisteínas. Los receptores tipo I se distinguen por la presencia de 30 aminoácidos, conocidos como “dominio GS”, que preceden al dominio quinasa. Durante la activación del complejo de receptores por unión de ligando, el receptor tipo II se autofosforila y fosforila a su vez a los residuos de serina y tirosina del dominio GS del receptor tipo I, permitiendo la propagación de la señal. Esta fosforilación del receptor tipo I conlleva un cambio conformacional del sitio de unión al inhibidor FKBP12 localizado en el dominio GS de manera que, en lugar del inhibidor, pueda unir proteínas de la familia Smad (Massagué *et al*, 2006).

Los receptores tipo III son correceptores de la vía de señalización del TGF β . Se conocen dos tipos de receptores tipo III: los β -glicanos y la endoglina. Los β -glicanos son proteoglicanos de membrana y están ampliamente distribuidos en células mesenquimales,

epiteliales y neuronas. Se unen a TGF β a través de su dominio extracelular de 100 kDa, poseen una región transmembrana y un dominio citoplasmático corto que no participa en la transducción de señales, pero al que recientemente se ha adscrito una función importante en la regulación de procesos celulares como apoptosis y migración celular (Bilandzic y Stenvers, 2011). La principal función de los β -glicanos es mediar la señalización de TGF β , BMP e inhibinas en diferentes tipos celulares. Estos receptores aumentan la unión de las tres isoformas de TGF β al complejo receptor formado por T β RI y T β RRII, pero son especialmente necesarios para incrementar la afinidad y actividad del TGF β 2 (Bilandzic y Stenvers, 2011; Gálvez-Gastlum *et al.*, 2004).

Otro receptor auxiliar de TGF β es la proteína endoglina. La endoglina es una glicoproteína de membrana con un dominio extracelular largo, una región transmembrana y una cola citoplasmática corta. La endoglina tiene una homología alta con los β -glicanos en la secuencia de aminoácidos de los dominios transmembrana y citoplasmático. El dominio extracelular contiene un dominio NH₂ terminal que permite su unión con los miembros de la familia del TGF β , y un dominio llamado ZP, de 260 aminoácidos, con 8 residuos cisteínicos conservados próximos a la región transmembrana, que contiene un dominio Arg-Gly-Asp (RGD) y que permite la unión a integrinas (Rossi *et al.*, 2012).

La proteína endoglina aparece en la membrana celular en forma de homodímeros unidos por enlaces disulfuro. Al contrario de los receptores T β RI y T β RRII, la endoglina no contiene dominios enzimáticos, aunque posee residuos de serina y treonina que pueden ser fosforilados por quinasas de los receptores de TGF β . Se puede unir a TGF β 1, TGF β 3, activina-A, BMP-2, BMP-7 y BMP-9 (Pérez *et al.*, 2010).

1.2. Vías de señalización mediadas por TGF β

1.2.1. Vía de señalización canónica

Todas las células normales y la mayoría de las células neoplásicas tienen receptores para el TGF β en su superficie (Zi y Chapnick, 2012) y existe una gran variedad de respuestas fisiológicas a esta citoquina dependiendo del tipo celular y las condiciones ambientales. Como se observa en la figura I1, la fosforilación en el receptor tipo I tras la unión de éste con

el receptor tipo II (Zi y Chapnick, 2012), promueve las actividades tirosina quinasas que fosforilan a los factores de transcripción Smad 2 y Smad 3. Una vez activadas, estas proteínas forman un complejo con Smad 4 para translocarse desde el citoplasma hacia el núcleo, en donde interactúan de una manera específica con factores de transcripción tales como AP-1, Snail y Slug. Los factores de transcripción a su vez, regulan la transcripción de genes de respuesta al TGF β . De este modo, la inducción de TGF β regula funciones biológicas celulares tan variadas como la diferenciación, el control del crecimiento, la apoptosis celular y la síntesis de matriz extracelular, entre otras (Zhu y Burgess, 2001).

Las proteínas Smad son las principales transductoras de la señalización del TGF β . Existen ocho proteínas Smad en vertebrados (Smad 1-8) que han sido agrupadas según sus funciones en proteínas Smad activadas por receptor o R-Smad (Smad 1, 2, 3, 5 y 8), proteína Smad mediadora común o C-Smad (Smad 4) y, finalmente, proteínas Smad inhibitorias o I-Smad (Smad 6 y 7) (Gálvez-Gastlum *et al*, 2004). La activación de las R-Smad también varía: Smad 2 y Smad 3 se activan por fosforilación de su segmento C-terminal mediada por el receptor T β RI y por el receptor ActRIB. Smad 1, Smad 5 y Smad 8 son activadas por fosforilación desde los receptores con actividad quinasa similar al receptor de activina: Alk1, Alk2 o por las proteínas BMP. (Massagué *et al*, 2006; Miyazono *et al*, 2000).

1.2.2. Vía de señalización no canónica

Además de activar la vía de señalización clásica de las proteínas Smad, el TGF β es capaz de alterar el comportamiento celular a través de vías de señalización alternativas. Las principales vías no-canónicas descritas hasta el momento están representadas en la figura I1 e incluyen la activación de las MAP quinasas: ERK1, ERK2, p38 MAPK y JNK; la activación de proteínas relacionadas con las vías de señalización implicadas en funciones de supervivencia y crecimiento: PI3K, AKT/PKB y mTOR; y la activación de las proteínas de unión a GTP: Ras, RhoA, Rac1 y Cdc42. Además, también se pueden activar las vías de NF κ B y de proteínas tirosina-quinasas como FAK, Src o Abi, en células mesenquimales, epiteliales o en células tumorales. (Tian *et al*, 2011).

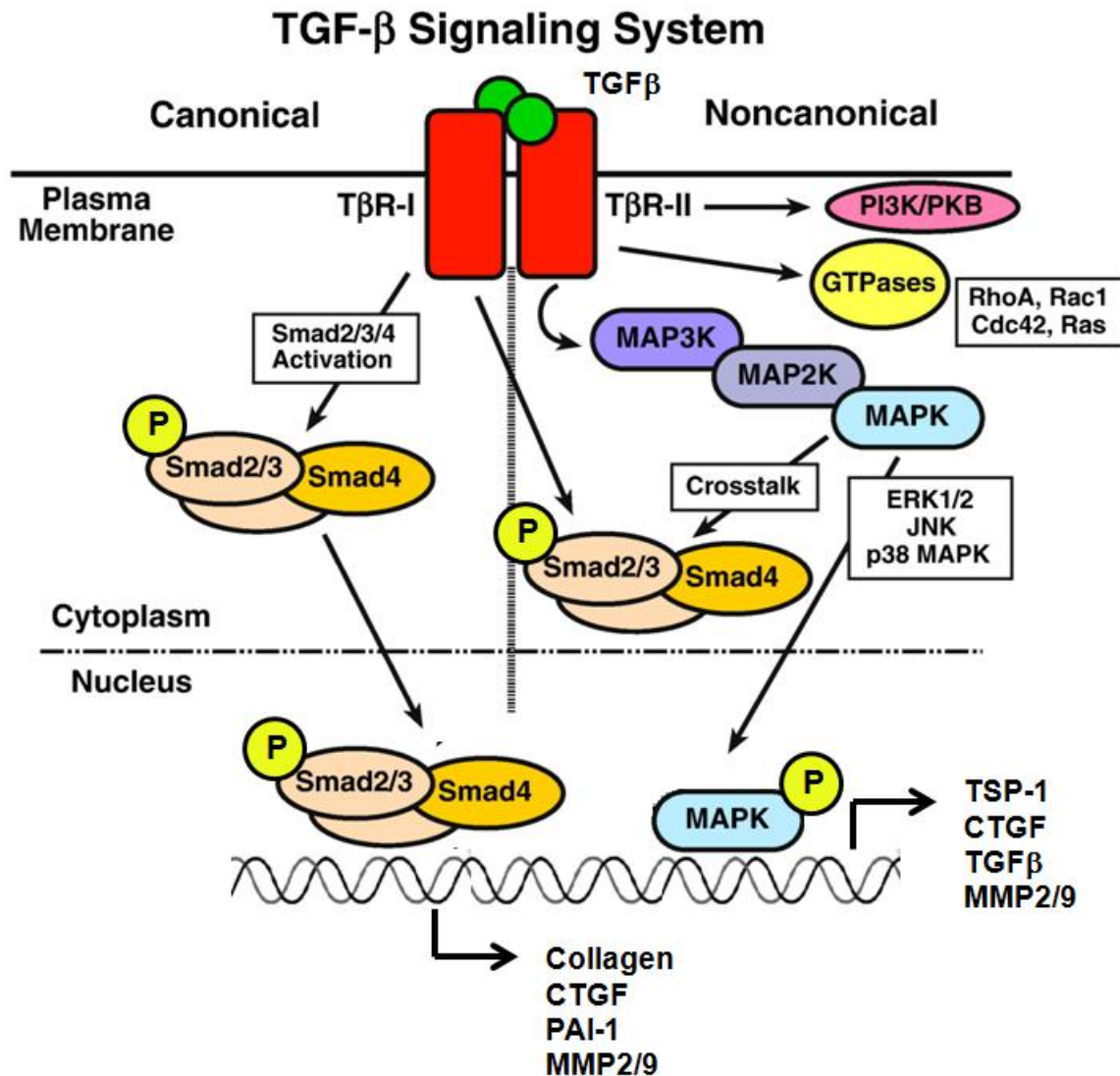


Figura II. Algunas de las vías de señalización canónica y no canónica inducidas por TGF β . Modificada de (Tian *et al*, 2011; Doyle *et al*, 2012).

1.3. El TGF β en el desarrollo tumoral

El cáncer es un conjunto de enfermedades derivadas del crecimiento excesivo y descontrolado de un grupo de células que invaden tejidos y causan daños a órganos vitales. Hanahan y Weinberg (Hanahan y Weinberg, 2011) describieron cómo durante el desarrollo de los tumores humanos las células neoplásicas adquieren diez propiedades necesarias para la supervivencia y el establecimiento del cáncer. Éstas son: 1- la señalización constante hacia proliferación, 2- la evasión de los mecanismos supresores de crecimiento, 3- el escape del ataque mediado por el sistema inmunológico, 4- la activación de la inmortalidad replicativa,

5- el favorecimiento de la inflamación provocada por el tumor, 6- la activación de mecanismos de invasión y metástasis, 7- la inducción de angiogénesis, 8- la inestabilidad genómica y la aparición de mutaciones, 9- la resistencia a la muerte celular inducida, y finalmente, 10- la reprogramación del metabolismo energético celular.

Debido a que el TGF β fue inicialmente identificado en un ensayo de transformación de fenotipo celular (Moses *et al*, 1981), se asumió que esta citoquina podría desempeñar un papel importante en la transformación neoplásica celular y en el desarrollo tumoral. Actualmente la participación del TGF β en las diez características anteriormente citadas está ampliamente descrita y se comenta con más detalle a continuación (Figura I2). Es muy importante tener en cuenta que la función del TGF β en el desarrollo tumoral depende fundamentalmente del tipo celular y del contexto en el que se encuentre la célula neoplásica, pues el efecto de la citoquina en el tumor y en el microambiente tumoral es muy variable.

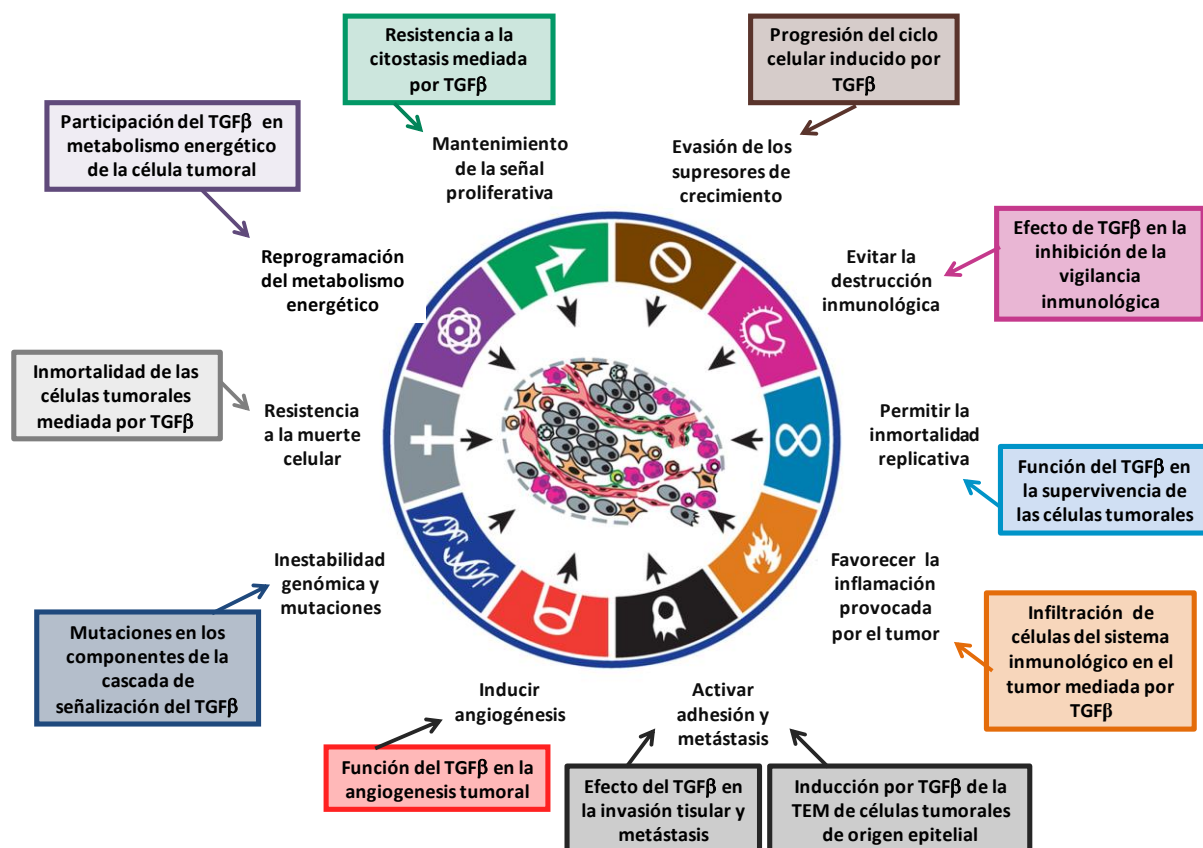


Figura I2: Participación del TGF β en las principales características y habilidades adquiridas por las células tumorales para sobrevivir y desarrollarse. Modificada de (Hanahan y Weinberg, 2011; Tian *et al*, 2011).

1.3.1. Resistencia a la citostasis y progresión del ciclo celular inducidos por TGF β

El factor de crecimiento TGF β induce citostasis en las células normales durante la fase G1 del ciclo celular mediante la disminución de la expresión de factores de transcripción que regulan el crecimiento celular como c-Myc e Ids 1, 2 y 3 (Massagué *et al*, 2006). También regula la proliferación celular mediante la modulación de la producción de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CDK) p15 y p21 (Siegel y Massagué, 2003). A pesar de que la inhibición de la proliferación mediada por TGF β se atribuye a la vía de señalización dependiente de las proteínas Smad, algunos trabajos describen este mismo efecto en células en las que la proteína Smad 4 ha sido silenciada, indicando la activación de otras vías de señalización mediada por el TGF β independientes de Smad como por ejemplo las vías de MAPK y de la proteína fosfatasa PP2A/p70S6 (Elliott y Blobel, 2005).

Como es sabido, las células tumorales, principalmente aquellas de origen epitelial (más del 85% de los tumores humanos), desarrollan mecanismos de escape a la citostasis inducida por TGF β , como pueden ser la expresión desregulada de Myc o la inhibición de la transcripción de p15 y p21. Además, muchos tipos de cáncer presentan un aumento en la activación de la vía de señalización mediada por PI3K/AKT que promueve mecanismos de supervivencia, a partir de la fosforilación de FoxO que “secuestra” Smad 3 en el citoplasma e inhibe su activación en la membrana celular (Tian *et al*, 2011). Otros tumores como por ejemplo de colon y de páncreas presentan defectos en la expresión de las proteínas Smad, y de los receptores de TGF β (Elliott y Blobel, 2005). En el caso del cáncer de pulmón, la resistencia a la inhibición del crecimiento celular mediada por TGF β también se debe a una menor expresión del receptor T β RII debido a la desacetilación aberrante de las histonas H3 y H4 asociadas a su promotor (Osada *et al*, 2001), o a mutaciones en las proteínas Smad 2 y Smad 4 (Elliott y Blobel, 2005).

Las células tumorales no sólo consiguen evadir el efecto antiproliferativo de TGF β , sino que adquieren una mayor capacidad de proliferación en presencia de esta citoquina (Perrot *et al*, 2012). Los mecanismos que median esta función no están todavía bien descritos, aunque muy posiblemente es resultado de la combinación de la inactivación de la citostasis mediada por TGF β , y su habilidad de sobreexpresar factores de crecimiento como por ejemplo, IL-1, CTGF, bFGF, PDGF, TGF α y los receptores PDGFR y EGFR (Tian *et al*, 2011), además de inducir la activación constitutiva de la cascada de señalización mediada por estas moléculas, como son las vías de Ras/Raf/MAPK (Perrot *et al*, 2012).

1.3.2. Escape a la vigilancia inmunológica

En general, concentraciones altas de TGF β en el microambiente tumoral inactivan la vigilancia inmunitaria, favoreciendo la progresión de la neoplasia. Esto se debe, en parte, a que la citoquina inhibe la proliferación y la diferenciación de células NK y de linfocitos T efectores, al tiempo que promueve la proliferación de poblaciones supresoras de respuesta (Tian *et al*, 2011).

Además, se ha descrito que la exposición a TGF β también es capaz de atraer células del sistema inmunológico innato: mastocitos, macrófagos y neutrófilos, que se infiltran en el tumor causando una inflamación crónica que contribuye a un microambiente tumoral idóneo para la progresión de la enfermedad (Zamarron y Chen, 2011). Por lo tanto, la acción de esta citoquina en relación con el sistema inmune vuelve a ser caleidoscópica.

1.3.3. Función del TGF β en la supervivencia de las células tumorales

Otra característica fundamental para el desarrollo de las enfermedades neoplásicas es la falta de respuesta a estímulos de inducción de muerte programada (Gallier y Schiemann, 2006). En las células normales, el TGF β es un potente inductor de apoptosis (Al Azayzih *et al*, 2012). De hecho, se ha descrito la inducción de muerte celular por TGF β en tipos celulares tan variados como linfocitos, hepatocitos, células endoteliales, células epiteliales, células madre hematopoyéticas y neuronas. También actúa como pro-apoptótico en algunos tipos de cáncer como en tumores de mama, gástricos, tumores hepáticos, linfomas, cáncer de ovario y en algunos tumores de próstata (Al Azayzih *et al*, 2012).

Los mecanismos por los cuales el TGF β induce y regula la apoptosis dependen del tipo de célula y del contexto celular. Así, por ejemplo, se ha descrito que la proteína Smad inhibitoria, Smad 7, promueve la apoptosis mediada por TGF β en carcinoma de próstata y en el epitelio celular de pulmón (Lallemant *et al*, 2001). El TGF β muestra su carácter antagónico también en este aspecto, ya que en otros casos induce la activación de las vías de señalización mediadas por NF κ B y PI3K/AKT, que regulan la expresión de genes de supervivencia (Arsura *et al*, 2003; Tian *et al*, 2011), y factores de transcripción como Snail1, que protegen la células de la muerte celular mediada por TGF β (Vega *et al*, 2004). Además, se sabe que la interacción directa entre Akt y Smad 3 impide la fosforilación y la

translocación nuclear de Smad 3, que afecta tanto a la transcripción mediada por Smad 3 como a la apoptosis (Elliott y Blobbe, 2005). Por esa razón, la ratio de Smad 3/Akt se correlaciona con la sensibilidad de las células a la apoptosis mediada por TGF β y justifica la variabilidad de las respuestas apoptóticas de las células en presencia de esta citoquina. Especialmente evidente es su participación en la recuperación de células tumorales expuestas a quimioterapia y radioterapia (Biswas *et al*, 2007).

1.3.4. Función del TGF β en la angiogénesis tumoral

Los tumores sólidos de más de 2 mm inducen el crecimiento de nuevos vasos como medio de aporte de nutrientes y oxígeno para su propio crecimiento (angiogénesis). El aumento de la expresión de TGF β se correlaciona muchas veces con un aumento de la densidad vascular en tumores. Para la inducción de la angiogénesis tumoral, el TGF β promueve la expresión de factores angiogénicos como el factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Además, el TGF β estimula la síntesis de metaloproteasas (MMPs) de la matriz como MMP2 y MMP9 y disminuye la expresión de inhibidores de metaloproteasas (TIMPs) en tejidos tumorales.

La presencia de factores de crecimiento y el aumento en la actividad metaloproteasa conlleva una estimulación de la migración de las células del endotelio vascular, resultando en una angiogénesis acelerada (Miyazono *et al*, 2012). Se ha descrito que el TGF β es capaz de activar en las células endoteliales dos vías de señalización con funciones opuestas. Por un lado, induce la vía clásica de Smad, mediante la activación de los receptores T β RI (ALK-5) y la fosforilación de Smad 2 y 3, y como consecuencia disminuye la proliferación y la migración de las células endoteliales. Por otro lado, se ha descrito que el TGF β en las células endoteliales activa la vía mediada por T β RII y ALK-I inducida normalmente por BMPs. En esta vía de señalización se fosforilan las proteínas Smad 1, 5 y 8, y se induce el aumento de la proliferación y de la migración de las células endoteliales (Goumans *et al*, 2002). Se ha descrito que la proteína co-receptora del T β RIII, la endogлина, desarrolla una función importante en la regulación de los efectos angiogénicos sobre el endotelio ya que inhibe la señalización mediada por ALK5 y activa la vía de señalización mediada por los receptores ALK1 (Tian *et al*, 2011).

De hecho, en diversos estudios se ha mostrado cómo las mutaciones en la vía de señalización del TGF β conducen a un desarrollo vascular alterado (Bertolino *et al*, 2005). Por otra parte, se ha descrito en ratones que presentan mutaciones en los genes que codifican para las proteínas endoglina o ALK-1, desarrollan una enfermedad hemorrágica hereditaria, la telangiectasia, mientras que la delección de los dos receptores resulta mortal (Elliott y Blobel, 2005).

1.3.5. TGF β e inestabilidad genómica

Estudios retrospectivos describen como, en varios tipos de tumores, algunos de los componentes de la vía de TGF β como por ejemplo los receptores T β RI y T β RII, y la proteína Smad 4, están inactivados bien sea por mutaciones en su secuencia o por pérdida de heterocigosidad (LOH) (Levy y Hill, 2006). Además, las mutaciones que inactivan al receptor tipo II del TGF β (T β RII) están frecuentemente asociadas a cánceres que presentan inestabilidad de microsatélites (MSI), como por ejemplo el cáncer gastrointestinal, el cáncer biliar, el adenocarcinoma pulmonar, los gliomas y el cáncer de colon (Padua y Massagué, 2009).

Por otra parte, se han descrito mutaciones en los genes que codifican para las proteínas de transducción Smad 2 y Smad 4, ambos localizados en el cromosoma 18q (Thiagalingam *et al*, 1996). Más aún, el TGF β puede incrementar la inestabilidad genómica porque facilita la aparición de errores en la reparación del DNA, debido a que inhibe la expresión génica de la proteína Rad51, que participa en la reparación de roturas en la doble cadena de DNA (Kanamoto *et al*, 2002).

1.3.6. Inmortalidad de las células tumorales mediada por TGF β

Las células tumorales en muchos casos poseen una actividad telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT) activa, que al mantener la longitud de los telómeros después de cada ciclo de división celular, impide el desencadenamiento de la muerte. En células somáticas normales, excepto en las células germinales, el TGF β inhibe la expresión de hTERT por distintos mecanismos, como por ejemplo activando la quinasa TAK1 que

inhibe la transcripción de hTERT, o induciendo la unión de complejos Myc/Smad 3 al promotor de hTERT impidiendo su transcripción (Tian *et al*, 2011). Sin embargo, se ha descrito que diversos tipos de tumores escapan a esta inhibición bien sea por tener una expresión aberrante del factor de transcripción Myc o por la inhibición de la vía Smad2/3, como ocurre en el 37,5% de los casos de cáncer gástrico (Li *et al*, 2007).

1.3.7. Participación del TGF β en la reprogramación del metabolismo energético

El crecimiento descontrolado característico de las enfermedades neoplásicas necesita un ajuste en el metabolismo energético para el mantenimiento de la proliferación celular. En condiciones aeróbicas, las células normales metabolizan la glucosa primero a piruvato en el citoplasma vía glicólisis, y posteriormente a dióxido de carbono en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos en la mitocondria. En condiciones anaeróbicas, el piruvato se convierte en dos moléculas de lactato que proporcionará energía a la célula vía fermentación láctica. En 1956, Otto Warburg describió como las células tumorales difieren de las células normales en la obtención de energía de su metabolismo basal, ya que incluso en presencia de oxígeno, hay preferencia por la producción de lactato a partir de glucosa en un proceso llamado glicólisis aeróbica, debido a que el ritmo de crecimiento y uso de energía no se ajusta al de combustión de sustratos de manera aeróbica (Hanahan y Weinberg, 2011).

Así, para compensar la baja eficiencia en la producción de ATP respecto a la fosforilación oxidativa mitocondrial, los tumores presentan un incremento en los transportadores de glucosa, principalmente GLUT-1 y también un aumento en la expresión de los genes que codifican varias de las enzimas que intervienen en la glicólisis, mediante la activación de factores de transcripción oncogénicos como Ras, Myc y HIF1 α (Cai *et al*, 2012). La vía de TGF β también participa en este proceso, ya que en este contexto, se han observado que mutaciones en Smad 4 se asocian a un aumento en la expresión de GLUT-1 dependiente de hipoxia y al consiguiente incremento en la glicólisis aeróbica (Papageorgis *et al*, 2011).

1.3.8. Inducción por TGF β de la TEM de células tumorales de origen epitelial

Durante la transformación tumoral las células epiteliales sufren una transdiferenciación por la que adquieren características fenotípicas de células mesenquimales (TEM) (Thiery *et al*, 2009). Entre estas características se puede destacar la pérdida de contactos célula-célula a través de la disminución de la expresión de las moléculas de adhesión y de proteínas de las zonas ocluyentes, como por ejemplo, E-cadherina, zonula ocludens-1 (ZO-1), ocludinas y claudinas; y un incremento muy notable de su motilidad (Heldin *et al*, 2012).

La TEM se puede clasificar en tres subtipos. La TEM *tipo I* ocurre durante el desarrollo embrionario e incluye la transición mesenquimal de células epiteliales primitivas durante la gastrulación, generando, por ejemplo, las células migratorias de la cresta neural a partir de las células neuroepiteliales. La TEM *tipo II* hace referencia a la transición de células del epitelio y endotelio a fibroblastos del tejido, que ocurre durante los procesos de cicatrización, regeneración y fibrosis en tejidos adultos. La TEM *tipo III* también ocurre en tejidos adultos y comprende la transición mesenquimal de células de carcinomas epiteliales, generando células tumorales metastásicas.

En 1994, Miettinen P.J. y colaboradores describieron por primera vez el papel fundamental del TGF β en la TEM de células epiteliales normales de la glándula mamaria (Miettinen *et al*, 1994), y hoy en día es un fenómeno ampliamente descrito en carcinomas sólidos (Tian *et al*, 2011). El mecanismo de regulación de la TEM mediado por TGF β implica diversos factores de transcripción como Twist, Snail, Slug, ZEB1, ZEB2 y FOXC2 que se regulan mutuamente: Snail induce la expresión de Slug, Twist y ZEB2, mientras que Slug y Twist inducen ZEB1 y Slug. Estas proteínas aumentan la expresión de vimentina, N-cadherina y β -catenina, marcadores de células mesenquimales (Heldin *et al*, 2012,). De hecho, Franco y colaboradores (Franco *et al*, 2010) demostraron que Snail1 es fundamental en la inducción de la TEM en hepatocitos adultos no-transformados, ya que su ausencia no induce dicho cambio fenotípico aún en presencia continua de TGF β en estas células.

1.3.9. Efecto del TGF β en la invasión tisular y metástasis

El TGF β desarrolla una importante función en la metástasis, ya que induce la expresión tanto de proteínas de la matriz extracelular como fibronectina y laminina, como de metaloproteasas que degradan la matriz y contribuyen a la invasión tisular (Kang, 2006). Por ejemplo, la sobreexpresión de las metaloproteasas MMP2, MMP9 y MMP3 en distintos tipos de cáncer, como carcinoma gástrico, cáncer de ovario, cáncer de esófago y cáncer de pulmón está asociada a la progresión tumoral y a la disminución en la supervivencia de los pacientes (González-Arriaga *et al*, 2012). Se ha descrito que la estimulación de la invasión inducida por TGF β está mediada tanto por la vía clásica de señalización desde el receptor dependiente de Smad 2/3, como por la vía alternativa. Además, se ha publicado que tanto mutaciones en el receptor T β RI como el silenciamiento de las proteínas transductoras Smad 3 y Smad 4 reducen la incidencia de metástasis en hueso y pulmón en modelos de carcinoma de mama (Tian *et al*, 2011). Igualmente importante para la metástasis es la activación de las vías no canónicas del TGF β , como por ejemplo la activación de Ras/MAP quinasa, PI3/AKT, Rho/ROCK y NF κ B, que inducen la estimulación de la TEM y la invasión, dos importantes procesos para la metástasis (Heldin *et al*, 2012).

Actualmente existen evidencias experimentales que asocian la presencia de TGF β en muestras de tumores de pulmón resecados, con la aparición de metástasis en nódulos linfáticos (Hasegawa *et al*, 2001). Padua y colaboradores (Padua *et al*, 2008) han descrito en modelos de carcinoma de mama cómo la síntesis de esta citoquina en el contexto tumoral facilita el establecimiento de metástasis pulmonares por medio de la inducción en la expresión de la proteína 4 de tipo angiopoyetina (angptl4), que causa un aumento en la permeabilidad selectiva del endotelio.

2. Los vasos linfáticos como vía de metástasis tumoral

2.1. Estructura y función de los vasos linfáticos

Los vasos linfáticos son componentes de un sistema vascular independiente que es el principal responsable del mantenimiento del equilibrio intersticial en los tejidos y del transporte de nutrientes y leucocitos. El exceso de fluido y de macromoléculas una vez

drenado y filtrado a través de los ganglios linfáticos, vuelve al torrente circulatorio a través del conducto torácico. Además, el sistema linfático transporta a los nódulos linfáticos células presentadoras de antígeno para que se inicie la respuesta inmunológica.

Los capilares linfáticos son vasos de paredes finas, de aproximadamente 30-80 μm de diámetro, compuestos por una capa de células endoteliales linfáticas (LECS) con estructura en forma de hoja de roble. Los capilares linfáticos no contienen pericitos, presentan una membrana basal discontinua que facilita el paso de células a su través (Alitalo, 2011). Además, en lugar de presentar una distribución continua (tipo cremallera) de uniones intercelulares, las distribuyen en localizaciones discretas (tipo botón) sobre la superficie de contacto célula-célula, a modo de bisagras que permiten la apertura de las regiones interendoteliales por las zonas de membrana libres de uniones. De todas formas, estas uniones están formadas por las mismas proteínas de unión que aparecen en las uniones entre las células endoteliales de los capilares sanguíneos, como son ocludina, claudina-5, ZO-1, ESAM y JAM-A, VE-cadherina y PECAM-1 (Baluk *et al*, 2007). Por último, estos vasos se unen a la matriz extracelular por medio de filamentos elásticos de anclaje que se contraen en caso de aumentos en la presión intersticial y facilitan la apertura del capilar endotelial y la entrada de fluidos y células (Dejana *et al*, 2009).

Los capilares linfáticos confluyen en los vasos precolectores, que transportan la linfa hacia los vasos linfáticos colectores, que se son de mayor calibre, presentan uniones interendoteliales tipo cremallera y están recubiertos por una capa de músculo liso. Estos vasos poseen pericitos y una membrana basal bien definida. También en estos vasos existen válvulas que evitan el reflujo de la linfa hacia los vasos de menor calibre (Alitalo, 2011).

Las primeras etapas de la vasculogénesis es común para el desarrollo de los vasos sanguíneos y linfáticos, pero diverge desde el momento en el que se induce el factor de transcripción Prox-1, que dirige el desarrollo de los vasos linfáticos. Además, en el organismo adulto, la proliferación de cada tipo de vaso viene determinada fundamentalmente por el tipo de receptores de factores de crecimiento vascular que expresan en su membrana. Así, la proliferación de la vasculatura sanguínea es dirigida fundamentalmente por VEGF, que se une a los receptores tipo I y II, mientras que la linfangiogénesis es inducida en gran medida por VEGF-C que se une a receptores de VEGF tipo III (Baluk *et al*, 2007), además de responder a VEGF-A. En la actualidad, este punto no está totalmente discriminado, ya que existe solapamiento en la expresión de receptores de VEGF en este endotelio, y se piensa que

otros elementos, como la relación con los pericitos, desarrollan una función en la especificación y crecimiento de cada tipo endotelial (Ribatti *et al*, 2011).

Hasta la década de los 90 no se identificaron marcadores específicos de los vasos linfáticos (Rovenská y Rovensky, 2011). Hasta el momento, los principales marcadores de este tipo endotelial son el receptor tirosina quinasa VEGFR-3 (FLT4) (Kaipainen *et al*, 1995), las glicoproteínas de membrana podoplanina (Breiteneder *et al*, 1999) y LYVE-1 (Banerji *et al*, 1999), y el factor de transcripción Prox-1 (Wigle y Oliver, 1999). Además, los vasos linfáticos y las células del endotelio linfático no expresan el marcador PAL-E (Sleeman *et al*, 2001) que se expresa en endotelio sanguíneo.

2.2. Mecanismos que contribuyen a la metástasis linfática

El sistema linfático constituye una de las vías utilizadas por las células tumorales para abandonar el nicho primario. El tránsito a través de estos vasos se favorece por la diferencia entre las presiones intersticiales existentes en el tejido tumoral y normal (Fig. I3). De hecho, los tumores sólidos tienen una presión intersticial de 10 a 40 mmHg, bastante más alta que un tejido normal, que suele mantenerse a una presión de entre 0 y 2 mmHg (Swartz y Lund, 2012). Además, la carencia de pericitos y de uniones adherentes en estos vasos facilita el paso de células tumorales a través de las aperturas entre las uniones tipo botón existentes en las regiones interendoteliales. Otro factor que puede favorecer la metástasis linfática es el bajo estrés mecánico dentro del vaso linfático peritumoral (Alitalo, 2011).

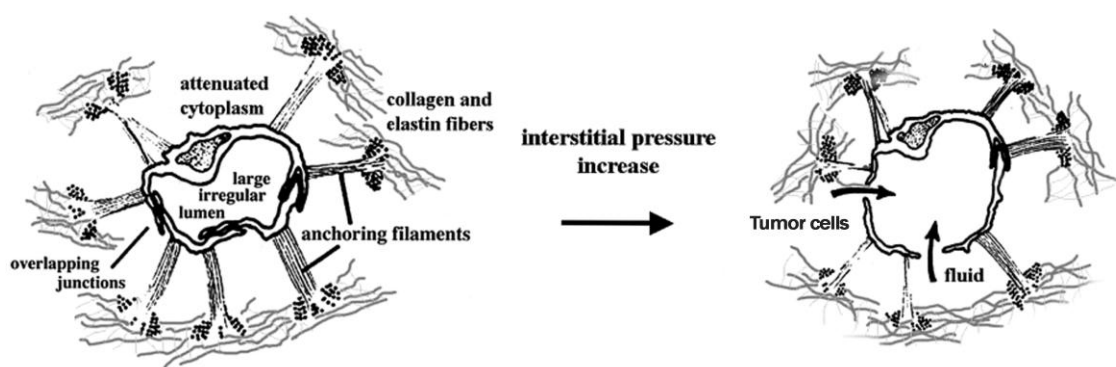


Figura I3. Representación esquemática de las características morfológicas de un vaso linfático. El aumento en la presión intersticial, facilita la entrada de flujo, macromoléculas y células tumorales. Modificada de (Skobe y Detmar, 2000).

Junto a todo lo anterior, hay que considerar que las células endoteliales secretan quimioquinas como CCL21 o CXCL12 que pueden atraer hacia los vasos linfáticos a las células tumorales que expresen sus receptores (Cunningham *et al*, 2010; Kim *et al*, 2010). Por otra parte, muchos tumores también son capaces de dilatar los vasos linfáticos ya existentes, o inducir la formación de nuevos vasos linfáticos, e incluso de nódulos linfáticos mediante la sobreexpresión de VEGF-C o VEGF-D por las células del tumor y del estroma, como por ejemplo, los macrófagos asociados al tumor o TAMs (Nagahashi *et al*, 2010). En la práctica clínica, la presencia de linfangiogénesis es un indicativo de mal pronóstico, ya que estos tumores son especialmente propensos a desarrollar metástasis a ganglios linfáticos. (Mumprecht y Detmar, 2009; Swartz y Lund, 2012; Tammela y Alitalo, 2010).

3. La adhesión y migración celular en la progresión tumoral

La adhesión celular es fundamental para el desarrollo y funcionamiento normal de los tejidos, ya que las moléculas de adhesión están implicadas en diversos procesos celulares como la diferenciación, proliferación y supervivencia celular (Stupack y Cheresh, 2004). Durante la adquisición del fenotipo neoplásico, las células tumorales experimentan cambios en la expresión de diversas moléculas de adhesión, que conducen a una disminución en la adhesión intercelular y una alteración de las respuestas dependientes del anclaje a la matriz extracelular (Arvelo y Poupon, 2001; Desgrosellier y Cheresh, 2010), como ya se ha mencionado anteriormente al tratar la TEM.

Además, durante el establecimiento de la metástasis tumoral, se pierde la adhesión y las células neoplásicas degradan la matriz extracelular mediante la producción de MMPs, enzimas capaces de romper las proteínas de la matriz. Así, se ha demostrado que los niveles de la MMP9 son significativamente más elevados en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) metastásico, respecto a aquellos pacientes que no presentan metástasis (Kopczyńska *et al*, 2007).

4. El papel de las integrinas en la regulación de la adhesión y migración celular

Las integrinas constituyen la principal familia de glicoproteínas integrales de membrana. Su peso molecular está comprendido entre 100 y 140 kDa (Luo *et al*, 2007). Estructuralmente forman heterodímeros de una subunidad α unida no covalentemente a una subunidad β . A día de hoy, se han descrito 18 subunidades α y 8 subunidades β diferentes que se asocian en, al menos, 24 combinaciones distintas de receptores heterodiméricos. De hecho, las integrinas se clasifican en ocho subfamilias en función de la subunidad β que las constituyen: $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$ y $\beta 8$ (Huttenlocher *et al*, 2011).

Cada una de las subunidades α o β presenta tres dominios definidos: uno extracelular largo, otro transmembranoso y un dominio intracitoplasmático más corto (Barczyk *et al*, 2010). Las integrinas pueden presentar en su región extracelular diferentes dominios de reconocimiento a proteínas extracelulares como el dominio RGD que une fibronectina y vitronectina. Algunas integrinas se unen a un único ligando ($\alpha 6\beta 1$ se une a laminina y $\alpha 5\beta 1$, a fibronectina), otras son capaces de unirse a varias proteínas de la matriz ($\alpha 1\beta 1$ une laminina y colágeno, y la $\alpha 3\beta 1$ une laminina, colágeno y fibronectina) y otras median interacciones intercelulares ($\alpha 4\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$) (Fig. I4) (Luo *et al*, 2007; Chen *et al*, 2012; Margadant *et al*, 2011).

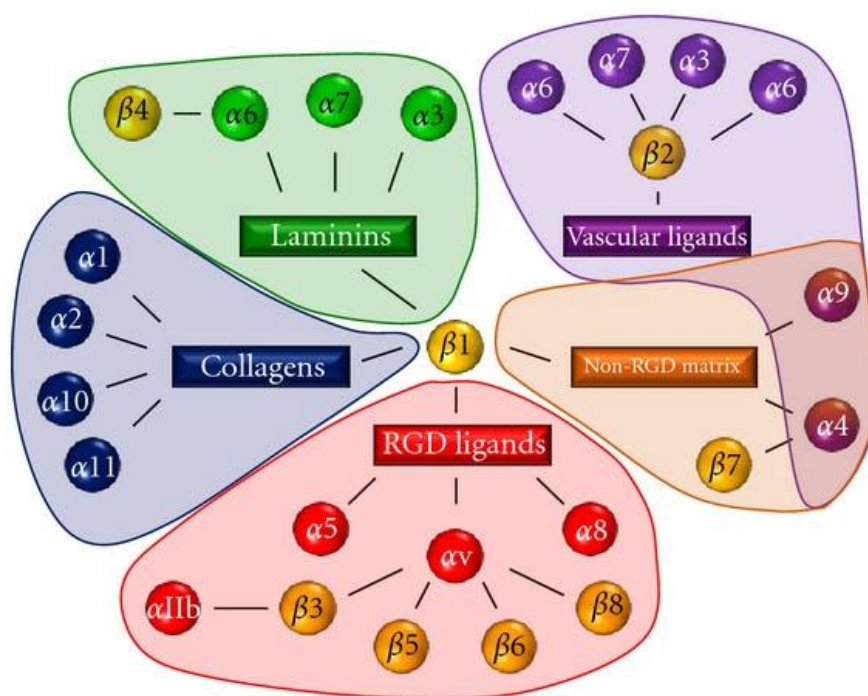


Figura I4. Representación de los 24 heterodímeros que componen la familia de las integrinas separados según sus ligandos. Obtenida de (Chen *et al*, 2012).

Las integrinas no tienen una actividad enzimática intrínseca, pero pueden activarse tanto a través de su dominio extracelular (señalización *outside-in*) como mediante señales intracelulares (señalización *inside-out*). En el primero de los casos, una vez que la integrina se ha unido a un ligando extracelular sufre cambios conformacionales que se propagan a través de su dominio citoplasmático hasta proteínas que se unen al citoesqueleto, como talina, vinculina, paxilina o fibrilina. Estas vías de señalización citoplasmáticas conducen en muchos casos a la activación de quinasas de adhesión focal (FAK), que al fosforilarse activan a otras quinasas como ERK. También se puede dar la activación de las quinasas de la familia de Src, que favorecen la migración celular o la activación de la familia RHO de pequeñas GTPasas, que son las principales reguladoras de la formación de fibras de estrés de actina, de filopodios y de la mayoría de las alteraciones del citoesqueleto propias de la migración celular (Hood y Chersesh, 2002). Por otro lado, las integrinas son capaces, mediante la señalización intracelular, de modular su conformación espacial, regulando de esa manera su afinidad por su ligando y la intensidad de unión a moléculas de la matriz extracelular (señalización *inside-out*) (Goodman y Picard, 2012). Los principales activadores intracelulares de las integrinas son las proteínas citoplasmáticas talina y la kindlina. Estas dos proteínas contienen un sitio de unión con gran afinidad por las subunidades β , y al unirse con el dominio citoplasmático de la integrina inducen su activación permitiendo así su unión con los filamentos de actina (F-actina) (Shattil *et al*, 2010).

4.1. Función de las integrinas en la regulación de la respuesta celular frente al TGF β

Las integrinas también participan en la regulación de la señalización oncogénica mediada por el TGF β , especialmente las relacionadas con la inducción de la TEM, invasión y metástasis (Mamuya y Duncan, 2012; Shah *et al*, 2012). Por ejemplo, la integrina $\alpha\beta 3$ es capaz de unirse al receptor T β RII. Esta unión permite que Src fosforile la tirosina Y284 del receptor de TGF β , iniciando la señalización de la citoquina en células epiteliales mamarias normales y malignas (Gallagher y Schiemann, 2007). Además, se ha descrito que la proteína adaptadora de FAK, p130Cas, efectora de la señalización a través de integrinas, secuestra Smad 3 e impide que esta se transloque al núcleo tras la unión de TGF β a su receptor T β RI. Esa interrupción en la señalización clásica de TGF β mediada por las proteínas Smad altera el equilibrio entre la señalización canónica y la no canónica, favoreciendo la progresión tumoral mediada por TGF β . Por esta razón, se ha descrito cómo una alta expresión de

p130Cas podría ser un factor de progresión metastásica en cáncer de mama (Wendt *et al*, 2012). Por otro lado, también se ha demostrado que las integrinas $\beta 1$ se unen al receptor T β RII, activando la vía de señalización no canónica de p38 MAPK implicada en la TEM mediada por TGF β (Gallagher y Schiemann, 2006; Bhowmick *et al*, 2001).

4.2. Participación de las integrinas en la progresión tumoral

Diversas patologías humanas se relacionan con la presencia de alteraciones en la adhesión mediada por integrinas, como por ejemplo trombosis, inflamación, cáncer, fibrosis y las enfermedades infecciosas. En el caso de la enfermedad neoplásica, son innumerables los ejemplos a este respecto. Uno de ellos está constituido por la expresión conjunta de la integrina $\alpha\beta 5$ y la metaloproteasa MMP2 en la superficie de las células invasivas de melanoma de modo que se facilita la invasión tumoral (Koukoulis *et al*, 1993; Zhao *et al*, 2007). En otros casos, como sucede en el carcinoma de mama, se ha observado que la expresión de la integrina $\alpha\beta 3$ se correlaciona positivamente con un aumento en la metástasis a hueso, aunque no se haya descifrado concretamente el mecanismo molecular subyacente (Zhao *et al*, 2007).

4.2.1. Regulación de la supervivencia celular y apoptosis mediadas por integrinas

La unión de las integrinas a proteínas de la matriz extracelular activa mecanismos de supervivencia en las células tumorales que implican, por ejemplo, incrementos en la expresión del protooncogen bcl-2 o la activación de las vías de señalización mediadas por PI3K-AKT o NF κ B, la inactivación del gen supresor tumoral p53 (Desgrosellier y Cheresh, 2010), entre otros. Además, se ha descrito que la integrina $\alpha\beta 3$ aumenta la supervivencia independiente de anclaje de células tumorales, activando la tirosina quinasa Src que desencadena una vía de señalización de supervivencia independiente de FAK (Desgrosellier *et al*, 2009). Sin embargo, cuando las integrinas no se unen a ningún ligando extracelular pueden iniciar cascadas de señalización pro-apoptóticas. La inducción de la apoptosis mediada por integrinas sucede mediante dos mecanismos: un proceso denominado muerte mediada por integrinas (IMD- *Integrin-Mediated Death*) por el cual las integrinas que no están unidas a ligando en una célula adherida, reclutan y activan caspasa 8, induciendo la

muerte por apoptosis (Stupack *et al*, 2001), y mediante anoikis, que es la apoptosis que ocurre cuando una célula pierde su anclaje a la matriz extracelular y activa vías de señalización pro-apoptóticas (Guadamillas *et al*, 2011).

4.2.2. Función de las integrinas expresadas por células del estroma tumoral

Las integrinas participan en funciones importantes en la progresión del cáncer, no sólo actuando sobre las células tumorales, sino también en otros tipos celulares que las expresan, como por ejemplo en células endoteliales, fibroblastos y células inflamatorias (Desgrosellier y Cheresch, 2010). Así, las integrinas son capaces de regular la angiogénesis, la linfangiogénesis, la desmoplasia y la respuesta inmunológica.

Durante la angiogénesis tumoral, los vasos sanguíneos asociados al tumor son estructural y funcionalmente distintos de los vasos normales. Son más permeables y enmarañados, de modo que se dificulta el flujo sanguíneo a su través, aumenta la fibrosis, y facilita la transmigración de células tumorales. A diferencia de lo que ocurre en el endotelio normal quiescente, se ha descrito la expresión de integrinas como $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ en células endoteliales de los nuevos vasos asociados al tumor. Estas integrinas facilitan la unión de las células endoteliales a la matriz extracelular y activan vías de supervivencia durante la angiogénesis. Además, interaccionan con receptores de factores de crecimiento angiogénicos como FGFR y VEGFR2, sobreexpresados en los tumores, favoreciendo la unión de sus ligandos e iniciando la señalización intracelular específica pro-angiogénica (Leifheit *et al*, 2010; Szabo *et al*, 2012). Por último, se ha descrito que la integrina $\alpha 9\beta 1$, expresada en la superficie de las células endoteliales, participa en la linfangiogénesis tumoral a través de su unión a factores de crecimiento linfáticos como VEGF-C y VEGF-D, que conllevan la migración endotelial (Chen *et al*, 2012).

Las integrinas expresadas por los fibroblastos del estroma también contribuyen al crecimiento tumoral, como es el caso de la integrina $\alpha 11\beta 1$ que estimula la secreción de factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF2), implicado en la proliferación celular. De hecho, la subunidad $\alpha 11$ está normalmente sobreexpresada en fibroblastos y asociados con NSCLC (Zhu *et al*, 2007).

Las integrinas participan también en el tráfico de células del sistema inmune hacia el tumor, y desde el tumor hacia los ganglios linfáticos (Desgrosellier y Cheresch, 2010). De hecho, la infiltración de macrófagos en los tumores disminuye en ratones *itgb3^{-/-}*, deficientes en la expresión de la integrina $\beta 3$ (Taverna *et al*, 2004). Por otra parte, es bien conocida la participación de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$ en la transmigración de leucocitos hacia los tejidos (Carman y Springer, 2004), y que su inhibición reduce la densidad de vasos sanguíneos (Jin *et al*, 2006).

4.2.3. Bloqueo de integrinas como terapia frente al cáncer

Debido a su fácil localización en la superficie celular y su sensibilidad al bloqueo farmacológico, las integrinas se han convertido en interesantes dianas farmacológicas. Existen aproximadamente 260 nuevos fármacos actualmente en ensayos clínicos (Goodman y Picard, 2012).

Los inhibidores de integrinas utilizados en las terapias clínicas se clasifican en tres categorías: anticuerpos terapéuticos, péptidos que mimetizan ligandos, y pequeñas moléculas antagonistas (Chen *et al*, 2012). Hasta el día de hoy, los únicos inhibidores aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA-*Food and Drug Association*) son el Natalizumab (Tysabri), frente a la integrina $\alpha 4$, y los inhibidores frente a la integrina plaquetaria $\alpha IIb\beta 3$, Abciximab, Eptifibatide y Tirofiban. El Natalizumab es utilizado principalmente en tratamientos contra inflamaciones crónicas como, por ejemplo, esclerosis múltiple y enfermedad de Crohn, y los inhibidores de $\alpha IIb\beta 3$ son utilizados en tratamientos para prevención de trombosis en pacientes con síndrome coronario agudo (Millard *et al*, 2011).

Gran parte de los inhibidores utilizados en ensayos clínicos actúan bloqueando las integrinas que se unen al dominio de secuencia RGD, como $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, y $\alpha IIb\beta 3$. En la tabla II, se muestran los principales inhibidores de integrinas utilizados en tratamientos contra el cáncer que están actualmente en ensayos clínicos en fases II y III. El inhibidor de las integrinas $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$, Cilengitide, es el agente terapéutico que se encuentra en la fase más avanzada para la aprobación clínica (Fase III) en tratamientos frente glioblastomas, en el cual parece que inhibe la angiogénesis e impide el crecimiento tumoral (Jinka *et al*, 2012).

Tabla II. Inhibidores de integrinas actualmente en ensayos clínicos. Tabla modificada de (Goodman y Picard, 2012).

Fase clínica	Diana	Inhibidor	Sinónimos	Tipo de inhibidor	Fabricante
Fase III	$\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$	Cilengitide	EMD 121974, EMD 85189, NSC-707544	péptido cíclico	Merck KGaA, (Darmstadt, Alemania)
Fase II	$\alpha 5\beta 1$	ATN-161		péptido	Tactic Pharmaceuticals (II, EE.UU.)
Fase II	$\alpha 5\beta 1$	Volociximab	M-200, EOS-200-4	anticuerpo monoclonal	PDL BioPharma y Biogen Idec (CA, NV, EE.UU.)
Fase II	$\alpha v\beta x^*$	Intetumumab	CNTO-95	anticuerpo monoclonal	Centocor Biotech (PA, EE.UU.)
Fase II	$\alpha v\beta 3$ $\alpha v\beta 5$	Fluciclatide (^{18}F)	GE-135, [^{18}F]-AH-111585	reactivo diagnóstico	GE Healthcare (Wisconsin, EE.UU.), National Institute of Health Clinical Center (CC), (MD, EE.UU.)
Fase II	$\alpha v\beta 3$	^{99}mTc -Maraciclatide	NC100692	reactivo diagnóstico	GE Healthcare (Wisconsin, EE.UU.)
Fase II	$\alpha v\beta x$	EMD-525797	DI17E6	anticuerpo monoclonal humanizado	Merck KGaA, (Darmstadt, Alemania)

* βx : indica que todas las cadenas β asociadas a αv son diana del inhibidor

5. Cáncer de pulmón

5.1. Epidemiología y factores de riesgo

El cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer de mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial. En el año 2013 en Estados Unidos, se estima que sea el segundo tipo de tumor más diagnosticado tanto en hombres como en mujeres (Figura 15). Además, debido principalmente a que esta neoplasia frecuentemente se diagnostica en estadios muy avanzados, la supervivencia a los cinco años de los pacientes no supera el 15% en España y 9% en otros países desarrollados como por ejemplo Estados Unidos (González-Arriaga *et al*, 2012). En cambio, cuando se extrae el tumor en un estadio temprano (menor de 3 cm) y sin que exista invasión proximal, la supervivencia a los 5 años del diagnóstico puede llegar al 70% (Wood *et al*, 2012).

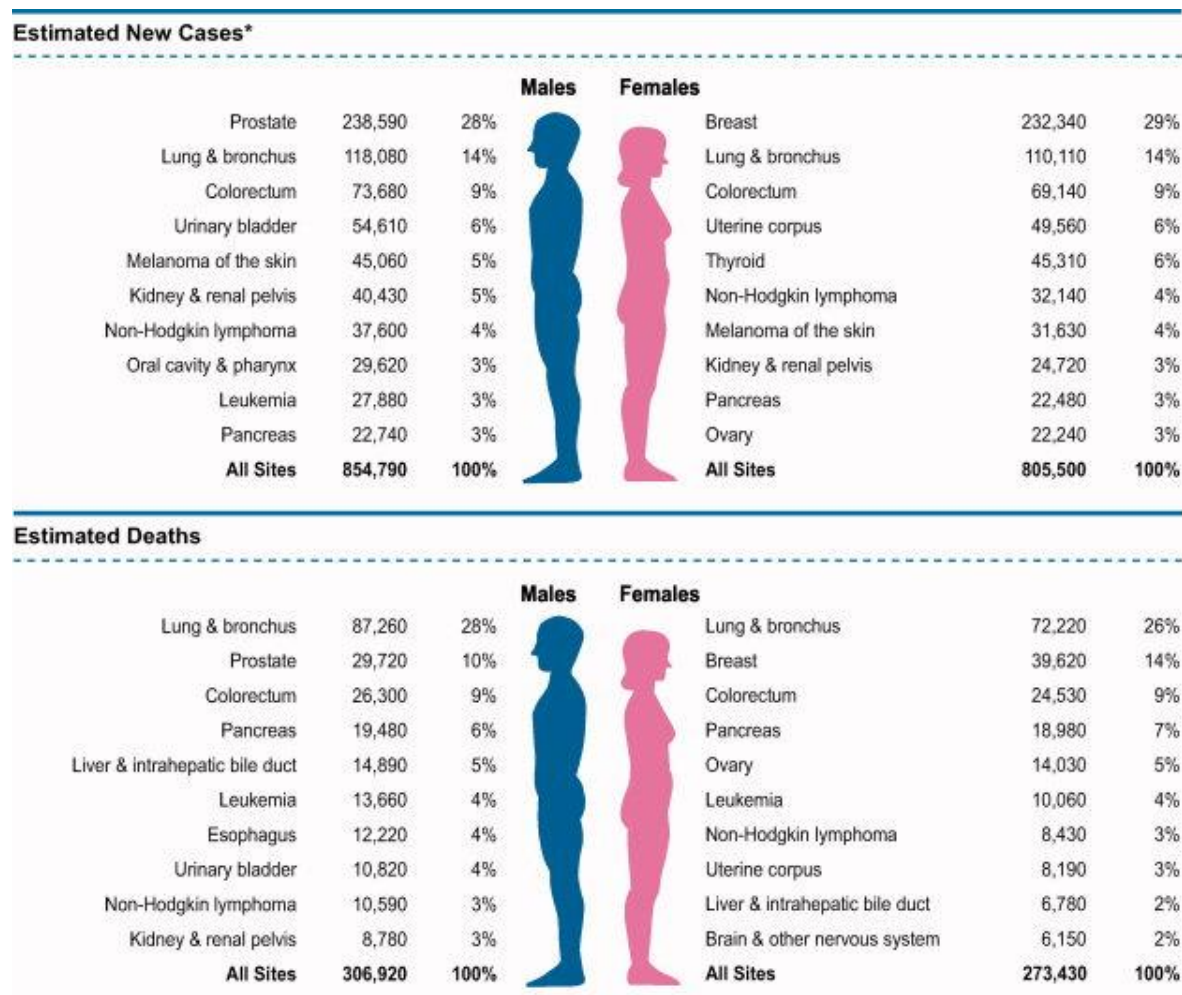


Figura I5- Estimativa de la incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes en los Estados Unidos en el año 2013. Obtenida de (Siegel *et al*, 2013).

La principal causa del cáncer de pulmón es el tabaquismo. Se estima que 85% de las defunciones por esta enfermedad se asocian al hábito tabáquico. Sin embargo, existen otros factores asociados al desarrollo de esta neoplasia como son la predisposición genética, la inhalación de sustancias carcinogénicas como, por ejemplo: gas radón, asbesto, dióxido de sulfuro, cromatos de níquel, y la infección previa por algunos oncovirus, como los papilomavirus. Por último ciertas lesiones preexistentes en los pulmones asociadas a infecciones como tuberculosis y bronquitis crónica pueden ser factores que favorezcan el desarrollo de cáncer de pulmón (Yano *et al*, 2011).

5.2. Clasificación de los tipos de cáncer de Pulmón

La gran parte de los tipos de cáncer de pulmón son carcinomas, de origen epitelial, aunque existen casos menos frecuentes de carcinoides de origen neuroendocrino, y sarcomas, originados en tejido conjuntivo. Histológicamente los carcinomas de pulmón se dividen en dos grandes grupos: NSCLC y SCLC (cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico) (Zochbauer *et al*, 2002).

El NSCLC es más común y representa aproximadamente el 85% del total de tumores de pulmón diagnosticados (Provencio *et al*, 2011). Hay tres tipos principales de cáncer de pulmón de células no pequeñas que toman el nombre del tipo de células en donde se desarrolla el cáncer: carcinoma de células escamosas o epidermoide, que normalmente se origina en las células basales del epitelio bronquial; adenocarcinoma, que suele iniciarse a partir de células del epitelio de los bronquios distales y de las células que forman las glándulas bronquiales; y carcinoma de células grandes, formado por grupos de células grandes pobremente diferenciadas cuyo origen no está totalmente definido. En 2011, la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC), la Asociación Torácica Americana (ATS) y la Sociedad Respiratoria Europea (ERS) realizaron una revisión multidisciplinaria de esos tipos de cáncer de pulmón establecidos por la Organización mundial de la salud (WHO) en el año 2004 (Anexos, Tabla A.1, pág. 161) (Travis *et al*, 2011). Esta nueva revisión de la clasificación se basa en los avances realizados en los métodos de diagnóstico y en las terapias más específicas para cada tipo de tumor.

5.3. Diagnóstico y el sistema TNM de estadificación del cáncer

Para determinar el estadio del cáncer y la progresión de la enfermedad, uno de los métodos de estadificación de tumores más utilizados es el sistema TNM. Este método fue desarrollado por Pierre Denoix durante la década de 1940 (Marshall *et al*, 2012) y ha sido aceptado por la *International Union Against Cancer*, (UICC) y por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Actualmente es ampliamente utilizado en la práctica clínica. El sistema TNM consiste en determinar el estadio a partir de la extensión del tumor (T), del grado de diseminación a los ganglios linfáticos (N), y de la presencia de metástasis (M)

distante. Para indicar el tamaño del tumor y el grado de diseminación del cáncer, se añaden números y letras en función de su extensión (Anexos, tabla A.2, pág. 162)

5.4. Tratamiento del cáncer de pulmón

En la última década, las opciones de tratamiento de los pacientes de cáncer de pulmón han mejorado considerablemente gracias a los avances realizados tanto en el campo clínico como en los estudios moleculares acerca de esta patología. De modo general, los pacientes sin metástasis en los nódulos linfáticos en el mediastino se someten a cirugía con posibilidad de quimioterapia adyuvante después de la resección. En cambio, en estadios más avanzados de la enfermedad, como los estadios IIIA y IIB con el tumor localizado, los pacientes normalmente reciben quimio y radioterapia, además de cirugía según el caso. El principal problema en los estadios avanzados es que la gran mayoría de los pacientes de NSCLC presentan metástasis después del tratamiento local. Aún así, el tratamiento con nuevas moléculas diana ha resultado en estos últimos años bastante efectivo, principalmente en adenocarcinomas. Por ejemplo, gran parte de los adenocarcinomas presentan una mutación en los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una translocación en la quinasa ALK. Un estudio realizado en 100 pacientes con esta mutación en la quinasa ALK, tratados durante 6 meses con el inhibidor de tirosina quinasa, Crizotinib, como primera línea de tratamiento, demostró que el 57% de los pacientes (47/82) respondieron al menos parcialmente al tratamiento, y el 33% (27/82) al final del estudio mantuvieron la enfermedad estable (Kwak *et al*, 2010). En cambio, los tumores que no presentan estas mutaciones son tratados directamente con quimioterapia (Travis *et al*, 2011). También se han obtenido buenos resultados en tumores NSCLC no escamosos utilizando el inhibidor del metabolismo del ácido fólico Pemetrexed, con una media de respuesta favorable en el 34,4% de los pacientes, y un media de supervivencia de 50,8 meses (Lee *et al*, 2012). Además, el tratamiento con el anticuerpo monoclonal bloqueante frente a VEGFR, Bevacizumab, utilizado en combinación con otros agentes quimioterápicos parece mejorar el pronóstico de los pacientes (Sandler *et al*, 2006). Sin embargo, debido a que se ha demostrado un incremento del riesgo de hemorragias pulmonares, los tumores escamosos no son tratados con Bevacizumab y tampoco responden a Pemetrexed (Gold *et al*, 2012). Por ello, se reducen las posibilidades de tratamiento contra este tipo de tumores, que se limita en la mayoría de los casos a una terapia basada en platinos como primera línea de tratamiento. Como segunda

línea de tratamiento se utiliza el inhibidor de EGFR, Erlotinib, que presenta una actividad débil con una tasa de control de la enfermedad del 51,4% de los pacientes y una media de supervivencia de 10,4 meses (Chiang *et al*, 2013), o el anti-mitótico Docetaxel, en que menos del 30% de los pacientes llegan al año de supervivencia (Miura *et al*, 2011).

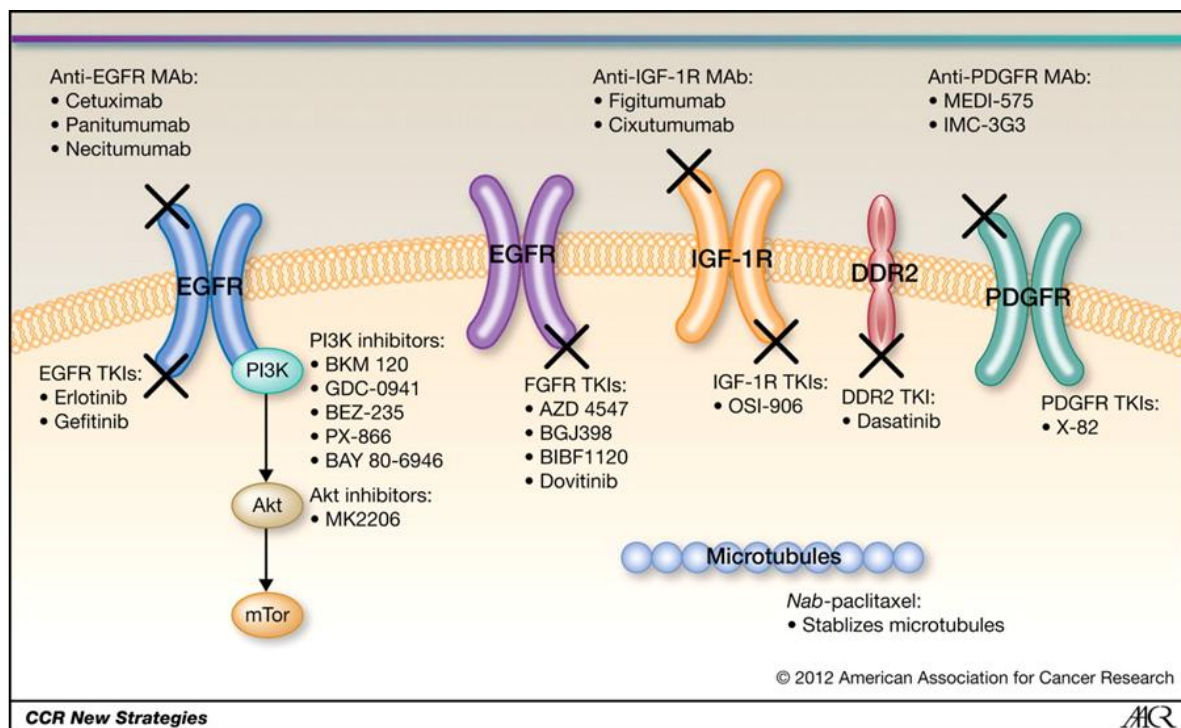


Figura I6- Vías de señalización alteradas en carcinoma escamoso de pulmón y agentes terapéuticos frente a ellas. MAb: anticuerpo monoclonal; TKI: inhibidor tirosina quinasa. Obtenida de (Gold *et al*, 2012)

Debido a la baja respuesta de los carcinomas escamosos frente a las terapias actuales, se están llevando a cabo estudios para identificar nuevas dianas terapéuticas (Perez *et al*, 2012). En la tabla A.3 (Anexos, pág. 163) están descritas las principales alteraciones genéticas y la incidencia de estas alteraciones en pacientes con carcinoma escamoso y adenocarcinoma, y en la figura I6 algunas de las nuevas estrategias terapéuticas frente a oncogenes alterados en carcinoma escamoso de pulmón.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La hipótesis de este trabajo propone que el tratamiento de células de carcinoma escamoso pulmonar con TGF β favorece la adhesión y migración de las células tumorales a través del endotelio linfático de pulmón. Las moléculas de tipo integrinas se han descrito como mediadoras importantes en el tránsito de células a través de los endotelios. Además, se conoce que el TGF β induce la expresión de moléculas de adhesión, como por ejemplo de la integrina β 3, que a su vez desarrolla una importante función en la unión y motilidad de las células tumorales. El carcinoma de pulmón, como la mayoría de los carcinomas, establece metástasis en los nódulos linfáticos además de en otras regiones. Por tanto, pensamos que el tratamiento con la citoquina TGF β de células de carcinoma escamoso de pulmón H157, puede alterar su capacidad para atravesar los vasos linfáticos mediante la expresión diferencial de integrinas.

OBJETIVOS

Para estudiar la hipótesis propuesta se llevaron a cabo los siguientes objetivos:

1. Analizar el efecto del TGF β en la adhesión y migración de células de NSCLC a través de proteínas de la matriz extracelular y de monocapas de endotelio linfático de pulmón.
2. Determinar el modelo celular más adecuado para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares de adhesión y migración inducidos por TGF β .
3. Estudiar la expresión de moléculas de adhesión y proteínas de la matriz extracelular en células H157 tras el tratamiento con TGF β .
4. Determinar la función de la integrina β 3 en la motilidad y adhesividad de células H157.
5. Establecer un modelo murino de xenotransplante de cáncer de pulmón ortotópico con metástasis a ganglios linfáticos axilares y braquiales en el que estudiar el efecto de los inhibidores de TGF β y de la integrina β 3 sobre el establecimiento de metástasis ganglionares.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares de líneas tumorales y de endotelio linfático de pulmón humano.

Con objeto de estudiar la respuesta a TGF β de las células procedentes de líneas de cáncer de pulmón no microcítico humano (NSCLC), se crecieron las siguientes líneas celulares: A549 (Adenocarcinoma bronquioalveolar), H157 y H1264 (Carcinoma escamoso) y H1299 (Carcinoma pulmonar de células grandes). Las líneas de carcinoma de pulmón no microcítico se cultivaron en medio RPMI 1640 (Lonza, Walkersville, EE.UU.) suplementado con 10% de Fetal Clone III (Hyclone, South Logan, EE.UU.) y penicilina-estreptomicina (100 unidades/ml, Lonza, Walkersville, EE.UU.).

Las células de endotelio linfático de pulmón humano (HMVEC-Lly, Lonza, Walkersville, EE.UU.) se cultivaron en medio EBM-2 suplementado con el EGM-2MV Bulletkit (Lonza, Walkersville, EE.UU.) que contiene 5% de suero fetal bovino (FBS), 0,04% de hidrocortisona, 0,4% de factor de crecimiento de fibroblastos humano básico (hFGF-B), 0,1 % de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), 0,1% de factor de crecimiento de tipo insulina recombinante humano (R3-IGF-1), 0,1% de ácido ascórbico, 0,1% de factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) y 0,1% de gentamicina y anfotericina B (GA-1000). Las concentraciones no están especificadas por la casa comercial.

Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa hasta preconfluencia en frascos de cultivo de 75 cm² (BD Falcon, New Jersey, EE.UU.) en un incubador modelo 371 de Thermo Electron Corporation (Ohio, Marietta, EE.UU.). Una vez las células alcanzaron la preconfluencia se despegaron de los frascos de cultivo con tripsina (500 μ g/ml) / EDTA (200 μ g/ml) (Lonza, Walkersville, EE.UU.). Para todos los experimentos se realizó el conteo celular utilizando una cámara de recuento de Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania).

2. Tratamientos celulares utilizados

2.1. Tratamiento con TGF β y sus inhibidores

Una vez sembradas las células en placas de cultivo a una confluencia de 70-80%, se lavaron con PBS estéril, y se incubaron otras 12-24 h con medio RPMI sin suero. Después se añadió medio de cultivo sin suero suplementado con TGF β 1 (RyD systems, Minneapolis, EE.UU.), a una concentración final de 2 ng/ml, y se incubaron las células durante 24 h a 37°

C. En los experimentos de 5 días, se cambió el medio de cultivo el tercer día por uno nuevo, también suplementado con TGF β 1 y carente de suero.

Para algunos experimentos se utilizaron dos péptidos bloqueantes de TGF β : p17 y p144 a una concentración de 200 μ g/ml. Estos péptidos fueron descritos por el Dr. Francisco Borrás: p17 (KRIWFIPRSSWYERA, 1995.6 Da) es un péptido hidrofílico derivado de una biblioteca de péptidos clonada en fagos, mientras que el p144 (TSLDASIIWAMMQN, 1580.86 Da) es un péptido parcialmente hidrofóbico derivado de la secuencia de la región extracelular del receptor de TGF β tipo III (Betaglicano, aminoácidos 730-740). Ambos péptidos se unen a TGF β , e impiden su unión al receptor (Dotor *et al*, 2007; Ezquerro *et al*, 2003). En otros casos se utilizó un inhibidor comercial de las quinasas del receptor de tipo I (ALK-4,-5,-7), SB 431542 hydrate (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), a una concentración final de 10 μ M durante 24 h. Todos los inhibidores se añadieron 30 min antes de comenzar el experimento.

2.2. Tratamientos sobre HMVEC-Lly

Los medios concentrados de células de NSCLC se obtuvieron tras el cultivo de las mismas en medio sin suero, con o sin TGF β , durante 24 h. Los sobrenadantes fueron recogidos y filtrados a través de una columna de separación de 3 kDa (Amicon Ultra, Millipore, Massachusetts, EE.UU.) por centrifugación a 3000 g durante 3 h en una centrífuga Allegra X-15 R (Beckman Coulter, Krefeld, Alemania). Estos medios se añadieron a una concentración final de 1X sobre monocapas de HMVEC-Lly durante las 24 h previas al experimento. En algunos casos se pretrataron las monocapas endoteliales con TNF α (Peprotech, Londres, Inglaterra) a una concentración de 20 ng/ml, 12 h antes de la realización de los experimentos.

2.3. Tratamientos con quimioterápicos

Para estudiar *in vitro* el efecto del tratamiento con TGF β sobre la respuesta a los agentes quimioterapéuticos se utilizaron: Taxol, Cisplatino, Etopósido (todos de Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) y Gemcitabina (Eli Lilly, Indianapolis, EE.UU.), utilizados en la práctica clínica. En este ensayo se sembraron en medio completo 10^4 células de NSCLC

por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano. Tras 24 h de tratamiento con 2 $\mu\text{g/ml}$ de TGF β , se añadió cada quimioterápico por separado a la concentración de su correspondiente IC50, establecida previamente en nuestro laboratorio (Irigoyen *et al*, 2010). Transcurridas 48 h se determinó la viabilidad mediante ensayos de rojo neutro descritos en el apartado 4.2. La tabla M.1 recoge las concentraciones utilizadas.

Tabla M.1. Concentraciones utilizadas para los agentes quimioterápicos.

Quimioterápico	Concentraciones en A549 (μM)	Concentraciones en H157 (μM)	Concentraciones en H1299 (μM)
Taxol	0,1	1	1
Cisplatino	15	50	40
Etopósido	5	40	10
Gemcitabina	12.5	12.5	12.5

3. Determinación de la viabilidad celular

3.1. Ensayo de caspasa 3/7

Se determinó la actividad de la caspasa 3/7 mediante un ensayo basado en quimioluminiscencia utilizando el kit comercial Caspase-Glo 3/7 (Promega, Madrid, España) y según las indicaciones del fabricante. Para ello se sembraron 10^4 células de NSCLC H157 en medio RPMI completo en placas de 96 pocillos. Una vez adheridas, se lavaron las células con PBS, se incubaron 12 h con medio RPMI sin suero y luego se añadieron cantidades crecientes de TGF β (0, 2, 5, 10, 20 ng/ml). Pasadas las 48 h se realizó el ensayo de caspasa 3/7 siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2. Medida de la viabilidad por incorporación del colorante vital rojo neutro

El rojo neutro es un colorante catiónico débil que se concentra en vacuolas citoplasmáticas por unión a residuos aniónicos, en las células viables. Una vez sembradas 10^4

células en placas de 96 pocillos, se trataron durante 48 h con TGF β a concentraciones de 0, 2, 10 y 20 ng/ml. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 200 μ l de medio de cultivo con HEPES (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) a una concentración 15 mM en todos los pocillos y 50 μ l de una solución filtrada de rojo neutro (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) (1 mg/ml en agua destilada) en 0,9% de NaCl (Panreac, Barcelona, España). Posteriormente se incubaron las placas durante 1 h y 30 min a 37°C y 5% de CO₂,

Transcurrido ese tiempo, se realizaron dos lavados con 200 μ l de PBS y por último se añadieron 100 μ l de NaH₂PO₄ en etanol al 50%. A continuación se agitaron las placas para que las células se lisaran y liberasen el colorante incorporado. La absorbancia de cada muestra se leyó a 540 nm, máximo de emisión del rojo neutro, y a 690 nm como control de fondo, en un lector de placas Tecan Sunrise (Hayward, CA, EE.UU.).

3.3. Ensayo de proliferación celular MTT

El ensayo del MTT se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa que origina un compuesto de color morado (formazán). De este modo se puede determinar la funcionalidad mitocondrial. Este método es empleado para medir la proliferación celular de modo comparativo ya que en condiciones similares los incrementos en la actividad mitocondrial serán proporcionales a los incrementos en el número de células.

Se sembraron 2×10^4 células H157 en medio RPMI completo, en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano (Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania). La proliferación de las células tumorales se analizó tras 2 días de tratamiento con 2 ng/ml de TGF β . Finalizada la incubación, se añadieron 10 μ l de reactivo MTT (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) por pocillo y cuando el precipitado morado se hizo visible, se añadieron 100 μ l de una solución detergente (10% SDS p/v, 50% DMF v/v, pH 4,7) para solubilizar los cristales de formazán y se mantuvo la placa en oscuridad 16 h. Tras este tiempo, se determinó la absorbancia a 540 nm en un lector de placas Tecan Sunrise.

4. Determinación de la expresión génica

4.1. Extracción y purificación de RNA total

La extracción de RNA se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIzol (Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Este reactivo contiene fenol para la separación orgánica, e isotiocianato de guanidina que es un inhibidor de RNasas. Durante la extracción del RNA se utilizó agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC) para evitar la contaminación con RNasas. El RNA fue purificado posteriormente utilizando el kit comercial RNeasy total RNA isolation kit (Quiagen, Barcelona, España), se disolvió en agua y se determinó espectrofotométricamente su concentración utilizando un Nanodrop (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.).

4.2. Retrotranscripción

Para cada reacción se utilizaron 2 µg de RNA molde, una concentración 5 µM de hexámeros, 1 unidad de la retrotranscriptasa MMLV-RT (Promega, Madison, WI, EE.UU.) y su tampón correspondiente (Promega) a una concentración final de 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ y 10 mM DTT. Se añadió a la reacción una mezcla de desoxinucleótidostrifosfato (Invitrogen, Barcelona, España) a una concentración final de 1 mM. El volumen final de la reacción se ajustó a 20 µl con H₂O libre de RNasas.

Inicialmente se desnaturalizó el RNA a 80° C durante 5 min y se mantuvo en hielo para evitar la renaturalización. Tras una breve centrifugación, se añadió la mezcla de reacción y se incubó a 37° C durante 1 h. Finalmente, se sometieron las muestras a un tratamiento de 10 min a 75° C para desnaturalizar la enzima transcriptasa reversa y detener así la reacción de polimerización. Las muestras de DNA complementario se almacenaron a -20° C hasta su posterior utilización.

4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional

La PCR se realizó en un volumen final de 20 µl diluyendo 1:2 la mezcla comercial maestra para PCR (Promega), cuya composición final en la reacción es: 25 unidades/ml de TaqDNA polimerasa en un tampón a pH 8,5, 200 mM dATP, 200 mM dGTP, 200 mM dCTP,

200 mM dTTP y 1,5 mM MgCl₂ (Promega). Posteriormente se añadió 1 µl de cada cebador sentido o antisentido en cada mezcla de reacción a una concentración final de 1 µM y se ajustó el volumen final a 20 µl con H₂O. Los cebadores utilizados están descritos en la tabla M.2.

El perfil de reacción utilizado fue de 5 min de desnaturalización inicial a 94° C seguido de un ciclo de 45 s a 94° C. A continuación, las muestras se sometieron a 35 ciclos de 45 s a 94° C, 45 s a la temperatura de fusión (T_M) y 1 min a 72° C. Por último las muestras se incubaron 5 min a 72° C, para su extensión final.

4.4. Electroforesis de DNA en geles horizontales de agarosa

Esa técnica se utilizó para separar las moléculas de DNA amplificadas mediante PCR convencional en función de su tamaño. Para la realización de los geles se utilizó agarosa Pronadisa de baja electroendosmosis (Hispanlab, Madrid, España) a una concentración del 2%.

Las muestras se prepararon añadiéndoles un tampón de carga (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% y ficoll 15%). Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 70 V durante 90 min. Al gel se le añadió bromuro de etidio, agente intercalante del DNA, a una concentración de 1 µg/ml para visualizar las bandas de amplificación al exponer el gel a luz ultravioleta. Se obtuvieron imágenes digitales mediante el uso del software Gel Doc (Bio-Rad, Berkeley, CA, EE.UU.). Para calcular el tamaño de las bandas obtenidas se incluyó en el gel el marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen, Barcelona, España), que presenta un patrón de bandas comprendidas entre 100 y 1200 pares de bases.

Tabla M.2. Oligonucleótidos usados para PCR convencional.

Gen	Secuencia cebadores	GenBank	Tamaño (Pb)	Tm(°C)
β-actina (ACTB)	5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTG-3' 5'-GGTGAGGATCTTCATGAGGT-3'	NM_001101	315	60
Factor de crecimiento transformante β1 (TGFβ1)	5'-CCAGTCCTGCCATCCCAGGTC-3' 5'-AAGCAGCCCTTCATGG-3'	NM_001718	224	60
Factor de crecimiento transformante β2 (TGFβ2)	5'-TGTCTGAACTAGTACCGCCTT-3' 5'-GGAAGAAGCGGGCTTTGGA-3'	NM_003238	99	60
Factor de crecimiento transformante β3 (TGFβ3)	5'-GTCAGGCAGTGGTGGTTCTCT-3' 5'-GGAAGAAGCGGGCTTTGGA-3'	NM_003239	398	62
Receptor tipo II de TGFβ (TGF-BRII)	5'-AGTGTCTGCTTCAGCTT-3' 5'-TCCTGCATGAGCCAACTGCAGC-3'	NM_003245	605	62
Integrina β3 (ITGB3)	5'-TGACGACTTCTCCTGTGTCC-3' 5'-AGCTGCCACATTCACACTTG-3'	NM_000212.2	188	60
Mucina 1 (MUC1)	5'-CCAGCCCGGGATACCTACCAT-3' 5'-GCGACGTGCCCTACAAGTT-3'	NM_001018016.2	188	60

4.5. Detección de la expresión génica mediante arrays basados en PCR cuantitativo

Con el objetivo de estudiar de forma más general y completa cuáles son las moléculas de adhesión, proteasas y componentes de la matriz extracelular cuya expresión se ve alterada tras el tratamiento con TGFβ, se realizó un array de expresión a partir de muestras de mRNA obtenidas de células de carcinoma escamoso pulmonar humano tratadas o no con

TGF β a dosis 2 ng/ml durante 24 h, usando la plataforma “SABiosciences RT² Profiler™ PCR Array” (Quiagen, Duesseldorf, Alemania). Además, para confirmar la especificidad del efecto del TGF β sobre las células tumorales, se incluyeron en el array muestras tratadas con los inhibidores del receptor tipo I de TGF β , SB 431542. Las retrotranscripciones se realizaron utilizando el RT² First Strand Kit (SABiosciences, Quiagen). Del mismo modo, las reacciones de PCR fueron preparadas con los reactivos propios de la plataforma, según lo indicado en el protocolo recomendado por la casa comercial. Las reacciones de PCR a tiempo real, se realizaron en un termociclador ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, California, EE.UU.).

El análisis de los datos obtenidos se hizo utilizando el software PCR Array Analysis Web Portal (<http://www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>). Este programa se basa en el método comparativo de análisis de PCR cuantitativo ($\Delta\Delta Ct$). En este método, los valores del ciclo umbral (Ct, del inglés *threshold cycle*) son obtenidos a partir de dos DNAs complementarios normalizados por separado con genes constitutivos (en inglés, *housekeeping genes*). Se amplificaron como control fragmentos de DNA correspondientes a los genes de las proteínas Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), β -actina (ACTB), $\beta 2$ microglobulina (B2M), Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1) y proteína ribosomal L13a (RPL13A). El método $\Delta\Delta Ct$ asume que la eficiencia de la amplificación del gen de interés y de los genes constitutivos es de alrededor de 100%, o sea 2, ya que la cantidad de amplicones se duplican por ciclo. Para realizar la comparación de la expresión con este método, en primer lugar, se calcula la diferencia entre los valores Ct (ΔCt) de todas las muestras frente a las de los genes constitutivos. A continuación, se calcula la diferencia de los valores de ΔCt entre las muestras de los grupos con tratamiento y las muestras del grupo control ($\Delta\Delta Ct$). En resumen, el cambio de expresión entre ambos grupos es calculado por la fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (*fold-change*).

4.6. PCR a tiempo real

Para validar los resultados obtenidos en el array de expresión, se realizaron por triplicado PCRs cuantitativas utilizando cebadores específicos comerciales (Origene, Rockville, MD, EE.UU.) de aquellos genes que al menos duplicaron su expresión tras el tratamiento con TGF β . Las secuencias de los distintos cebadores se encuentran recogidas en la tabla M.3. Para cada muestra se preparó una mezcla que contenía 12,5 μ l de SYBER Green

PCR Master Mix que contiene el fluorocromo SYBER Green 1, DNA polimerasa AmpliTaq Gold, dNTPs con dUTP y el tampón adecuado para el funcionamiento de la enzima (Applied Biosystems, California, EE.UU.), 1 μ l de la mezcla comercial de cebadores a una concentración de 10 μ M, 2 μ l de cDNA a 4 ng/ μ l y agua libre de nucleasas hasta un volumen de 25 μ l. Todas las reacciones se hicieron por triplicado en el termociclador ABI PRISM 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, California, EE.UU.).

4.7. Transfecciones estables de células H157

Para llevar a cabo el silenciamiento estable de la integrina β 3 se transfectaron mediante electroporación, células H157 con un shRNA comercial frente a la región codificante de la integrina β 3 (TI348322: GTGACGACTTCTCCTGTGTCCGCTACA AAG - HuSHTM shRNA Plasmid Panels – 29mer-, Origene Technologies, Rockville, MD, EE.UU). El vector de expresión del plásmido, denominado pRS, de 5430 pb contiene los genes de resistencia a ampicilina para la selección en bacterias y puromicina para la selección en células de mamíferos. Paralelamente, como control se transfectaron células con un shRNA no específico (scramble) (TR30012: 5' GCACTACCAGAGCTAA CTCAGATAGTACT 3'), incluido en el kit de HuSHTM shRNA Plasmid Panels.

Para ello, se resuspendieron células de una placa de cultivo confluyente de 10 cm de diámetro en 1 ml de medio de cultivo reducido Opti-MEM® (Invitrogen, Barcelona, España) con 20 μ g del shRNA β 3 y se electroporaron las células utilizando un electroporador Gene Pulsar I (Bio-rad, Berkeley, CA, EE.UU.). Se sometieron las células a pulsos exponenciales de 975 μ F de capacitancia y 250 V de voltaje. Posteriormente se sembraron las células en medio completo y tras medio día de cultivo se les añadió dihidrocloruro de puromicina obtenida de *Streptomyces alboniger* (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) a una concentración de 1,5 μ g/ml.

Los clones de células H157 que expresaban establemente el ShRNA específico frente a la integrina β 3 silenciada, resistentes a puromicina, fueron amplificados en medio con una concentración de mantenimiento de puromicina de 0,75 μ g/ml. La eficiencia de transfección se confirmó por PCR, citometría de flujo e inmunofluorescencia.

Para expresar establemente la proteína fluorescente verde (GFP) en células H157 (H157-GFP), H157 shRNA β 3 (GFP-shRNA β 3) y scramble (GFP-scramble), se transfectaron 2×10^5 células por pocillo con 1 μ g del vector plasmídico pEGFP-C1 que contiene el gen GFP (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU.), 3 μ l del reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche, IN, EE.UU.) en 96 μ l de medio RPMI sin suero (Invitrogen, Barcelona, España) y se siguieron las instrucciones de la casa comercial. Para seleccionar células transfectadas que expresasen establemente GFP, se añadieron al medio basal 500 μ g/ml del antibiótico geneticina (G418) obtenido de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania) y se seleccionaron los clones resistentes al antibiótico. Para obtener una población de más del 97% de alta expresión de GFP, se separaron las células utilizando un separador celular FACSAria II (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EE.UU.).

Tabla M.3. Cebadores comerciales para las amplificaciones mediante PCR en tiempo real de la validación de cambios en la expresión génica

Gen	Secuencia cebadores	Nombre	Genbank
Desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina 1	5'-GCGTCAATGCTTTCCAACCTGG-3' 5'-GGGATTCTGAGGCTTGTCCATC-3'	ADAMTS1	NM_006988
β actina	5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTG-3' 5'-GGTGAGGATCTTCATGAGGT-3'	β -ACTIN	NM_001101
Factor de crecimiento de tejido conectivo	5'-CTTGCGAAGCTGACCTGGAAGA-3' 5'-CCGTCCGGTACATACTCCACAGA-3'	CTGF	NM_001901
Fibronectina 1	5'-GATAAATCAACAGTGGGAGC-3' 5'-TAAAGACTCCATGATCTGGG-3'	FN1	NM_002026.2
Integrina β 3	5'-TGACGACTTCTCCTGTGTCC-3' 5'-AGCTGCCACATTCACACTTG-3'	ITGB3	NM_000212.2
Integrina β 5	5'-TGGCTGTGGAGGTGAGATAG-3' 5'-CCTGTAGCTGGAAGGTGGTC-3'	ITGB5	NM_002213.3
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	5'-CCAAGGTCATCCATGACAAC-3' 5'-TGTCATAACCAGGAAATGAGC-3'	GAPDH	NM_002046.3
Laminina β 1	5'-GAGGTGTCTCAAGTGCCTGTAC-3' 5'-ACTGGCAGTCAGAGCCGTTACA-3'	LAMB1	NM_002291
Metaloproteasa de la matriz 2	5'-AGCGAGTGGATGCCGCCTTTAA-3' 5'-CATTCCAGGCATCTGCGATGAG-3'	MMP2	NM_004530
Metaloproteasa de la matriz 3	5'-CACTCACAGACCTGACTCGGTT-3' 5'-AAGCAGGATCACAGTTGGCTGG-3'	MMP3	NM_002422

Gen	Secuencia cebadores	Nombre	Genbank
Metaloproteasa de la matriz 10	5'-TCCAGGCTGTATGAAGGAGAGG-3' 5'-GGTAGGCATGAGCCAAACTGTG-3'	MMP10	NM_002425
Metaloproteasa de la matriz 11	5'-GAGAAGACGGACCTCACCTACA-3' 5'-CTCAGTAAAGGTGAGTGGCGTC-3'	MMP11	NM_002422
Metaloproteasa de la matriz 14	5'-CCTTGGACTGTCAGGAATGAGG-3' 5'-TTCTCCGTGTCCATCCACTGGT-3'	MMP14	NM_004995
Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine (Osteonectina)	5'-TGCCTGATGAGACAGAGGTGGT-3' 5'-CTTCGGTTTCCTCTGCACCATC-3'	SPARC	NM_003118
Factor de crecimiento transformante, inducible por TGF β	5'-GGACTGACGGAGACCCTCAA-3' 5'-GCATCTCTCCCAAGAGTCTGCT-3'	TGFBI	NM_000358
Trombospondina 1	5'-GCTGGAAATGTGGTGCTTGTCC-3' 5'-CTCCATTGTGGTTGAAGCAGGC-3'	THBS1	NM_003246
Trombospondina 2	5'-CAGTCTGAGCAAGTGTGACACC-3' 5'-TTGCAGAGACGGATGCGTGTGA-3'	THBS2	NM_003247
Inhibidor tisular de metaloproteasas 2	5'-ACCCTCTGTGACTTCATCGTGC-3' 5'-GGAGATGTAGCACGGGATCATG-3'	TIMP2	NM_003255
Tenascina C	5'-ATGTCCTCCTGACAGCCGAGAA-3' 5'-AGTCACGGTGAGGTTTTCCAGC-3'	TNC	NM_002160
Versicano	5'-TTGGACCTCAGGCGCTTTCTAC-3' 5'-GGATGACCAATTACTCAAATCAC-3'	VCAN	NM_004385

5. Determinación de la expresión de proteínas

5.1. Extracción de proteínas y Western Blot

Las células se crecieron en placas de 10 cm de diámetro y tras retirar el PBS, se añadieron 100 µl de tampón de lisis (PBS, SDS 0,1%, NP-40 1%, Deoxicolato Sódico 0,5%, β-Glicerosfosfato 0,2 mM, Na₃VO₄ 1 mM, cocktail de inhibidores 1X (Complete, Roche, IN, EE.UU.), enfriado en hielo. Se despegaron las células utilizando un rascador y se transfirieron a tubos de microcentrífuga. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 4° C y 10.000 x g para precipitar los restos celulares y se recogió la fracción soluble, que fue almacenada a -20° C hasta su posterior utilización.

La concentración de proteínas en las muestras se midió mediante el ensayo del ácido bicinconínico BCA (Goldschmidt y Kimelberg, 1989), basado en la reducción del Cu²⁺ (azul) a Cu⁺ por las proteínas (Pierce, Rokcford, IL, EE.UU.).

Para la electroforesis de proteínas se utilizaron minigeles de poliacrilamida discontinuos de 0,75 mm de espesor (acrilamida:N,N'-metilenbisacrilamida 37,5:1, Bio-Rad, Berkeley, CA, EE.UU.), constituidos por un gel inferior de separación al 12% de poliacrilamida preparado en tampón de separación (Acrilamida/bis-acrilamida (37,5:1) 10%, Tris-HCl (pH 8,8) 375 mM, SDS 0,1%, APS 0,1% (v/v), TEMED 0,175% (v/v)), y un gel superior de compactación al 4% de poliacrilamida, preparado en tampón de compactación (Acrilamida/bis-acrilamida (37,5:1) 4%, Tris-HCl (pH 6,8) 125 mM, SDS 0,1%, APS 0,1% (v/v), TEMED 0,175% (v/v)).

La desnaturalización de las muestras se llevó a cabo diluyendo 20 µg de la muestra en tampón de carga con SDS (Tris-HCl (pH 6,8) 312,5 mM, SDS 10% (p/v), Glicerol 50% (v/v) β-Mercaptoetanol 25% (v/v), Azul de bromofenol 0,25% (p/v)) e hirviéndolas durante 5 min, para enfriarlas en hielo antes de su carga.

Para poder estimar el peso molecular de las proteínas, se utilizaron proteínas de peso molecular conocido teñidas que se cargaron en el gel de modo independiente (Prestained SDS-PAGE Standards Broad range, Bio-Rad, Berkeley, CA, EE.UU.).

Tabla M.4. Anticuerpos primarios utilizados para Western blot.

Proteína	Obtenido en	Condiciones	Casa comercial
β -actina	Ratón	1:5000, TBS-T leche 5%, 1 h, T ^a ambiente	Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania)
P-FAK (Tyr 397)	Conejo	1:1000, TBS-T BSA 5%, 16 h, 4° C	Cell Signalling (Danvers, MA, EE.UU.)
FAK	Conejo	1:2000, TBS-T BSA 5%, 16 h, 4° C	Cell Signalling (Danvers, MA, EE.UU.)
TGF β 1	Ratón	1:300, TBS-T BSA 5%, 2,5 h, T° ambiente	RyD (Minneapolis, EE.UU.)
T β RII	Cabra	1:600, TBS-T BSA 5%, 2 h, T° ambiente	RyD (Minneapolis, EE.UU.)
P-SMAD 2 (Ser465/467)	Conejo	1:2000, 16 h, 4° C	Chemicon International California, EE.UU.)
SMAD 2/3	Conejo	1:2000, 16 h, 4° C	Cell Signalling (Danvers, MA, EE.UU.)
P-Src (Tyr 416)	Conejo	1:1000, TBS-T BSA 5%, 16 h, 4° C	Cell Signalling (Danvers, MA, EE.UU.)
Src	Ratón	1:1000, 5%TBS-T leche, 16 h, 4° C	Cell Signalling (Danvers, MA, EE.UU.)

La electroforesis se llevó a cabo en cubetas Mini PROTEAN 3 (Bio-Rad, Berkeley, CA, EE.UU.) en tampón de electroforesis (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v)) a un voltaje constante de 100 V, hasta que el frente de azul de bromofenol presente en los tampones de carga alcanzó el extremo inferior del gel.

Las proteínas separadas electroforéticamente en los geles de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Berkeley, CA, EE.UU.) (Towbin *et al*, 1979) para su posterior hibridación con anticuerpos específicos. Para ello, se utilizó un

sistema de transferencia electroforética en tanque de Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, Berkeley, CA, EE.UU.), a 300 mA durante 1 h a 4° C en tampón de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20% (v/v)).

A continuación, las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente en TBS-T (Tris-HCl (pH 7,4) 25 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 0,1% (v/v)) con una concentración de 5% (p/v) de leche desnatada en polvo o BSA, para evitar la adsorción inespecífica de los anticuerpos a la superficie de la membrana de nitrocelulosa.

Seguidamente, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario diluido en TBS-T leche o TBS-T BSA. La dilución, tiempo y temperatura de incubación dependieron del anticuerpo primario utilizado y se detallan en la tabla M.4.

Tras la incubación de los anticuerpos primarios se realizaron tres lavados de 10 min en TBS-T y a continuación se añadió el anticuerpo secundario adecuado marcado con peroxidasa a la dilución correspondiente en TBS-T leche o TBS-T BSA. Los anticuerpos utilizados se detallan en la tabla M.5. Tras esta incubación, se realizaron 4 lavados de 10 min en TBS-T.

Tabla M.5. Anticuerpos secundarios utilizados para Western blot.

Proteína	Obtenido en	Condiciones	Casa comercial
IgG de anti-ratón conjugado con peroxidasa	Cabra	1:5000, 1 h, T° ambiente para TGFβ y β-actina	Amersham (Wisconsin, EE.UU.)
IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa	Cabra	1:5000, 1 h, T° ambiente para PMAD y SMAD	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz EE.UU.)
IgG anti-cabra conjugado con peroxidasa	Conejo	1:5000, 1 h, T° ambiente	Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania)

Las bandas inmunorreactivas se visualizaron mediante quimioluminiscencia utilizando el kit Lumi-light^{PLUS} Western Blotting de Roche (IN, EE.UU.). Para ello se incubaron las membranas con una solución de peróxido de hidrógeno y luminol, que al ser

oxidado por la peroxidasa en presencia de los fenoles presentes en las proteínas, emite luz a una longitud de onda de 428 nm. A continuación se expusieron películas fotográficas sensibles a la luz azul (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Wisconsin, EE.UU.) sobre las membranas durante el tiempo necesario para registrar la señal y se revelaron en un revelador automático (Curix 60 de AGFA-GEVAERT, N.V, Bélgica). Para cuantificar mediante densitometría el patrón de bandas obtenido se utilizó el programa Quantity One (Bio-Rad, Berkeley, CA, EE.UU.)

5.2. Citometría de flujo

Las células cultivadas en placas se despegaron mediante tripsinización y se resuspendieron en la solución de unión (EDTA 2 mM y 5% SFB en PBS). Posteriormente se incubaron durante 10 min a 4° C con anticuerpos monoclonales específicos en las condiciones descritas en la tabla A.4 (Anexos, págs. 164-166).

Después, las células se lavaron dos veces con la solución de unión y se añadió el anticuerpo secundario correspondiente diluido 1:500 en la solución de unión (tabla A.4, Anexos, págs. 164-166). Tras incubar las células durante 10 min a 4° C se lavaron una vez con la solución de unión, y se analizaron 2×10^4 células en un citómetro FACScan (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.) utilizando el programa de adquisición Cellquest (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.).

6. Ensayos funcionales

6.1. Actividad proteolítica

6.1.1. Zimografía

La zimografía es una técnica que permite visualizar la presencia de actividad proteasa mediante electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida que contienen diversos sustratos de las proteasas copolimerizadas. En este caso, los geles utilizados eran de

acrilamida con SDS y gelatina al 10% (Bio-Rad, Berkeley, CA, EE.UU.), por lo tanto, detecta la actividad de las gelatinasas (MMP2 y MMP9).

Para realizar la zimografía, se centrifugaron durante 5 min a 1500 r.p.m. 15 ml de sobrenadantes de células de carcinoma pulmonar A549, H1299 y H157 incubadas 24 h con 2 ng/ml de TGF β , para eliminar los restos celulares. A continuación, fueron sometidos a una centrifugación de 3000 x g a 4° C utilizando concentradores Amicon Ultra-15 que posee un límite de cribado de proteínas de 3 kDa (Millipore, Massachusetts, EE.UU.) hasta llegar al volumen final de 200 μ l.

Para cada muestra, se mezclaron 40 μ l de cada sobrenadante concentrado con 10 μ l de solución tampón de carga no reductor 2x (Glicerol 20%, Azul bromofenol al 0,005%, SDS al 4% y Tris 126 mM, pH=6,8) y se cargaron en el gel. La electroforesis se realizó a una intensidad de 125 V durante 2 h a 4° C en tampón de electroforesis (Tris HCl 0,1M, SDS 0,1% y Glicina 192 mM, pH 8,3). A continuación se lavó el gel durante 30 min en una disolución de Tritón X-100 (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) al 2,7% en agua ultrapura para eliminar los restos de SDS. Tras el lavado, se incubó el gel 16 h a 37° C en una disolución que permite la actividad proteasa (5 mM de Tris Base, 20 mM NaCl, 4 mM HCl 6 N, 0,5 mM CaCl₂, pH 7,6). Después de la incubación, se realizaron 3 lavados de 15 min en agua ultrapura y se tiñó el gel durante 1 h con solución de tinción Gel Code Blue Satin Reagent (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.).

6.1.2. Ensayo de degradación de matriz de gelatina fluorescente

Para corroborar los resultados obtenidos en las zimografías se realizó el ensayo de degradación de matrices de gelatina fluorescentes EnzChek Gelatinase Assay Kit de Molecular Probes Inc (Eugene, OR, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Este ensayo consistía en cubrir los pocillos con 12,5 μ g/ml de gelatina-FITC en 100 μ l de tampón de reacción 1X (50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂, 0,2 mM de azida sódica). A continuación se sembraron las células a una concentración de 2×10^4 células H157 por pocillo, tratadas o no con TGF β , y tras 24 h de incubación a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa, se midió la fluorescencia en un fluorímetro de placas BMG, modelo Fluostar Optima utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de

530 nm. El aumento de la fluorescencia emitida por la gelatina es proporcional a su degradación.

6.2. Ensayos de adhesión

6.2.1. Adhesión de células H157 a proteínas de matriz extracelular

Para realizar los ensayos de adhesión a proteínas de la matriz extracelular, se cubrieron placas de 96 pocillos de fondo plano (Cellstar, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) con 50 µg/ml de colágeno tipo I (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.), 50 µg/ml de colágeno tipo IV, 10 µg/ml de fibronectina, 1 µg/ml de vitronectina, ó 3% de BSA como control negativo (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) durante 2 h a 37° C. Se lavaron los pocillos dos veces con PBS y se bloqueó la adhesión inespecífica con BSA al 1% en PBS durante 1 h a 37° C. Transcurrido este tiempo se eliminaron los restos de BSA.

Una vez preparada la placa de cultivo para la adhesión, se tripsinizaron las células H157, se resuspendieron en RPMI sin suero a una concentración de 10^6 células/ml, y se marcaron con calceína-AM (Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) a una concentración de 10 µM durante 20 min a 37° C y en oscuridad, agitándolas suavemente para evitar su sedimentación.

Tras el marcaje celular, se realizaron tres lavados con RPMI sin suero para eliminar el exceso de calceína y se resuspendieron las células en medio de adhesión (RPMI con BSA al 0,5% y 20 mM de HEPES) a una concentración de 10^6 células/ml. Posteriormente, se añadieron 100 µl de células por pocillo y se incubaron durante 30 min a 37° C. Tras realizar 3 lavados con medio de adhesión se añadieron 100 µl de PBS. A continuación, se midieron las placas en un fluorímetro de placas BMG, modelo Fluostar Optima utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una de emisión de 530 nm. Se hicieron tres replicas para cada condición.

Para inhibir la adhesión mediada por las integrinas $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$, se incubaron las células H157 con anticuerpos específicos bloqueantes (MAB1976Z and MAB1961Z respectivamente, Chemicon International/Millipore, California, EE.UU.) a una concentración 1:100, durante 30 min antes de los ensayos de adhesión. Además, se bloqueó específicamente

la vía de señalización mediada por FAK incubando las células 16 h con 1 μ M del inhibidor de FAK PF-573228 (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania).

6.2.2. Adhesión de células H157 al endotelio linfático de pulmón

Para los ensayos de adhesión de células tumorales al endotelio linfático, se sembraron 4×10^4 células HMVEC-Lly por pocillo en placas de 96 pocillos previamente tratadas con 50 μ g/ml de colágeno tipo I de cola de rata (Becton Dickinson, NJ, EE.UU.). Una vez obtenida la monocapa de endotelio, se prosiguió el ensayo de adhesión como se ha descrito en el apartado anterior.

6.3 Ensayos de migración

6.3.1. Migración a través de proteínas de matriz extracelular

Para estudiar la migración celular se utilizaron cámaras tipo Boyden (Corning, NY, EE.UU.) con poros de 8 μ m de diámetro. En algunos experimentos antes de añadir las células tumorales a la cámara superior, se recubrieron éstos con proteínas de la matriz, como se ha descrito en el apartado 6.2.1.

En pocillo se añadieron 5×10^4 células tumorales en 150 μ l de medio sin suero y en la parte inferior de la cámara se añadieron 350 μ l de medio de cultivo con 10% de Fetal Clone III como quimiotáctico. Como control negativo, se añadió RPMI sin suero.

Las células se mantuvieron durante 24 h a 37° C en el incubador al 5% de CO₂. Pasado este tiempo, se descartó el medio de la cámara superior y las posibles células que quedaron adheridas a la superficie superior del filtro se arrastraron utilizando un hisopo. Las células adheridas a la parte inferior de la membrana se fijaron con formaldehído al 4% durante 15 min y después se tiñeron durante 10 min con cristal violeta al 0,5% en agua. El número de células que migraron se contó utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000 (Amstelveen, Holanda). Se contaron un mínimo de cuatro campos a partir de fotografías adquiridas con el objetivo de 10x.

6.3.2. Transmigración a través de monocapas de endotelio linfático de pulmón

Para los ensayos de transmigración de células tumorales a través del endotelio linfático, se sembraron 4×10^4 células HMVEC-L1y por pocillo en placas de 96 pocillos previamente tratadas con 50 $\mu\text{g/ml}$ colágeno tipo I de cola de rata (Becton Dickinson, NJ, EE.UU.) y se incubaron las células 24 h para permitir que se formara una monocapa confluyente de endotelio linfático. A continuación se realizaron los ensayos de transmigración como está descrito en el apartado 6.3.1.

6.3.3. Boqueo de transmigración con agentes químicos o anticuerpos bloqueantes

Los inhibidores de $\text{TGF}\beta$, de las integrinas $\alpha\text{v}\beta3$, $\alpha\text{v}\beta5$ y de FAK fueron utilizados del mismo modo que en los ensayos de adhesión (apartado 18.4). Para inhibir la transmigración mediada por L1CAM, se utilizaron dos anticuerpos monoclonales de ratón frente a L1CAM humana, cedidos por el Dr. Peter Altevogt (DKFZ: Centro Alemán de Investigación en Cáncer, Heidelberg, Alemania). Para bloquear la unión homotípica L1-L1, se utilizó el anticuerpo 9.3 frente a los dominios IgG 1 y 2 de la L1CAM humana y para bloquear indirectamente la unión de L1CAM con las integrinas se incubaron las células con el anticuerpo 35.9 frente al dominio IgG 6, próximo a la región RGD de la molécula de L1CAM (Schäfer et al., 2012).

El bloqueo de la transmigración con los anticuerpos de L1CAM y de CD31 (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) consistió en preincubar por separado las células tumorales y las monocapas de células endoteliales con los anticuerpos a una dilución de 1:100 durante 1 h. A continuación, se añadieron las células tumorales en la parte superior de la cámara Boyden y se prosiguió el ensayo de transmigración como ya se ha descrito en el apartado anterior.

6.3.4. Ensayo de proliferación independiente de sustrato en agar blando

Este ensayo se realizó para estudiar si las células H157 tratadas con $\text{TGF}\beta$ tenían una mayor capacidad de formar colonias independientes de sustrato. En primer lugar se añadió en

una placa de 6 pocillos una capa inferior de agar blando al 0,6% en medio de cultivo RPMI 2,5x (25% de Fetal Clone III con 2,5% de Penicilina/Estreptomicina) y se dejó enfriar dentro de la campana de flujo laminar durante 1 h. Transcurrido ese tiempo se añadió 1ml de una mezcla compuesta por agar al 0,3%, en medio RPMI 1,4x (14,28% de Fetal Clone III y 1,4% de Penicilina/Estreptomicina) y 2×10^3 células H157 tratadas o no con TGF β durante 24 h.

Las muestras se mantuvieron 15 min en la campana para que la capa superior de gel se secase y posteriormente, se incubó durante una semana a 37° C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Pasado el tiempo de incubación, se realizó el revelado de la placa añadiendo a cada pocillo 500 μ l de reactivo MTT a una concentración de 10 mg/ml diluido en PBS y tras incubar otras 4 h, se retiró el exceso, se añadieron 500 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) al 99,9% y se incubó hasta el día siguiente. Las colonias teñidas de negro se contaron utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000 (Amstelveen, Holanda) con el objetivo de 10x.

7. Experimentos en modelos animales

Todos los ensayos con animales se llevaron a cabo en ratones hembras *nude* atímicas de 5-8 semanas de edad, obtenidos de los laboratorios Harlan (Barcelona, España). Los ratones se mantuvieron en condiciones estériles a temperatura y humedad constantes y con comida *ad libitum*. Los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Navarra (n° 027-09).

7.1. Modelo de metástasis a ganglios poplíteos

Este modelo animal xenográfico consiste en inocular en las almohadillas de las patas traseras de los ratones inmunosuprimidos 10^6 células de carcinoma escamoso de pulmón H157, transfectadas establemente con GFP y tratadas con TGF β durante 5 días, para estudiar la metástasis de las células tumorales a través del endotelio linfático hacia los ganglios poplíteos. Los animales se sacrificaron cuando los tumores de la almohadilla de la pata adquirían un tamaño aproximado de 5 mm. Los tumores y los ganglios poplíteos de los ratones se extrajeron, se fijaron en formaldehído 4%, se incluyeron en parafina y se hicieron

cortes para posteriores análisis por inmunohistoquímica. Este método se utilizó únicamente como primera medida de la capacidad metastásica de nuestras células y no resultó satisfactorio en nuestras condiciones porque no se observó la presencia de células tumorales en los ganglios poplíteos.

7.2. Modelo ortotópico de inyección de células de carcinoma escamoso de pulmón humano H157 en pulmones de ratones atímicos

Este modelo animal se desarrolló a partir de la adaptación de los modelos descritos por Onn y colaboradores (Onn *et al*, 2003) y Yamaura y colaboradores (Doki *et al*, 1999; Yamaura *et al*, 1999; Yamaura *et al*, 2000). Para la inyección intrapulmonar de células H157-GFP en ratones *nude*, se anestesiaron los animales por inhalación de isofluorano al 99,9% y se colocaron en la posición de decúbito lateral derecho. Después de desinfectar la zona con una solución de povidona iodada (Betadine®, Meda Pharma, Madrid, España), se realizó una incisión transversal de 5 mm en la región lateral izquierda, aproximadamente 5 mm debajo de la escápula y 1,5 cm por encima de la última costilla del ratón. La grasa subcutánea y la musculatura se separaron hasta verse el pulmón izquierdo a través de los músculos intercostales. A continuación se insertó una aguja de 30-gauge aproximadamente 5 mm dentro del pulmón y se inoculó una suspensión compuesta por 10^6 de células resuspendidas en 10 μ l de PBS con 10 μ l de Matrigel (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.) a una concentración de 1 μ g/ μ l en un volumen total de 20 μ l. En la incisión se realizó una sutura con hilo 6-0 (Vicryl, Ethicon Endo-Surgery GmbH, Norderstedt, Alemania).

Los ratones se sacrificaron a los 28 días después de la inoculación o cuando los animales sufrieron caquexia o dificultad respiratoria. Después de la evaluación macroscópica, los pulmones con los tumores primarios y los ganglios linfáticos braquiales y axilares fueron fijados en formaldehído 4% o solución de Bouin (75% de solución acuosa saturada al 2% de ácido pícrico, 20% de formalina al 40% y 5% de ácido acético glacial), fueron incluidos en parafina y analizados mediante inmunohistoquímica.

7.3. Análisis de la afectación pulmonar mediante micro-tomografía axial computarizada

El sistema de tomografía axial computarizada MicroCAT II (Siemens, Munich, Alemania) fue operado por Joaquín Mateo Urdiales del departamento de Imagen del CIMA. En líneas generales, los ratones fueron anestesiados con 75 mg/Kg de ketamina y 10 mg/Kg de xilacina. A continuación los ratones fueron intubados endotraquealmente utilizando un catéter endovenoso de 22 GA x 25 mm de longitud. El ritmo ventilatorio de los animales se controló artificialmente durante el escaneado para facilitar la visualización correcta de los pulmones. Al finalizar la obtención de las radiografías, los ratones se mantuvieron conectados 5 min con ventilación a ritmo normal, bajo una lámpara de infrarrojos para subir la temperatura corporal y se les administraron algunas gotas de suero fisiológico para hidratarlos. Por último, se desconectaron los animales y se esperó a que se recuperaran, manteniendo su cabeza recta y la lengua hacia fuera para abrir las vías respiratorias y permitir que empezaran a respirar de forma regular y profunda.

7.4. Análisis histológico

Se analizaron mediante inmunohistoquímica los cortes de 3 μm de tejido de los pulmones, tumores y ganglios de los ratones sacrificados. Tras desparafinar las muestras a 60° C, se realizó la hidratación de los tejidos pasando primero por alcoholes de graduación decreciente hasta finalmente sumergir las muestras en agua. Una vez hidratados, se incubaron los tejidos con agua oxigenada al 3% durante 10 min para eliminar la peroxidasa endógena y se sometieron al pretratamiento con calentamiento en microondas en tampón de citrato (2,1 g/L, pH 6) para favorecer la unión del anticuerpo.

Posteriormente, tras el lavado con TBS, se realizó el bloqueo de las uniones inespecíficas con suero de cabra al 5% diluido 1:20 en TBS durante 30 min en cámara húmeda y a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron las muestras 16 h a 4° C con el anticuerpo primario frente a GFP, a una concentración 1:1000 (Abcam, Cambridge, Inglaterra). Tras este tiempo, se incubaron las muestras con el polímero Envision (Dako, Glostrup, Dinamarca) durante 30 min a temperatura ambiente. Después de varios lavados con TBS, se llevó a cabo el revelado con diaminobencidina (DAB), y fueron posteriormente contrastados con hematoxilina de Harris. Tras deshidratar las muestras mediante inmersión en

soluciones de alcohol de graduaciones crecientes, se montaron las preparaciones en medio de montaje DPX (BDH Chemical, Poole, Inglaterra). Como controles negativos se realizaron incubaciones con un control de isotipo o se omitió el anticuerpo primario. Para la cuantificación del marcaje se analizó el porcentaje de células positivas (0-100%), según descrito (Irigoyen *et al*, 2010).

7.5. Análisis del crecimiento del tumor primario en los pulmones de los ratones

La cuantificación del crecimiento de los tumores pulmonares, se realizó mediante el cálculo del tamaño de área del tumor. Para ello, primero se obtuvieron imágenes panorámicas de los cortes histológicos con un aumento de 4x utilizando un microscopio automatizado Zeiss Axio Imager M1 (Carl Zeiss, AG, Oberkochen, Alemania) y el programa de imagen Zeiss Axio Vision versión 4.7 (Carl Zeiss, AG, Oberkochen, Alemania). A partir de estas imágenes, se realizaron mediciones morfométricas de las áreas tumorales con el programa de imágenes Fiji (ImageJ, NIH, Bethesda, MD, EE.UU.), con una aplicación creada para tal efecto por la Unidad de Imagen del CIMA, que transformaba las mediciones obtenidas en píxeles, a micras.

8. Análisis por microscopía de fluorescencia

8.1. Microscopía de fluorescencia

Para los ensayos de microscopía de fluorescencia, se sembraron 6×10^4 células de carcinoma pulmonar por pocillo en medio RPMI completo, en cámaras de 8 pocillos (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.) tratadas previamente durante 1 h a temperatura ambiente con 50 $\mu\text{g/ml}$ de colágeno tipo I (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.). Al día siguiente, se lavaron las células con TBS y se fijaron en paraformaldehído al 2% durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron en TBS 3 veces y se procedió al bloqueo con suero de cabra durante 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, se añadieron los anticuerpos primarios y secundarios según se ha descrito en la tabla M.6, y se incubaron cada uno durante 1 h, a temperatura ambiente. En algunos experimentos se añadió Hoechst (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) a una concentración de 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ durante un

minuto para marcar los núcleos, antes de montar las preparaciones con el medio de montaje (Gel/Mount, Biomed, CA, EE.UU.). En otros casos, se utilizó un medio de montaje que contiene DAPI II (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) para marcar los núcleos.

Los filamentos de actina del citoesqueleto celular se detectaron mediante tinción con la micotoxina faloidina conjugada con FITC o TRITC a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$, durante 1 h a temperatura ambiente. Las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia automatizado Zeiss Axioplan 2ie y fueron analizadas con el programa de análisis de imagen *Axiomager Z.1* (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania).

8.2. Microscopía láser de barrido confocal

Se utilizó un microscopio láser de barrido confocal LSM 510 META (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania) y los programas de análisis de imagen *Zeiss LSM Image Browser* (Carl Zeiss AG, AG, Oberkochen, Alemania) y *Volocity 3D Image Analysis Software* (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.). En estos casos se utilizaron portas de 8 pocillos de IBIDI (Múnich, Alemania) que fueron a su vez cubiertos con diferentes proteínas de la matriz extracelular para facilitar la adhesión de las células endoteliales (tabla M.7). Una vez preparados los pocillos, se sembraron 5×10^4 células de endotelio linfático en un volumen de 200 μl .

Tabla M.6. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia.

Proteína	Anticuerpo primario	Huésped	Casa comercial	Anticuerpo secundario
$\alpha\beta 3$	Anti-Integrina $\alpha V\beta 3$, clon LM609. Dilución 1:100	Ratón	Chemicon (California, EE.UU.)	Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, Barcelona, España) goat anti-mouse IgG. Dilución 1:200
$\beta 3$	Anti-Integrina beta3A (CD61) clon EP2417Y Dilución 1:100	Conejo	Chemicon (California, EE.UU.)	Alexa Fluor® 594 (Invitrogen, Barcelona, España) goat anti-rabbit IgG. Dilución 1:200
CD31	Anti-PECAM-1 (CD31) humano, clon WM-59 Dilución 1:100	Ratón	Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania).	Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, Barcelona, España) goat anti-mouse IgG. Dilución 1:200

Después de 24 h, se sembraron 10^4 células H157 previamente marcadas con lectina fluorescente WGA Alexa Fluor® 647 (Invitrogen, Barcelona, España) a una dilución 1:500 en medio EBM-2. A continuación se realizaron las incubaciones con los anticuerpos para inmunofluorescencia ya descritos en el apartado anterior.

8.3. Microscopía confocal a tiempo real

Se utilizó el microscopio Ultraview ERS, (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.) para cuantificar el tiempo de adhesión, el movimiento, la distancia recorrida y la velocidad de las células H157 sobre monocapas del endotelio linfático. Para ello, se sembraron 4×10^4 células endoteliales en placas para microscopía (MatTek Corporation, MA, EE.UU.) previamente colagenizadas. Una vez formada la monocapa de endotelio se marcaron las células del endotelio 20 min a 37° C con lectina fluorescente WGA-Alexa Fluor® 647 (Invitrogen, Barcelona, España). A continuación, se lavó la monocapa con medio EBM-2 y se añadieron 2×10^4 células H157 GFP. Se capturaron imágenes fotografiando 15 planos en el eje z separados $1 \mu\text{m}$ cada uno de ellos, cada 2 min durante dos horas. Para el análisis de las imágenes obtenidas se utilizaron los programas *Ultraview ERS software* (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.) y el programa *Fiji* (ImageJ, Bethesda, EE.UU.).

9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos cuantitativos se efectuó utilizando el programa *SPSS 17.0* para Windows (Chicago, IL, EE.UU.). Una vez reunidos los datos de varios experimentos, los tests de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks indicaron si los datos presentaban o no una distribución normal. En caso de normalidad, los resultados se compararon con el test de *t* de Student para dos muestras independientes o ANOVA de un factor, seguido de pruebas post-hoc. En el caso de valores no paramétricos se utilizaron las pruebas estadísticas de U-Mann-Whitney. Los porcentajes de supervivencia de los ratones fueron representados utilizando curvas de Kaplan-Meier y las diferencias significativas entre los grupos respecto al grupo control fueron testadas utilizando el test de Log-rank. Los resultados fueron considerados significativos cuando la probabilidad fue menor de 0,05 ($p < 0,05^*$) y muy significativos cuando fue menor de 0,01 ($p < 0,01^{**}$).

RESULTADOS

PARTE 1- Estudio *in vitro* de las alteraciones en la capacidad de adhesión y migración de células de NSCLC humano tratadas con TGF β

1.1. Activación de la vía de señalización del TGF β en células de NSCLC

En primer lugar, analizamos mediante técnicas de Western Blot y de PCR semi-cuantitativa la expresión basal de TGF β 1, 2, 3 y del receptor tipo II (T β RII) en células de carcinoma de pulmón no microcítico. Como se puede observar en la Fig. R1A, los mRNA correspondientes a las isoformas TGF β 1 y TGF β 2, se expresan en todas las líneas celulares estudiadas, en cambio, el TGF β 3 no se expresa en las células A549 y presenta bajos niveles de expresión en las líneas celulares H1264 y H1299. En cuanto a la expresión de mRNA del receptor tipo II, se pudo detectar mediante western blot la expresión en las líneas celulares A549, H157 y H1299, en niveles decrecientes de expresión.

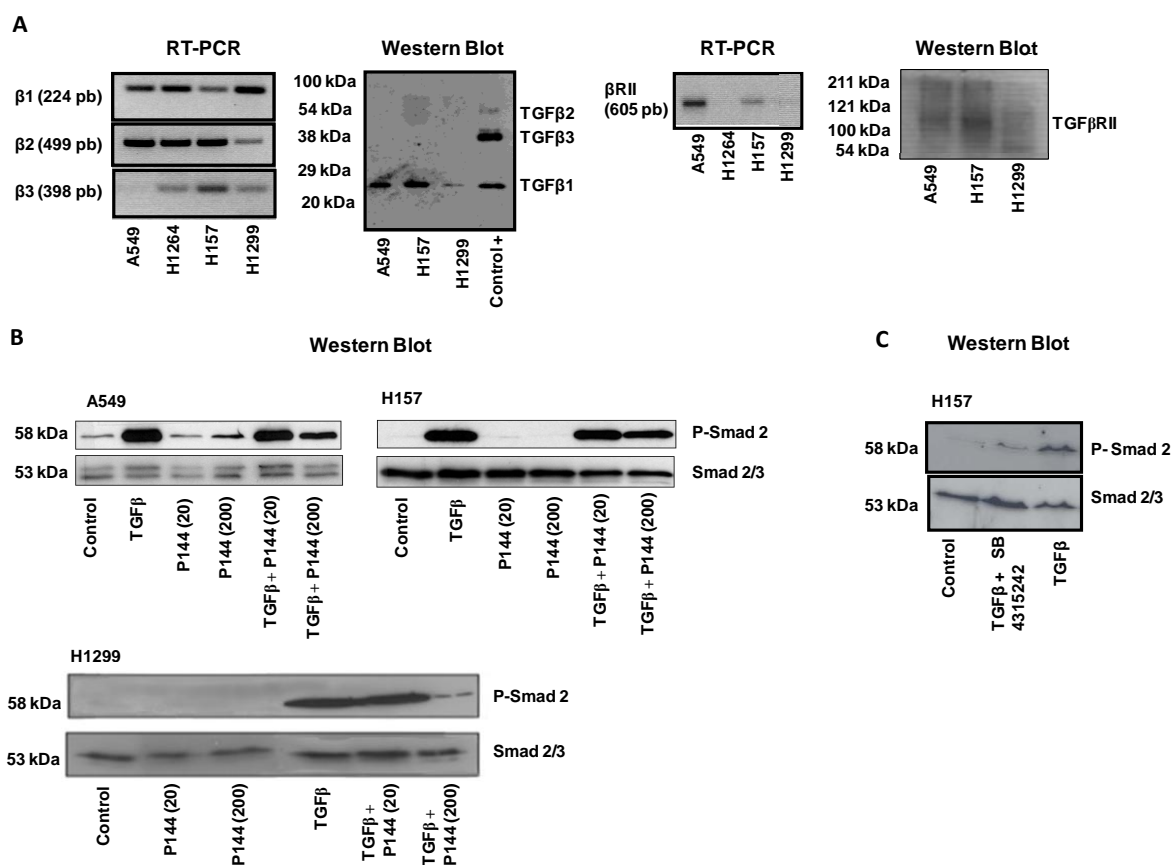


Figura R1: Caracterización de la respuesta a TGF β de células de NSCLC mediante RT-PCR y Western Blot. (A) Análisis de la expresión del mRNA que codifica para TGF β 1, β 2, β 3 y del receptor T β RII. (B) Inducción de la fosforilación de Smad 2/3 en las líneas celulares de NSCLC A549, H157 y H1299 tras la exposición a TGF β 1 durante 30 min, en presencia o ausencia de los péptidos inhibidores de TGF β 1 p17 y p144 a una concentración de 20 ó 200 ng/ml. (C) Inhibición de la fosforilación en células H157 con el inhibidor químico de T β RI, (SB 431542) a una concentración de 10 μ M.

Una vez determinada la expresión basal de las isoformas de TGF β y del receptor tipo II quisimos estudiar la activación de la vía de señalización clásica de esta citoquina tras el tratamiento con TGF β de células de carcinoma de pulmón (Fig. R1B). Después de incubar las células durante 30 min con la citoquina, estudiamos mediante Western Blot la fosforilación de la proteína Smad 2, lo cual indica la activación de la vía de señalización canónica del TGF β . Para confirmar la especificidad del tratamiento se utilizaron los péptidos inhibidores de TGF β p17 y p144 (Digna Biotech, Madrid, España)(Dotor *et al*, 2007).

1.2. Ensayos funcionales

1.2.1. Efecto del tratamiento con TGF β en la proliferación y resistencia a la apoptosis

Quisimos comprobar si el tratamiento con TGF β afectaba a la supervivencia y proliferación de las células de carcinoma pulmonar. Para ello, realizamos ensayos de incorporación del colorante vital rojo neutro y de detección de proteólisis de caspasa 7, en células H157 tratadas durante 48 h con concentraciones crecientes de TGF β . Como se observa en la figura R2, no observamos cambios significativos en ninguno de los parámetros analizados al compararlo con las células no tratadas, pero sí una leve tendencia a la resistencia a apoptosis, que no llegó a ser significativa.

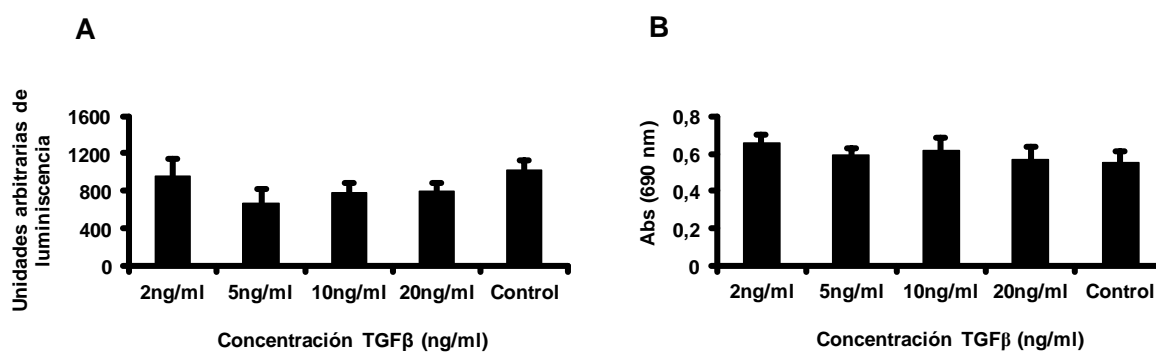


Figura R2: Análisis de la inducción de apoptosis y viabilidad de células H157 tratadas 48 h con distintas concentraciones de TGF β . (A) ensayo de detección de actividad caspasa 7 medido en unidades arbitrarias de luminiscencia y (B) ensayo de viabilidad mediante incorporación de rojo neutro. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba *t* de Student.

Para estudiar posibles cambios en la tasa de proliferación de células de NSCLC tratadas con TGF β , utilizamos el ensayo comercial MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol). Como se puede observar en la Fig. R3, el TGF β retrasó la proliferación de la línea de adenocarcinoma pulmonar A549 de forma muy significativa ($p < 0,001$). Sin embargo, en las células de carcinoma escamoso pulmonar H157 y en el carcinoma de células grandes H1299 no se observaron cambios.

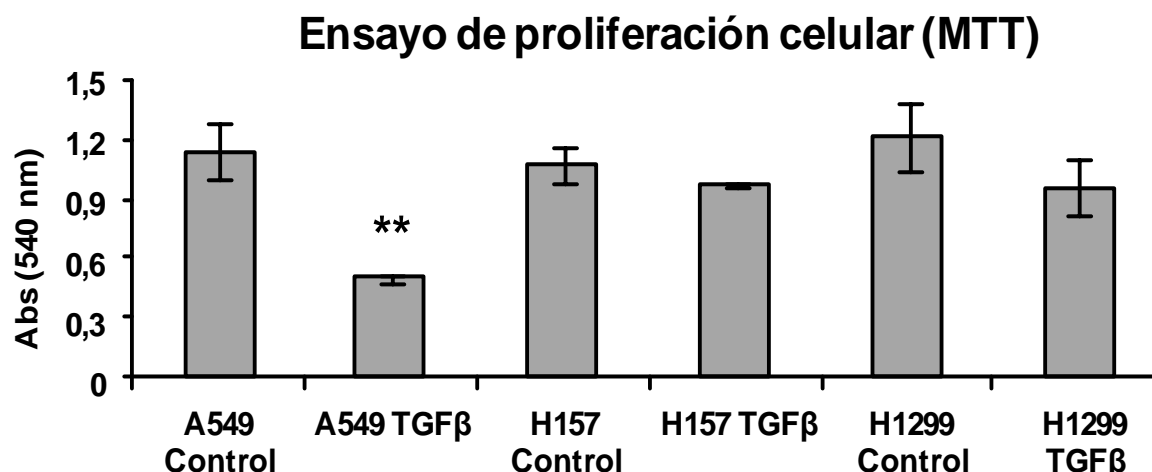


Figura R3: Análisis de los efectos del tratamiento con TGF β durante 48 h en la proliferación celular de las líneas de adenocarcinoma pulmonar A549, H157 y H1299. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba U de Mann-Whitney (** $p < 0,001$).

1.2.2. Cambios en el citoesqueleto de células de NSCLC tras el tratamiento con TGF β

Como se ha comentado en la introducción, el factor TGF β desencadena la TEM en células transformadas. Para observar si éste era el caso en nuestras células, observamos su morfología al microscopio óptico y realizamos tinciones para describir la disposición del citoesqueleto de actina. Al tratar las células de NSCLC con TGF β (2 ng/ml) durante 24 h, observamos que las células adoptan una morfología más alargada que las células control. La tinción de la proteína F-actina con faloidina-FITC reveló una mayor alineación y grosor de las fibras de actina de las células tratadas respecto al grupo control. Esto indica que el TGF β es capaz de inducir una reorganización del citoesqueleto. (Fig. R4).

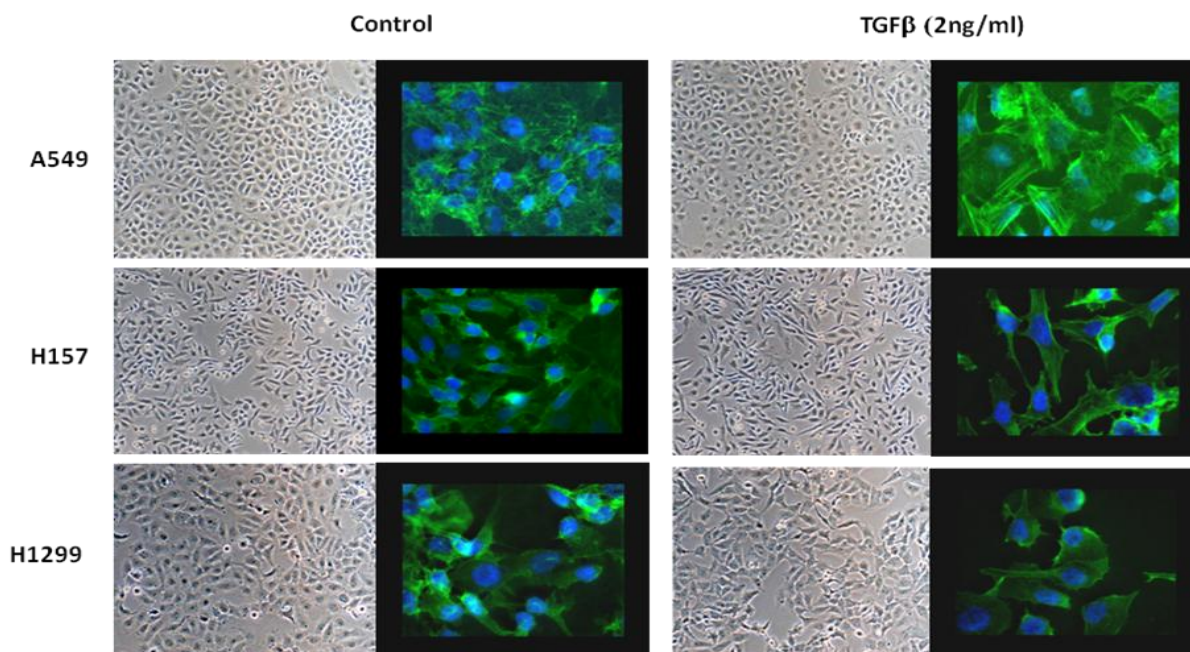


Figura R4: Fotografías de microscopía óptica (10x) y detección de F-actina (faloidina-FITC) (60x). En azul se muestran los núcleos teñidos con el marcador Hoechst.

1.2.3. Ensayos de resistencia a quimioterápicos mediada por TGFβ

Realizamos una serie de experimentos para estudiar si el TGFβ confiere resistencia frente a agentes quimioterápicos y los resultados se recogen en la figura R5. Para ello tratamos a las células con Paclitaxel (Taxol), Cisplatino, Etopósido y Gemcitabina a las concentraciones equivalentes a la IC50 correspondiente para cada línea celular. Taxol: 0,1 μM en la línea A549 y 1 μM en H157 y H1299 respectivamente; cisplatino: 15 μM en las células A549, 50 μM en H157 y 40 μM en H1299; Etopósido: 5 μM en las células A549, 40 μM en H157 y 10 μM en H1299; y finalmente, para la Gemcitabina, se utilizó la misma concentración (12,5 μM) en las tres líneas celulares. No se pudo observar un efecto de TGFβ en la respuesta a quimioterapia.

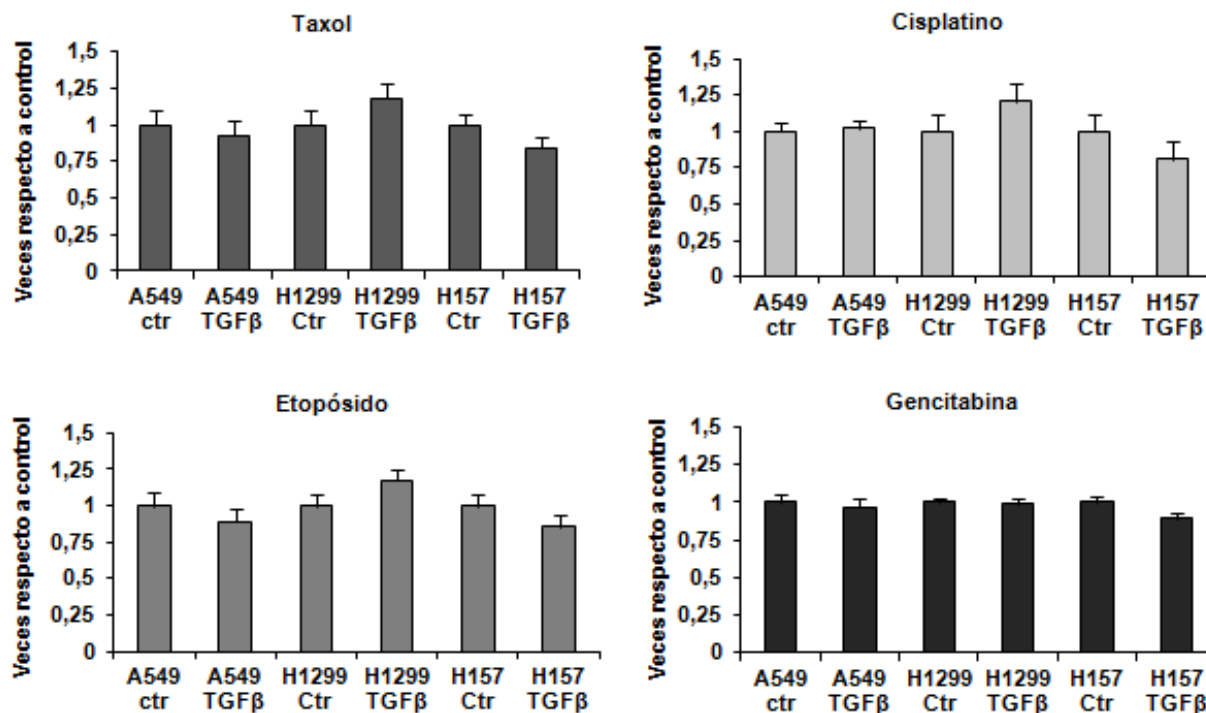


Figura R5: Ensayos de viabilidad mediante rojo neutro en células tratadas con TGFβ durante 24 h y expuestas durante 24 h adicionales a Paclitaxel (Taxol), Cisplatino, Etoposido, y Gemcitabina. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba *t* de Student.

1.2.4. Efectos del TGFβ en la adhesión de células de carcinoma de pulmón a distintas matrices

Con objeto de estudiar si el tratamiento con TGFβ modifica la adhesión de las células de NSCLC a proteínas de la matriz extracelular (MEC), realizamos ensayos de adhesión a placas de cultivo recubiertas con proteínas de matriz extracelular: colágeno I (50 μg/ml), colágeno IV (50 μg/ml), fibronectina (10 μg/ml) y vitronectina (1 μg/ml). Como se puede observar, las tres líneas celulares analizadas incrementaron la adhesión a vitronectina, ligando de integrina β3, tras el tratamiento con TGFβ (Fig. R6). Los aumentos en la adhesión fueron discretos para el resto de las proteínas analizadas.

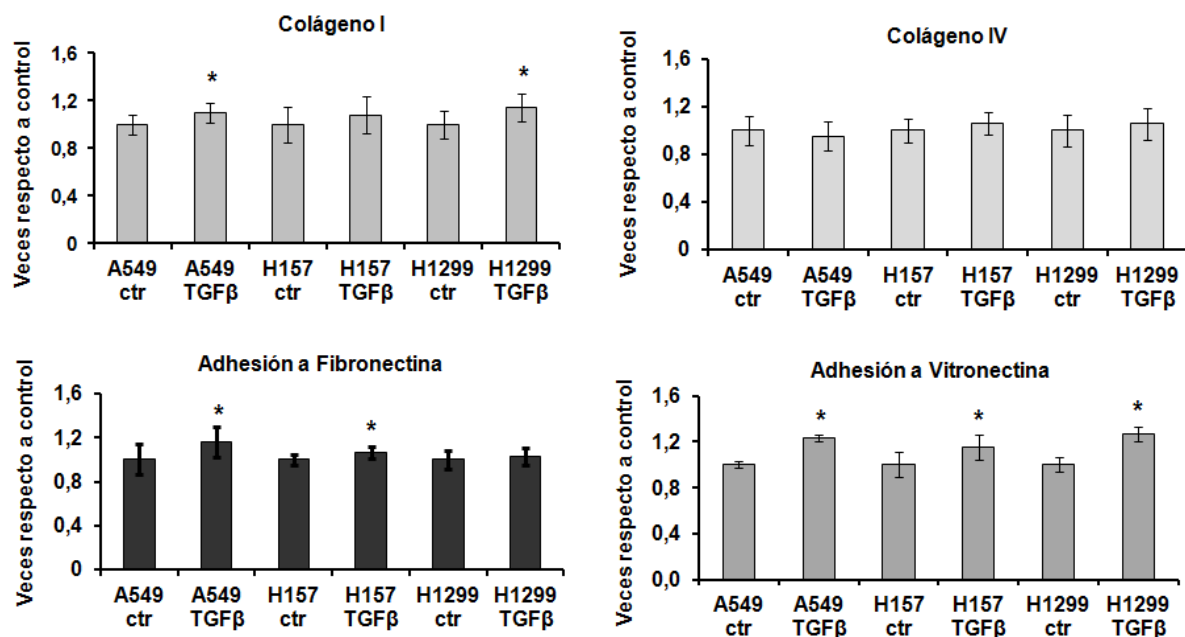


Figura R6: Efecto del TGFβ en la adhesión a proteínas de la matriz extracelular. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba U de Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

1.2.5. Influencia del TGFβ en la migración de células NSCLC

Para estudiar si el tratamiento con TGFβ además de alterar la adhesión podría alterar la capacidad migratoria de células de NSCLC, realizamos ensayos de migración hacia suero en cámaras Boyden recubiertas de vitronectina (1 $\mu\text{g/ml}$) o fibronectina (10 $\mu\text{g/ml}$). Como se puede observar en la figura R7, hubo un aumento muy significativo en la migración de las tres líneas celulares de carcinoma de pulmón testadas: A549, H157, H1299 tras haber sido tratadas con TGFβ durante 24 h y a una concentración de 2 ng/ml.

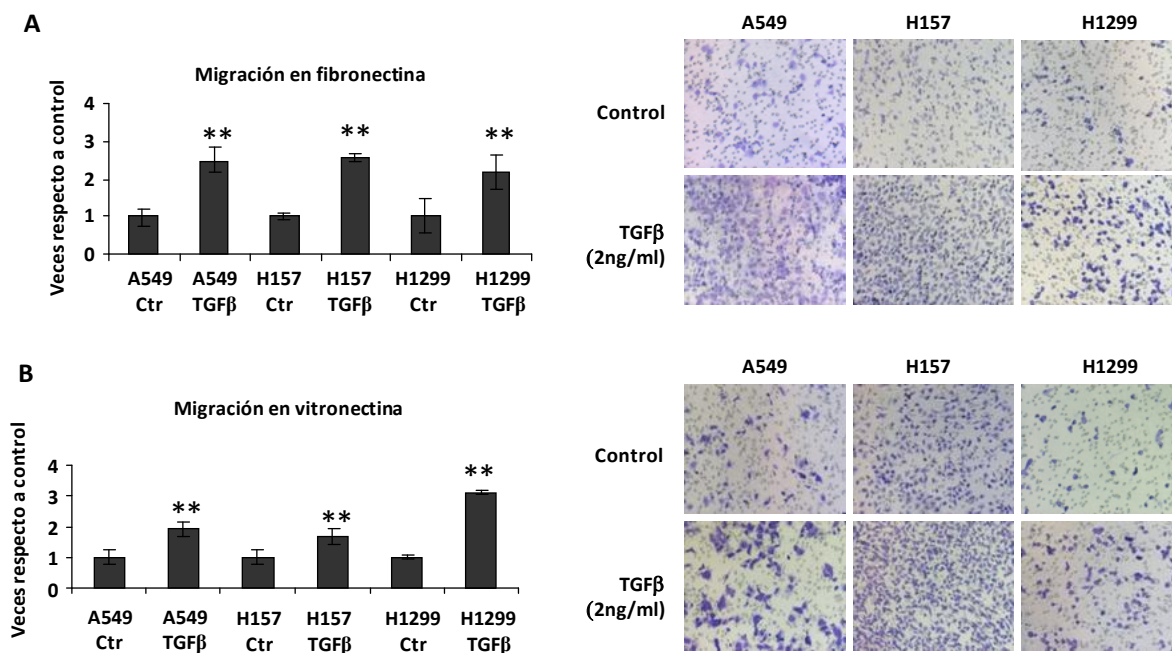


Figura R7: Migración de NSCLC a través de membranas recubiertas con las proteínas de la matriz extracelular fibronectina (A) y vitronectina (B). La cuantificación de las células migratorias se realizó tras la tinción de las membranas con una solución de cristal violeta 0,5%. En las gráficas se representa el aumento de la migración de las células tratadas respecto a las no tratadas. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba U de Mann-Whitney (** $p < 0,01$).

1.2.6. Actividad metaloproteasa inducida por TGFβ

Con objeto de evaluar si, como ocurre en otros tejidos, el tratamiento con TGFβ aumenta la secreción de MMPs y por lo tanto la capacidad de degradar proteínas de la matriz extracelular, se realizaron zimografías en geles de gelatina cargadas con sobrenadantes de medios de cultivo de células de carcinoma pulmonar que habían sido tratadas o no con TGFβ durante 24 h, en presencia o no del inhibidor de la vía de TGFβ SB431542. Como se muestra en la figura R8A, se observaron bandas de degradación de gelatina en zonas correspondientes al tamaño de la MMP2 (72kD) para las células H157 y MMP9 (92kD) en el caso de las células A549 y H1299, siendo más intensas en aquellas muestras procedentes de células tratadas con TGFβ.

Por otro lado, para confirmar la actividad gelatinasa de células H157 se utilizó una gelatina marcada con FITC que emite fluorescencia a medida que se degrada. Tal y como sucedió en la zimografía en gel, observamos una mayor actividad gelatinasa en los medios obtenidos de células tratadas con TGFβ (Figura R8B).

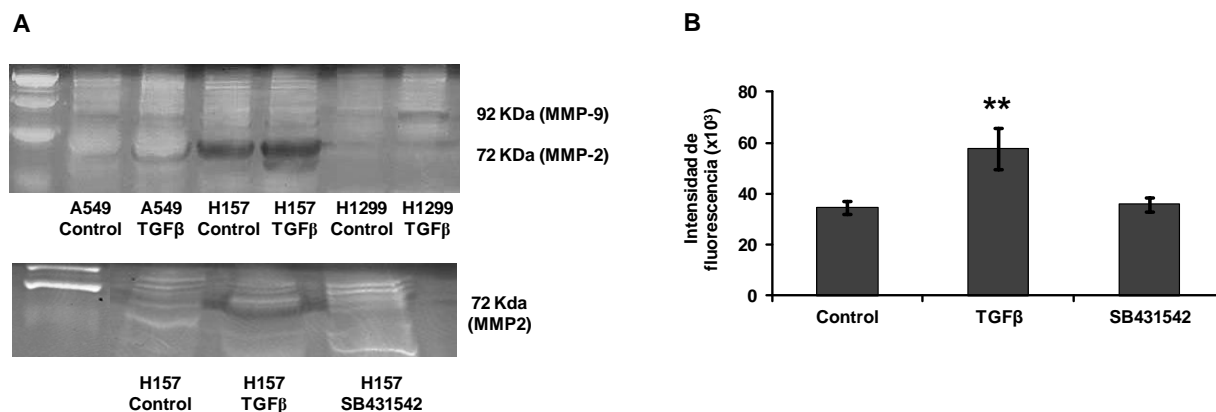


Figura R8: (A) Zimografía en gel de gelatina de la actividad proteolítica de sobrenadantes de células tratadas o no con TGFβ. (B) Cuantificación de la fluorescencia derivada de la degradación de gelatina fluorescente. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba *t* de Student (** $p=0,001$).

1.2.7. Ensayo de formación de colonias independiente de anclaje

Una característica de las células tumorales es su capacidad de sobrevivir y multiplicarse independientemente de su adhesión al sustrato. Este aspecto favorece que las células tumorales se desprendan del tumor y colonicen otras partes del organismo. Realizamos ensayos para determinar si las células de carcinoma pulmonar expuestas a TGFβ incrementaban la capacidad de crecer sobre agar. Como se puede observar en la figura R9, el tratamiento con TGFβ aumentaba de manera muy significativa y específica la capacidad de crecer en ausencia de anclaje, ya que se bloqueaba si los experimentos se realizaban en presencia del inhibidor de TGFβ.

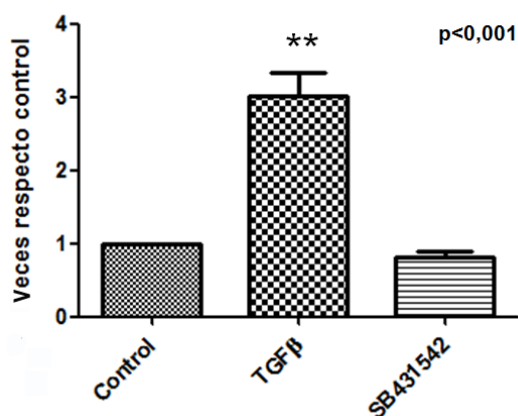


Figura R9: Comparación entre el número de colonias formadas independiente de sustrato de células H157 sin tratar y tratadas con TGFβ en ausencia o presencia del inhibidor SB 431542. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba *t* de Student (** $p<0,001$).

1.3. Estudio de los cambios en la expresión de integrinas y en la adhesión a monocapas de endotelio linfático tras el tratamiento con TGF β

1.3.1. Análisis de la expresión de diferentes integrinas en la superficie de las células de NSCLC tratadas con TGF β

En primer lugar decidimos analizar, mediante citometría de flujo la expresión de receptores de proteínas de la matriz de la familia de las integrinas, en la superficie de células de carcinoma pulmonar, expuestas o no a TGF β durante 24 h a una concentración de 2 ng/ml. En total se analizaron la expresión de 9 integrinas: $\alpha 1$, $\alpha 4$, αv , $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$. En la figura R10 se presentan los histogramas de expresión de aquellas integrinas que sufrieron modificaciones en sus niveles de expresión, tras el tratamiento con TGF β .

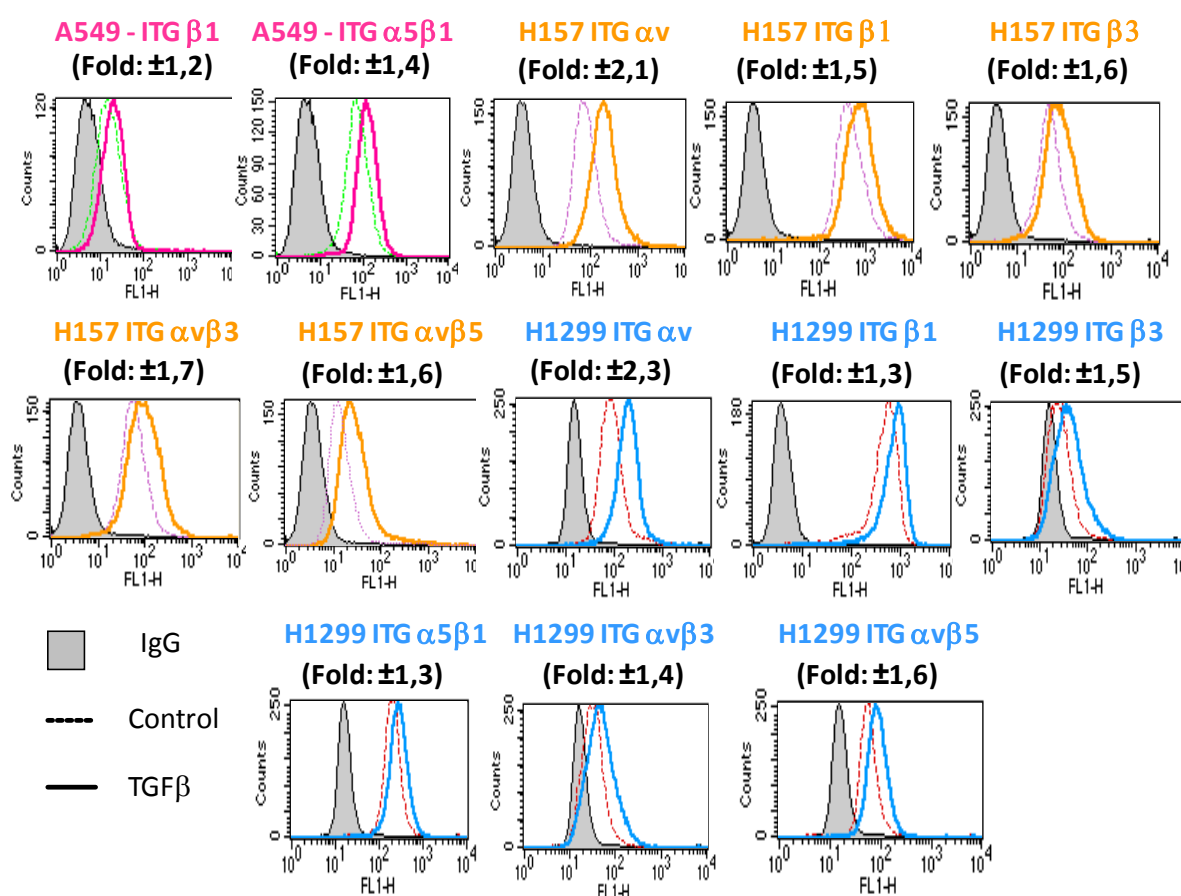


Figura R10: Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de integrinas en la superficie celular de NSCLC tratadas durante 24 h con TGF β a una concentración de 2 ng/ml.

Como se puede observar en la tabla R1, las células H157 experimentaron incrementos significativos, de más de 1,5 veces sobre las células control, en la expresión de las integrinas α_v , β_1 , β_3 , $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, que median la unión tanto a fibronectina como a vitronectina tras el tratamiento con TGF β . Estas mismas integrinas también incrementaron sus niveles de expresión tras el tratamiento de células de carcinoma de células grandes de pulmón H1299 con TGF β .

Tabla R1: Porcentaje de expresión de integrinas en células tratadas con 2 ng/ml de TGF β durante 24 h respecto a células control. Los datos representan la media de tres experimentos realizados de modo independiente.

	α_v (%)	β_1 (%)	β_3 (%)	$\alpha_5\beta_1$ (%)	$\alpha_v\beta_3$ (%)	$\alpha_v\beta_5$ (%)
A549	-	15	-	61	-	-
H157	80	48	57	-	44	89
H1299	72	68	175	60	60	102

Una vez comprobado que el tratamiento con TGF β provoca cambios en la adhesión de células de NSCLC, decidimos continuar nuestros estudios utilizando como modelo la línea de carcinoma escamoso de pulmón H157. Elegimos esta línea porque expresaba la citoquina TGF β_1 y también su receptor, respondía muy bien a los péptidos inhibidores desarrollados en nuestra institución y expresaba incrementos notables en la expresión de la integrina β_3 tras el tratamiento con TGF β .

1.3.2. Activación de vías de señalización inducidas por integrinas implicadas en adhesión y migración

Una de las vías de señalización inducidas por las integrinas es la fosforilación de la quinasa de adhesiones focales (FAK). Esta vía se activa frecuentemente con objeto de inducir modificaciones en el citoesqueleto como respuesta a la desestructuración de las adhesiones focales. En nuestro caso quisimos detectar si tras el tratamiento con TGF β se producía dicha fosforilación. Como se observa en la figura R11A, pudimos detectar un incremento de la forma fosforilada de FAK en extractos citoplasmáticos obtenidos a partir de células H157 tratadas con TGF β , que no se observaba en presencia del inhibidor específico de FAK, PF-573228.

En la cascada de señalización de FAK, también se ha descrito la formación de un complejo de esta proteína con Src, otra tirosina quinasa citoplasmática. Este complejo FAK/Src activa otras enzimas como MAPK, PI3K, Grb2 y p130^{cas} que son responsables de transmitir la señal de activación a través de distintas vías de señalización que regulan la proliferación celular, protección frente a la apoptosis, adhesión, migración e invasión. Las células H157 tratadas con TGF β presentaron una concentración más elevada tanto de la proteína Src fosforilada como Src total (Fig. R11B).

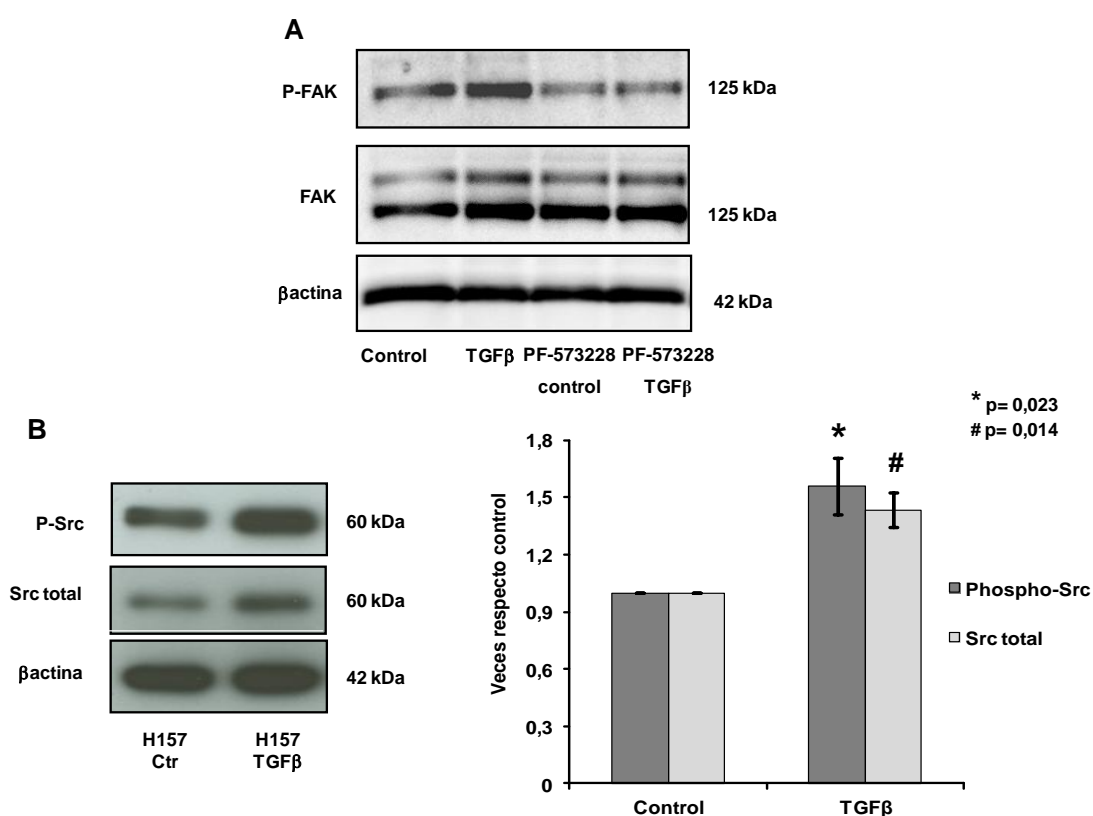


Figura R11: Vías de señalización inducidas por integrinas. (A) Detección mediante Western Blot de la expresión de la proteína quinasa FAK y su forma fosforilada (P-FAK) en células H157 tras el tratamiento con TGF β . La presencia del inhibidor de P-FAK PF-573228 impide su formación. (B) Detección mediante Western blot y densitometría de las bandas de expresión de la proteína Src y su forma fosforilada (P-Src) en células tratadas con TGF β . Para el análisis estadístico se utilizó la prueba *t* de Student (* p=0,023 y # p=0,014)

1.3.3. Efecto del TGF β en la adhesión y trans migración de células H157 a través del endotelio linfático

Los vasos linfáticos constituyen una ruta de salida de las células tumorales hacia los ganglios linfáticos. Estos vasos producen citoquinas quimiotácticas que pueden atraer hacia sí tanto a las células tumorales como a células del sistema inmune. Como habíamos observado

que el tratamiento con TGF β inducía cambios en la migración y en la adhesión de las células de NSCLC y en la expresión de integrinas, decidimos estudiar si también se veía modificada su capacidad de adhesión y migración a través de monocapas de células primarias de endotelio linfático humano (LEC). Realizamos experimentos utilizando células H157 que habían sido pretratadas o no con TGF β . Observamos un incremento notable en la adhesión de las células tumorales a estas monocapas cuando las células habían sido tratadas con TGF β . Los niveles de adhesión revertían a los niveles basales si las células se incubaban con el agente inhibidor de TGF β SB431542 o con el inhibidor de la fosforilación de la proteína FAK PF 573228 (Fig. R12A). A continuación, repetimos el experimento, pero esta vez sembrando las monocapas de LEC sobre membranas tipo Boyden para permitir la transmigración de las células tumorales hacia suero. Como se muestra en la figura R12B, las células tratadas con TGF β incrementaron notablemente su capacidad migratoria a través de monocapas de endotelio linfático pulmonar.

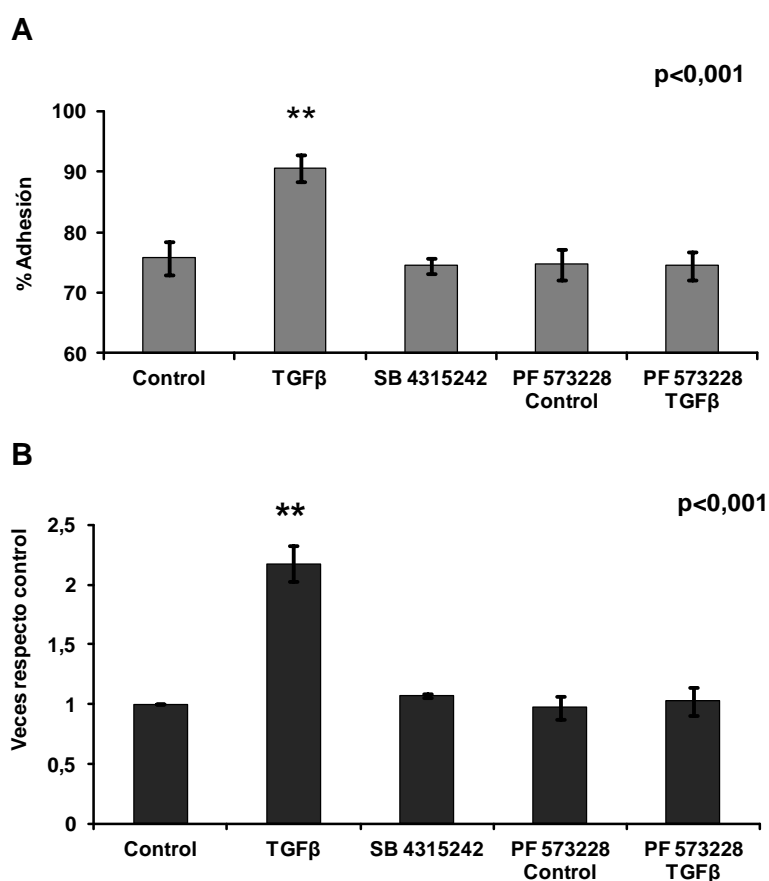


Figura R12: Análisis de la adhesión (A) y de la migración (B) de las células H157 tratadas o no con TGF β a través de monocapas de células primarias de endotelio linfático pulmonar. Los experimentos se realizaron en presencia/ausencia de inhibidores de TGF β y de FAK. Los datos representan la media de tres experimentos. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba *t* de Student (** p < 0,001).

1.4. Expresión de receptores de quimiocinas y quimiotaxis de células tumorales H157 hacia células de endotelio linfático

Las células tumorales pueden utilizar los mismos mecanismos moleculares que los leucocitos para unirse y atravesar las paredes endoteliales. En este proceso, además de las integrinas, los receptores de quimiocinas como por ejemplo CXCR4, CCR7 y CCR5 desarrollan una función importante. Así, en primer lugar determinamos si el tratamiento de las células H157 con TGF β provoca una mayor migración tanto hacia suero como hacia las citoquinas quimiotácticas CXCL12, CCL21 y MIP1 α ligandos de los receptores anteriormente citados (Fig.13A).

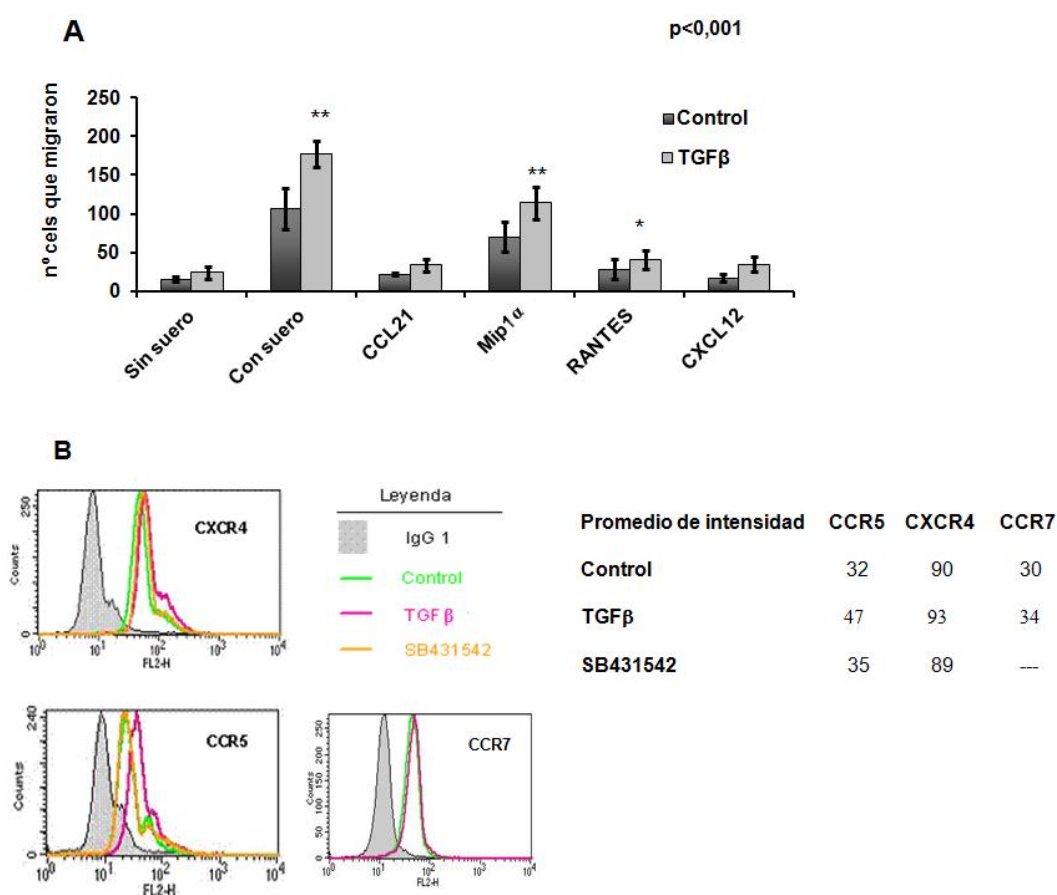


Figura R13: (A) Ensayos de quimiotaxis de células H157 a través de monocapas de LECS hacia las quimiocinas CCL21, Mip1 α , Rantes y CXCL12. (B) Expresión de los receptores de las citoquinas analizada mediante citometría de flujo. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba U-Mann-Whitney (** p<0,001).

Como basalmente las células de endotelio linfático producen factores quimioatrayentes, se analizó mediante ELISA, si el tratamiento con TGF β aumentaba la

expresión de MIP1 α en sobrenadantes celulares. No detectamos ningún cambio en su expresión (no se muestran los datos).

Por otro lado, determinamos si el tratamiento con TGF β incrementaba la expresión de los receptores de citoquinas en las células tumorales mediante citometría de flujo. Se observó un incremento discreto en los niveles de expresión del receptor CXCR4 y más notable de CCR5 (Fig.13B) en las células tratadas con TGF β . De nuevo, estos efectos eran específicos del tratamiento con TGF β porque tanto la migración hacia gradientes de MIP1 α como la expresión de su receptor, CCR5, se redujo a niveles basales al pre-incubar las células con el inhibidor químico de TGF β , SB431542.

1.5. Estudio transcriptómico restringido a la expresión de moléculas de adhesión y de proteínas de la matriz extracelular por células H157 tratadas con TGF β

Los resultados precedentes muestran mediante análisis funcionales cómo la exposición a TGF β provoca un cambio fenotípico en células de carcinoma pulmonar hacia fenotipos más pro-metastásicos. Con objeto de completar la caracterización molecular de esta respuesta al tratamiento con TGF β , se hibridó el array de expresión “SABiosciences RT² Profiler™ PCR Array”. Este array detecta específicamente la expresión de 94 genes entre los que se encuentran moléculas de adhesión como por ejemplo, integrinas; proteasas como MMPs y TIMPs; y componentes de la matriz extracelular como colágenos, laminina y fibronectina. Utilizamos para hibridar este array muestras de mRNA obtenidas a partir de células de carcinoma escamoso pulmonar humano tratadas o no con TGF β a dosis 2 ng/ml durante 24 h, y en presencia o no del inhibidor químico del receptor tipo I de TGF β , SB 431542. En las células H157 tratadas con TGF β se observaron grandes cambios en la expresión de varios genes que codifican para proteínas de la matriz extracelular como los colágenos tipo I, VII y XIV, la fibronectina y laminina. También observamos aumento en la producción de MMPs, ADAMTS, TIMP y del CTGF entre otros. Además, pudimos confirmar en este sistema los incrementos observados mediante citometría en la expresión de varias integrinas como la integrinas α 2, α v, β 1, β 3 (Fig. R14).

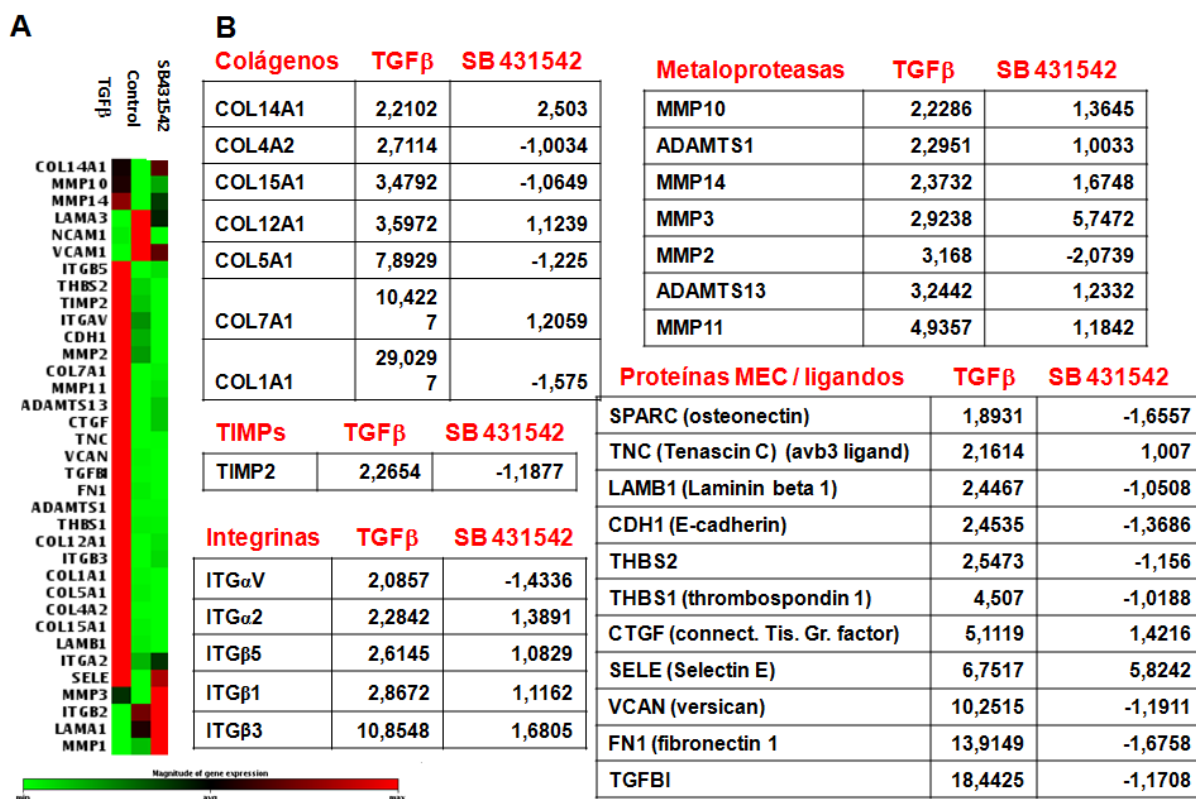


Figura R14: Variaciones en la expresión de genes relacionados con la adhesión y la matriz extracelular en NSCLC H157 tratadas o no con TGFβ y con inhibidor de TβRI (SB 431542). Datos obtenidos a partir del uso del “PCR Array-SABiosciences RT² Profiler™”. (A) Diagrama de expresión por color; verde: mínima expresión; negro: expresión intermedia; y rojo: máxima expresión. (B) Genes sobreexpresados tras el tratamiento con TGFβ.

Para validar los resultados obtenidos, se seleccionaron un total de 18 genes, que presentaban cambios de al menos dos veces en la expresión de células tratadas con TGFβ respecto a las células control, y se determinaron las variaciones en la expresión de su mRNA mediante PCR de tiempo real en otros tres experimentos realizados de modo independiente y utilizando cebadores comerciales. Los genes validados fueron: ADAMTS1, CTGF, FN1, ITGβ3, ITGβ5, LAMB1, MMP2, MMP3, MMP10, MMP11, MMP14, SPARC, TGFBI, THBS1, THBS2, TIMP2, TNC y VCAN (Fig. R15). Estos 18 genes validados codifican para proteínas de la matriz extracelular, como colágenos y fibronectina, moléculas de adhesión como tenascina C, CTGF, E-selectina, que alteran las uniones célula-matriz y célula-célula. Por otra parte se confirmó la inducción de la expresión de algunas metaloproteasas.

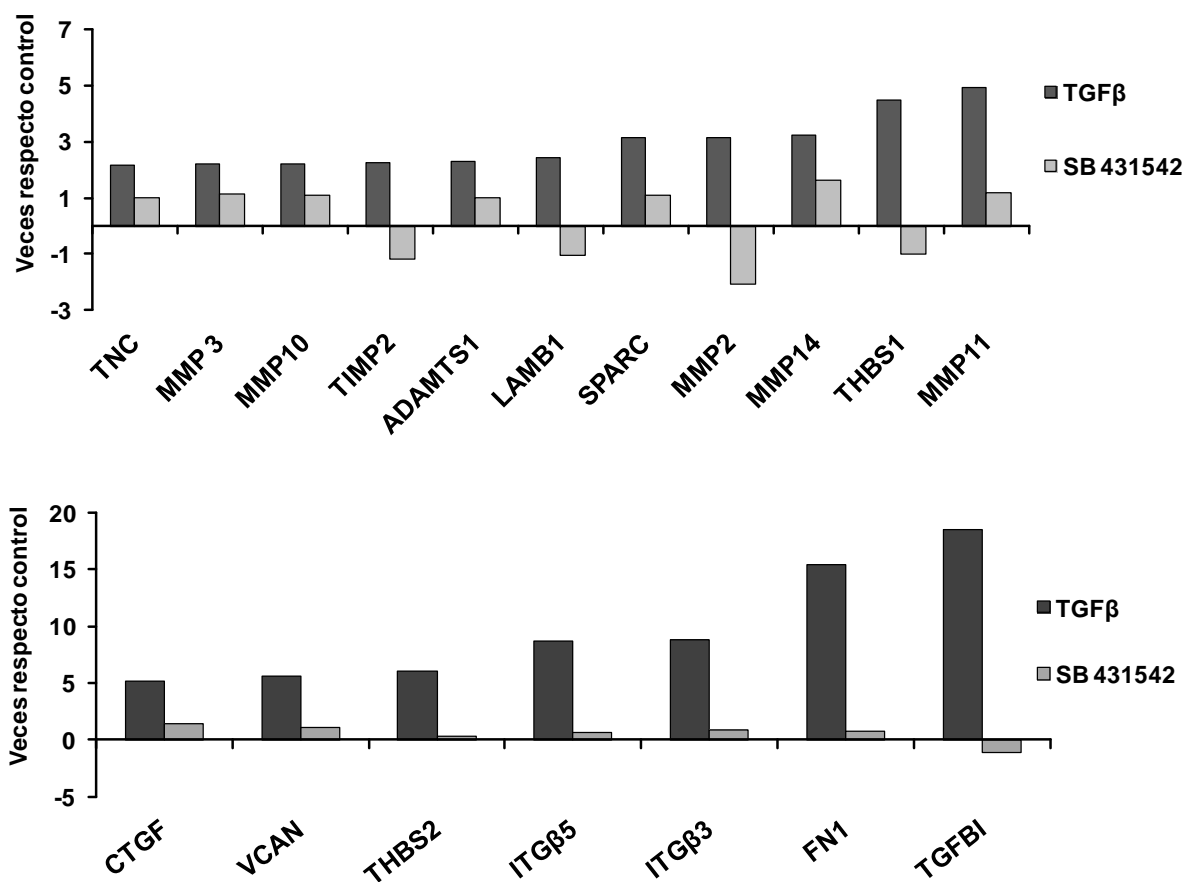


Figura R15: Validación por PCR a tiempo real de las variaciones en la expresión de genes relacionados con la adhesión, tras el tratamiento de las células H157 con TGFβ.

PARTE 2- Intervención de la integrina β3 en las alteraciones en la motilidad y adhesividad de células de NSCLC tratadas con TGFβ

2.1. Uso de anticuerpos bloqueantes frente a integrina en experimentos de trans migración de células H157

Realizamos ensayos de bloqueo de la trans migración utilizando anticuerpos monoclonales específicos frente a las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ en células tratadas o no con TGFβ. Observamos, en tres experimentos independientes, una reducción en el número de células tratadas con TGFβ que atraviesan la monocapa de endotelio linfático si los experimentos se realizan en presencia de dichos anticuerpos. (Fig. R16).

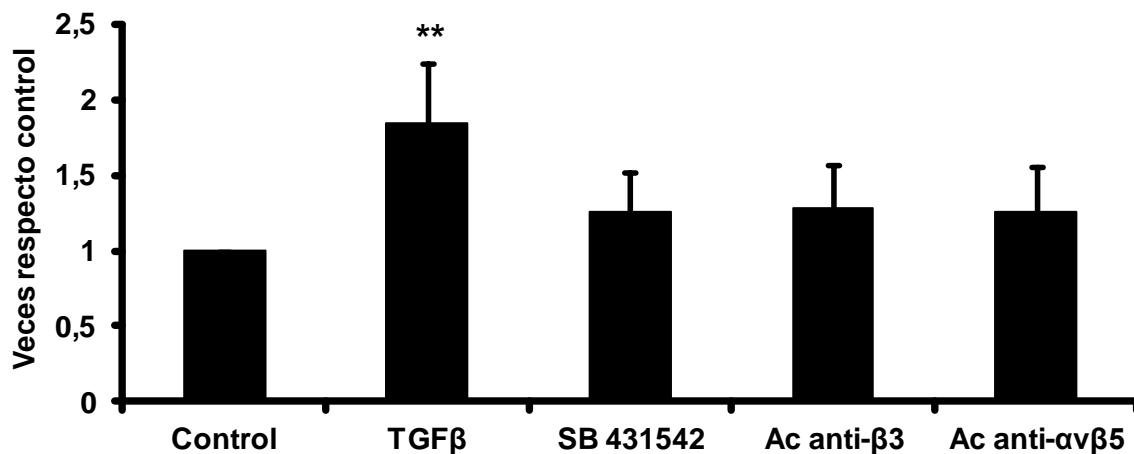


Figura R16: Las células expuestas a TGFβ revierten su migración a los niveles encontrados en las células no tratadas, si los experimentos se realizan en presencia de un inhibidor de la señalización a partir del receptor tipo I de TGFβ, SB 431542, o en presencia de anticuerpos bloqueantes frente a las integrinas β3 y αβ5. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba Kruskal-Wallis (**p=0,001).

2.2. Silenciamiento en células H157 de la expresión de la integrina β3

Detectamos mediante inmunofluorescencia la expresión basal e inducida por TGFβ de esta integrina en las células de carcinoma escamoso de pulmón (Fig. R17A) y observamos que la expresión de αβ3, aumenta en función del tiempo de exposición a TGFβ, como refleja la figura R17B.

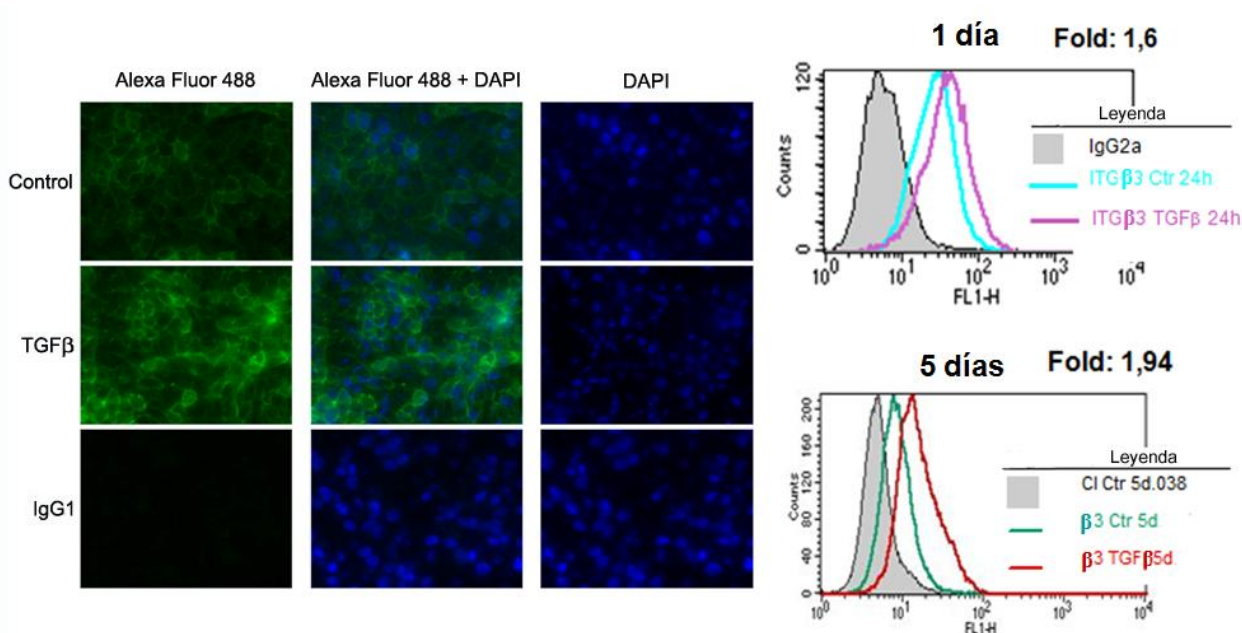


Figura R17: (A) Detección mediante inmunofluorescencia de la expresión de la integrina αβ3 en las células H157 tratadas o no con TGFβ 2 ng/ml durante 24 h. (B) Determinación mediante citometría de flujo de la expresión de la integrina αβ3 tras tratamientos de uno y cinco días con TGFβ (2 ng/ml).

Nuestro siguiente paso fue analizar el comportamiento de estas células tras silenciar la expresión de esta integrina. Para ello, establecimos clones de células H157-GFP transfectadas de modo estable con plásmidos que expresan varios shRNA específicos para la integrina $\beta 3$, como queda demostrado en la figura R18.

Además de comprobar las disminuciones en los niveles de esta proteína en la superficie celular, analizamos la expresión y fosforilación de la proteína FAK en las células deficientes de la integrina $\beta 3$, tratadas o no con TGF β : siempre los valores obtenidos fueron menores que los de las células en las que se expresaba la integrina con normalidad (Fig. R18B). Esto indica, que aunque diversas integrinas señalicen a través de la vía de FAK en células H157, la integrina $\beta 3$ desarrolla una función importante en la activación de esta vía de señalización tras el tratamiento con TGF β .

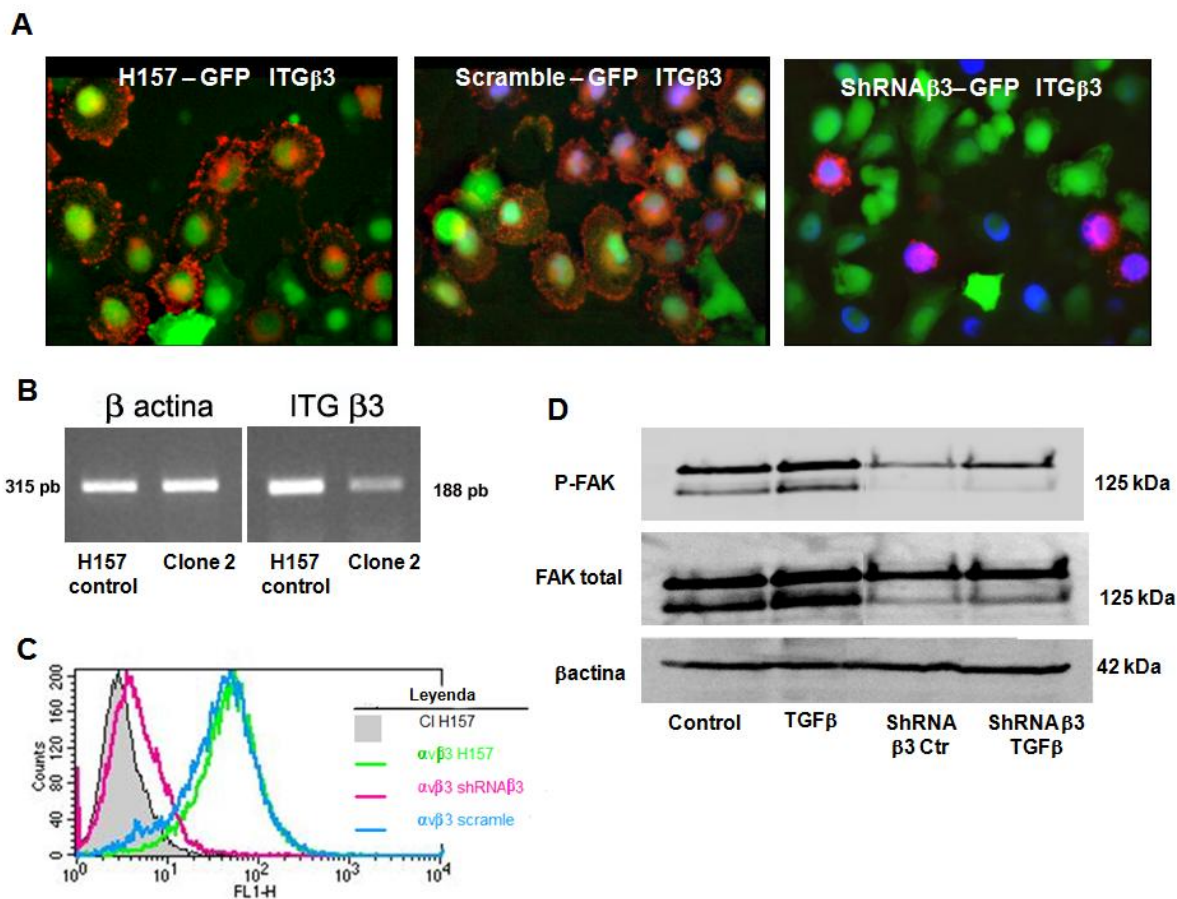


Figura R18: Silenciamiento en células H157 de la expresión de la integrina $\beta 3$ mediante transfección estable con un shRNA específico. (A) Determinación de la expresión de la integrina $\beta 3$ mediante inmunofluorescencia (aumento 60x). (B) Expresión del mRNA de la integrina $\beta 3$. (C) Determinación mediante citometría de flujo de la expresión de la integrina $\beta 3$ en la superficie de las células tumorales. (D) Determinación mediante WB de los niveles de proteína FAK y FAK fosforilada. En todos los casos se analizaron células no transfectadas, células transfectadas con un plásmido que expresa un shRNA inespecífico (scramble) o específico frente a la integrina $\beta 3$.

2.3. Estudio dinámico de la migración y trans migración de células de NSCLC pretratadas con TGF β . Relevancia de la expresión de la integrina β 3

En primer lugar, realizamos un estudio en el que comparamos el tiempo de adhesión a monocapas de endotelio linfático de células H157 tratadas o no con TGF β y en las que se había silenciado la expresión de la integrina β 3. Como queda representado en la figura R19, el tratamiento con TGF β incrementó, en todos los períodos de tiempo analizados, el número de células adheridas a la monocapa de endotelio.

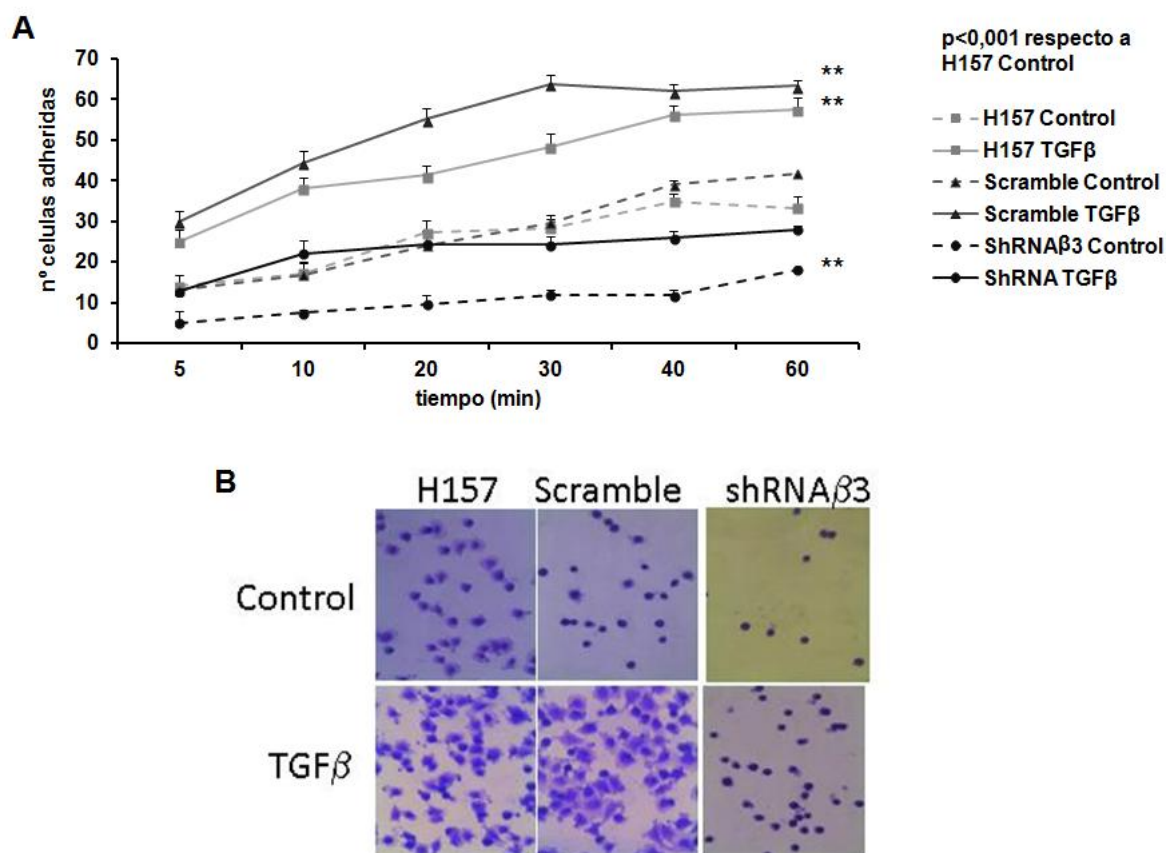


Figura R19: (A) Cinética de adhesión de las células de carcinoma escamoso de pulmón H157 a monocapas de endotelio linfático. Las células H157 control y transfectadas con los vectores de expresión shRNA β 3 y shRNA scramble, fueron tratadas o no con TGF β durante 24 h. Las células adheridas se fijaron y se contaron en un microscopio invertido. Los datos representan la media de tres experimentos. (B) Microfotografía de un experimento representativo (aumento 20x). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba Anova con comparaciones múltiples post-hoc de Dunnett (** $p < 0,001$).

Además, observamos que la adhesión disminuyó un 50% en aquellas células en las que se había silenciado la expresión de la integrina β 3, con respecto a células que habían sido transfectadas con el shRNA inespecífico e invertían aproximadamente seis veces más tiempo

en adherirse al endotelio. Como era de esperar, esta misma proporción se mantenía al tratar las células con TGF β .

A continuación, se analizó usando vídeo-microscopía confocal la dinámica de la adhesión de las distintas poblaciones celulares a las monocapas de endotelio linfático. Los vídeos obtenidos se adjuntan como material suplementario (DVD y Anexos pág. 166) y se resumen en la figura R20.

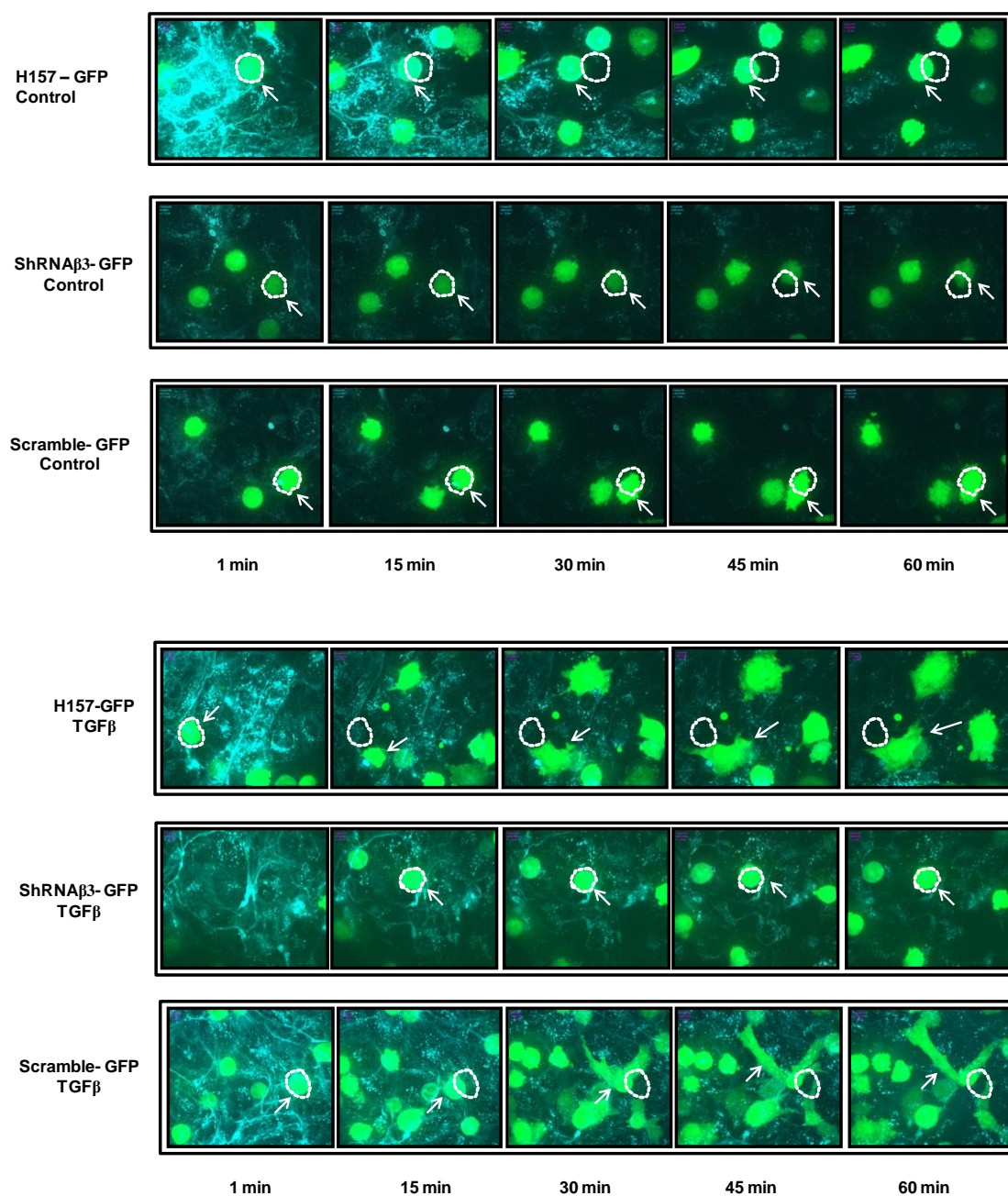


Figura R20: Secuencia temporal de microfotografías del proceso de adhesión de las células H157-GFP, ShRNA β 3-GFP, ShRNA scramble-GFP a monocapas de endotelio linfático (Aumento de 63x agua).

Sobre las imágenes obtenidas realizamos medidas de: tiempo transcurrido hasta que la célula tumoral entraba en contacto con el endotelio, porcentajes de células que se expandían totalmente sobre el endotelio y el tiempo invertido en ello. También cuantificamos el número de células que se desplazaron sobre el endotelio antes de adherirse a él mediante la emisión de pequeños pseudópodos o “blebs” y el tiempo que invierten en esta operación (Fig. R21).

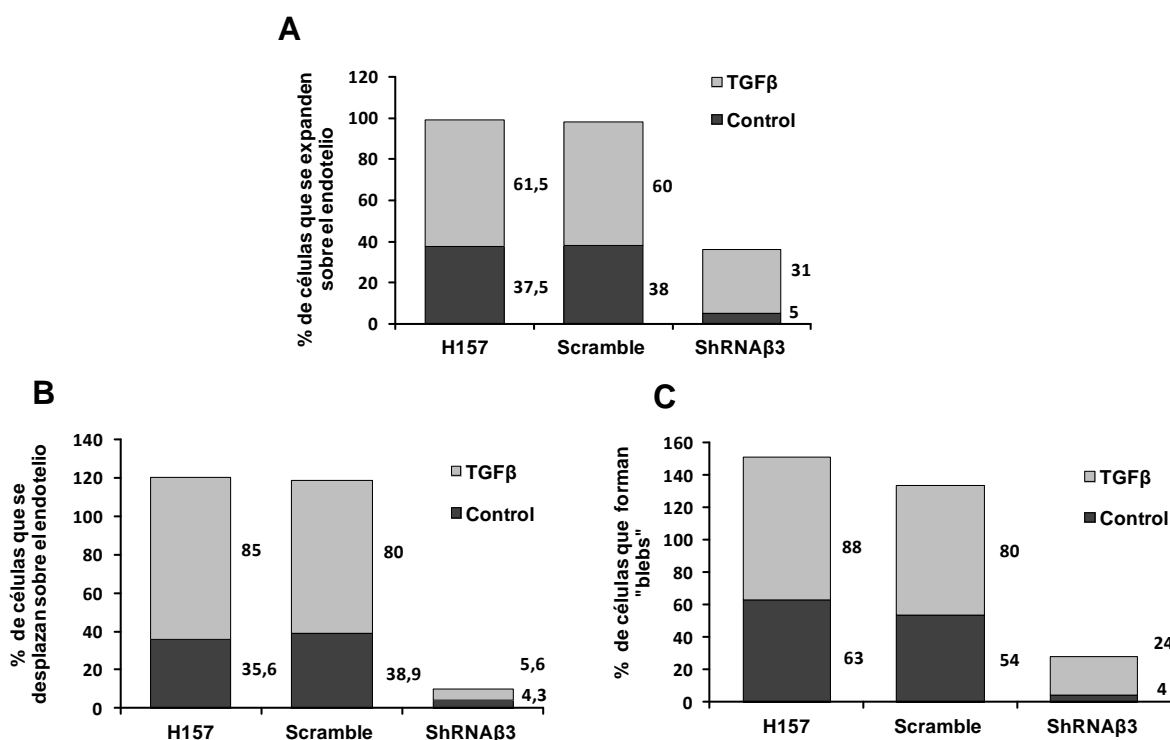


Figura R21: Comportamiento de las células tumorales al entrar en contacto con la monocapa de células endoteliales. Se observaron características como el porcentaje de células que se expanden totalmente sobre el endotelio (A), que se desplazan sobre el endotelio (B) y que forman “blebs” (C). Se analizaron un mínimo de 30 células por grupo.

El análisis de las células identifica diferencias en el modo de adhesión de las células tratadas con TGFβ respecto a las células control. Las células tratadas emitían un número mucho mayor de pseudópodos respecto a las células no tratadas (aproximadamente un 30% más) y además, el 80% de esas células se desplazaban al entrar en contacto con el endotelio, hasta extenderse sobre la monocapa endotelial y adherirse. En cambio, el 60% de las células control se mantenían cerca de la región del primer contacto con el endotelio. También se observó que las células tratadas con TGFβ formaban un 20% más de “blebs”, que las células sin tratar. Por lo tanto, estos resultados indican que el tratamiento con TGFβ contribuye a que

las células sean mucho más dinámicas, muy probablemente a causa de una mayor expresión de integrinas y a la alteración de su señalización hacia el citoesqueleto, como es el caso de la señalización mediada por integrina $\beta 3$. De hecho, al analizar la adhesión de las células en las que se había silenciado la integrina $\beta 3$ observamos que éstas prácticamente no se desplazaron sobre el endotelio (solamente el 5%) y mantuvieron una morfología redondeada. Estos datos revelan la importancia de las uniones mediadas por esta integrina tanto para el desplazamiento sobre el endotelio como para la adhesión sobre él.

Para completar este análisis, también se cuantificaron la velocidad y la distancia recorrida de un mínimo de 10 células de cada población celular (Fig. R22A y R22B). Se observó que las células en las que se había silenciado la integrina $\beta 3$ se desplazaban sin direccionalidad aparente sobre el endotelio antes de adherirse.

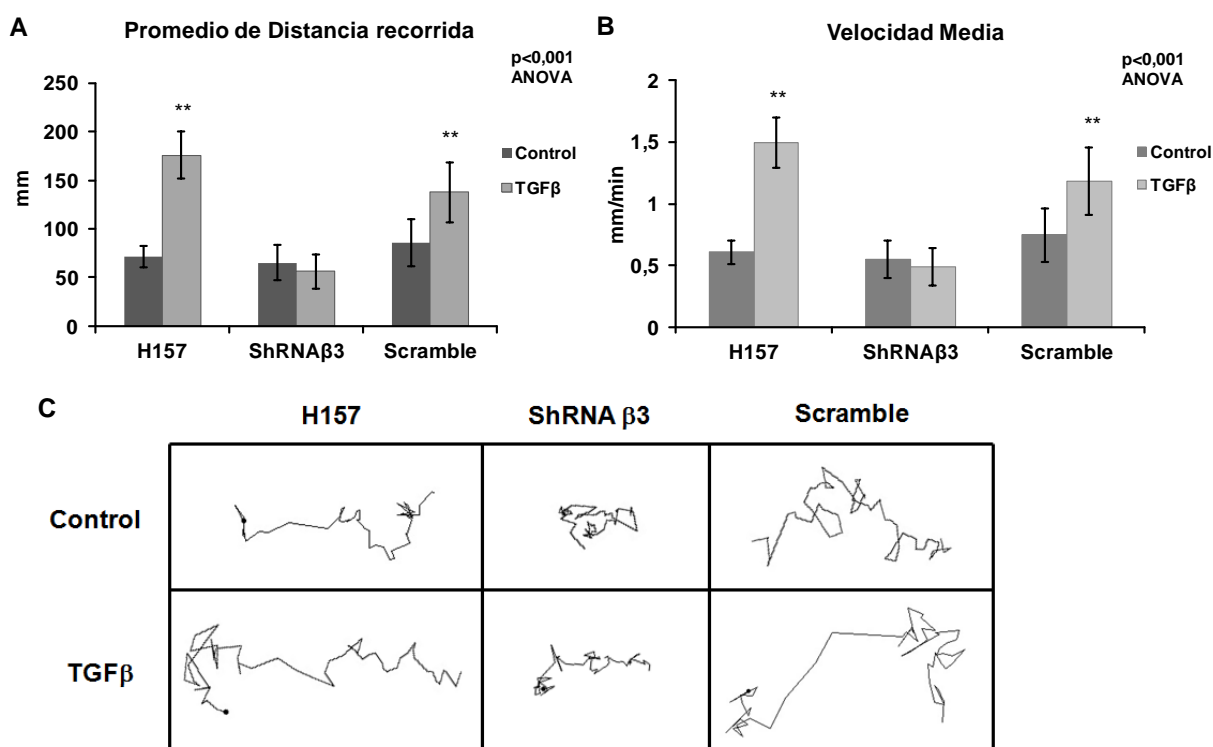


Figura R22: (A) Análisis de la distancia (mm) y (B) velocidad (mm/min) de las células H157-GFP, células shRNA $\beta 3$ -GFP y células scramble-GFP, tratadas o no con TGF β . (C) Representación gráfica de ejemplos de las trayectorias celulares observada en cada grupo. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba Anova con comparaciones múltiples post-hoc de Dunnett (** $p < 0,001$).

Entre las células sin tratar, la velocidad y la distancia recorrida resultaron semejantes en los tres grupos, aproximadamente 50 mm desde el punto de origen, considerado desde el centro de la célula. En cambio, la velocidad media y el promedio de la distancia recorrida de las células H157 TGF β y ShRNA scramble TGF β fueron aproximadamente el doble de la recorrida por las células H157 control y shRNA β 3-TGF β . La cuantificación se realizó utilizando el programa de imagen *Fiji* a partir de la secuencia de imágenes y en la figura R22C, se ejemplifica la superposición de los puntos que componen la trayectoria de una célula de cada grupo.

A continuación, realizamos ensayos de transmigración a través del endotelio linfático utilizando células H157 con la integrina β 3 silenciada con el shRNA β 3 (Fig. R23). Como se puede observar, la inhibición en la expresión de esta integrina disminuye la transmigración a través del endotelio tanto de las células no tratadas como tratadas con TGF β , siendo en estas últimas el efecto mucho más significativo. Por lo tanto, los resultados indican que los incrementos observados en transmigración de las células H157 a través de monocapas de LEC están mediados, al menos en parte, por la participación de la integrina β 3.

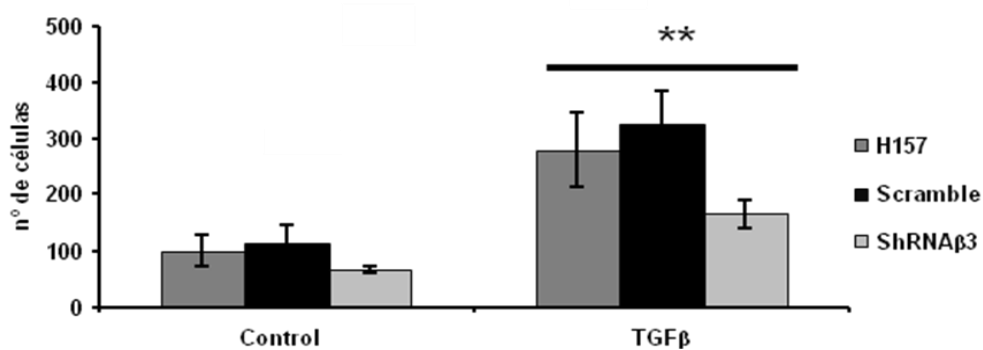


Figura R23: Determinación de la transmigración de células H157, células H157 transfectadas con el shRNA β 3 y células H157 transfectadas con el shRNA de secuencia aleatoria (scramble), tratadas y no tratadas con TGF β a través de monocapas de endotelio linfático. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba U-Mann-Whitney (** $p < 0,001$)

PARTE 3- Estudio morfológico de la unión de células tumorales al endotelio linfático

3.1. Estudio de la expresión de ligandos de integrina en células de endotelio linfático tratadas con TGF β

Con objeto de describir si existe un receptor específico de integrina en el endotelio linfático cuya expresión se viera modificada por TGF β , cuantificamos mediante citometría de flujo la expresión de los ligandos de integrinas VCAM (ligando de integrina $\alpha 4\beta 1$), ICAM (ligando de las integrinas $\alpha L\beta 2$, $\alpha M\beta 2$ y $\alpha X\beta 2$), y CD31 y L1CAM como ligandos de la integrina $\beta 3$, en la superficie de células de endotelio linfático tratadas con TGF β , TNF α (como control positivo) y sobrenadantes concentrados procedentes de cultivos de células H157 (Fig. R24) crecidas en presencia de TGF β durante cinco días. Solamente el tratamiento con TNF α produjo un aumento en la expresión de VCAM e ICAM. No se observó ninguna variación en los niveles de expresión de CD31 y L1CAM. El tratamiento con TGF β no alteró los niveles de expresión en superficie de ninguna de las moléculas de adhesión analizadas. Descartamos por tanto que el incremento en la trans migración observado en los ensayos *in vitro* se debiesen a un incremento en la expresión de los ligandos de integrinas en la superficie de las células endoteliales, promovida por factores procedentes de las células tumorales o del estroma (medio condicionado control o TGF β).

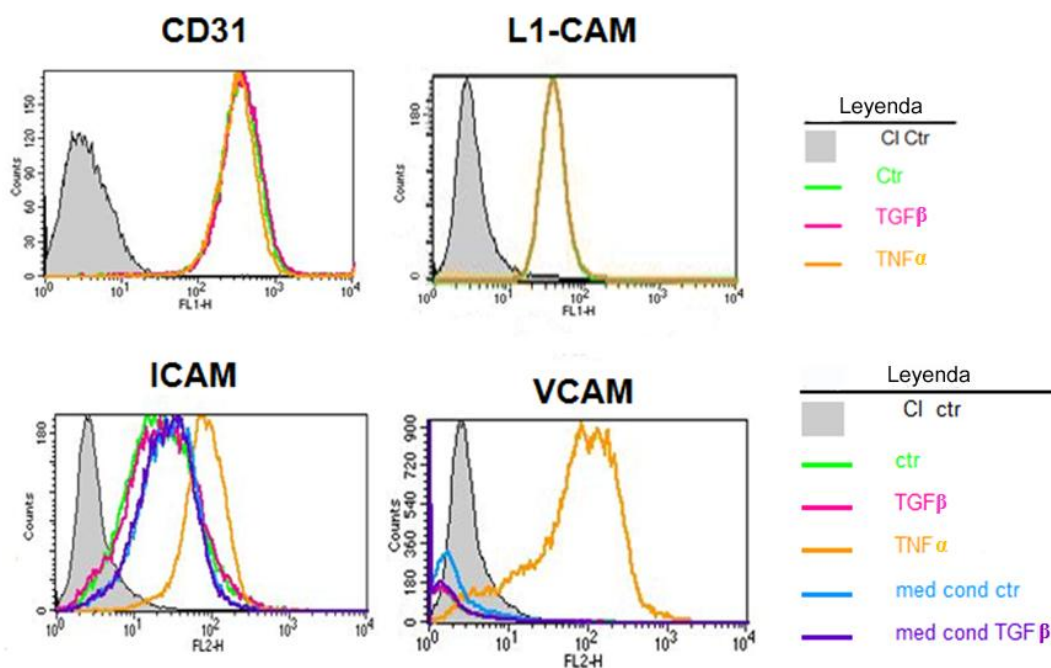


Figura R24: Detección de la expresión de los receptores de integrinas CD31, L1CAM, ICAM y VCAM en la superficie de las células de endotelio linfático mediante citometría de flujo, tras haber sido expuestas durante 24 h a los tratamientos indicados.

3.2. Unión de células tumorales al endotelio linfático. Posible participación de la integrina $\alpha v \beta 3$.

El siguiente paso en nuestro estudio consistió en demostrar si los receptores de integrina $\beta 3$ expresados por el endotelio linfático participaban en este proceso de trans migración o si esta integrina podría mediar la adhesión por otros mecanismos, por ejemplo, uniéndose a proteínas de la matriz depositadas sobre la superficie endotelial. Para clarificar este punto, repetimos los experimentos de trans migración de células tumorales a través de monocapas de células endoteliales linfáticas, pero esta vez en presencia de anticuerpos bloqueantes de los receptores de integrinas CD31 y L1CAM. En el caso de la molécula L1CAM se utilizaron individualmente dos anticuerpos diferentes: uno específico frente a la región de las uniones homotípicas L1-L1 (L1 9.3) y otro frente a la región RGD, que es la que permite la unión de L1 a integrinas (L1 35.9). Los resultados recogidos en la figura 29A, muestran que el bloqueo con cada uno de los dos anticuerpos frente a L1, inhibieron aproximadamente el 50% de la trans migración. Además, la incubación simultánea con los dos anticuerpos no resultó aditiva, indicando que las dos regiones del receptor L1 son necesarias igualmente para la adhesión de células tumorales sin que ninguno de los dominios del receptor ejerza un papel preponderante sobre el otro. No descartamos que existan uniones homotípicas L1CAM-L1CAM entre las células tumorales y el endotelio. De hecho, las células de carcinoma pulmonar expresan L1CAM en su superficie (Fig. R25A). Por otra parte, observamos un bloqueo de un 40% cuando los experimentos se realizaron en presencia de un anticuerpo bloqueante de la molécula CD31 (PECAM-1). Por tanto esta molécula también interviene en la trans migración de células tumorales a través del endotelio linfático. Observamos que las células H157 también expresan esta proteína pero a niveles mucho menores que en el endotelio (Fig. R25B).

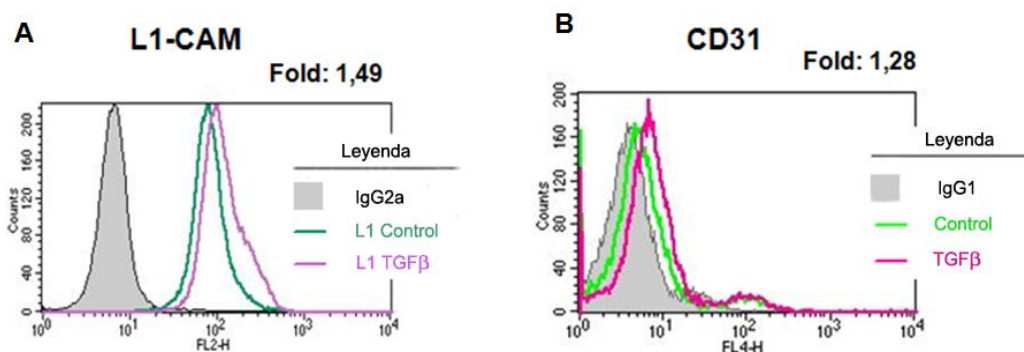


Figura R25. Expresión de las moléculas de adhesión L1CAM y CD31 en la superficie de células H157 mediante citometría de flujo, tras haber sido expuestas durante 5 días al tratamiento con TGF β a 2 ng/ml.

El bloqueo de las moléculas de adhesión L1CAM y CD31 dio lugar a la misma reducción en los niveles de trans migración a través de endotelio linfático cuando los experimentos se realizaron con células de carcinoma pulmonar H157 que habían sido expuestas a TGF β , si bien que en estos casos la adhesión basal era mayor (Fig 26B). En este caso se realizaron los experimentos con la mitad del número de células que en el grupo control, porque el TGF β aumentaba mucho la migración y la membrana de la cámara Boyden se saturaba. Se presentan los bloqueos en relación a sus respectivos controles en cada experimento.

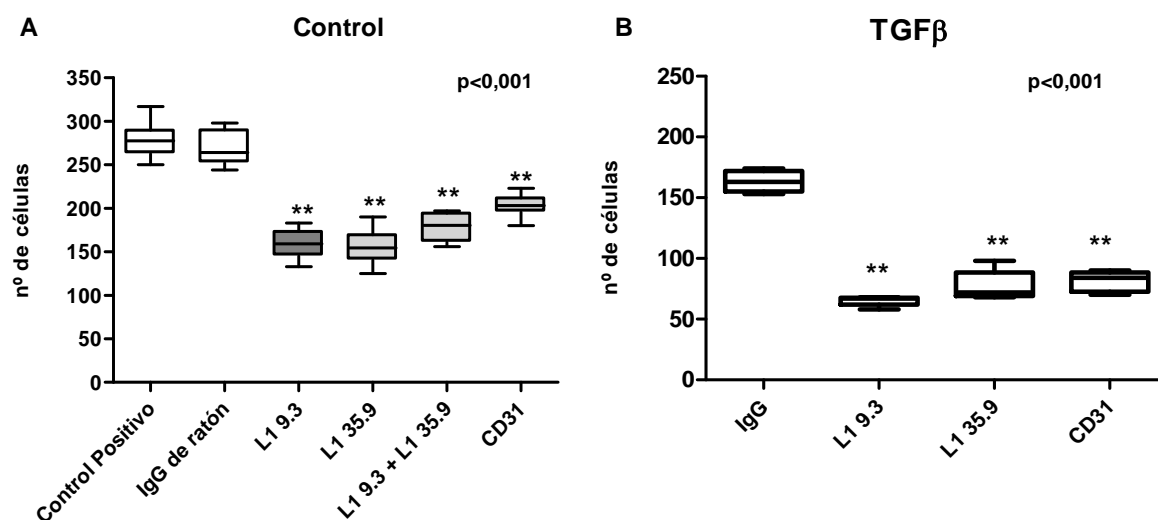


Figura R26. Bloqueo de la trans migración de las células H157 a través de monocapas de endotelio linfático, en experimentos realizados en presencia o en ausencia de anticuerpos monoclonales bloqueantes frente a los ligandos de integrina L1CAM (L19.3 y L1 35.9) y CD31. Los experimentos se realizaron con 7×10^4 células H157 control por pocillo (A) o 35×10^3 células H157 tratadas 5 días con TGF β (B). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba Anova con comparaciones múltiples post hoc de Dunnett (** $p < 0,001$).

A continuación, con objeto de determinar si realmente existía una relación entre la expresión del dominio RGD de la proteína L1CAM y la unión mediada por la integrina $\beta 3$ expresada por las células tumorales, repetimos los ensayos anteriores utilizando células H157 en las que se había silenciado de manera estable esta integrina. Observamos que sólo se bloqueó la adhesión de las células que no expresaban integrina $\beta 3$ cuando los experimentos se realizaron en presencia del anticuerpo bloqueante L1CAM 9.3, específico para los dominios 1 y 2, responsables de las uniones homotípicas L1-L1. En cambio, no se observó ningún bloqueo cuando se pre-incubó el endotelio con el anticuerpo L1 35.9 o el anticuerpo bloqueante frente a CD31 que impiden las uniones mediadas por integrina $\beta 3$. Estos datos demuestran que las células endoteliales unen células tumorales a través de las integrinas

expresadas por éstas (Fig 27), aunque también unan células tumorales por otros mecanismos, por ejemplo uniones homotípicas L1CAM-L1CAM.

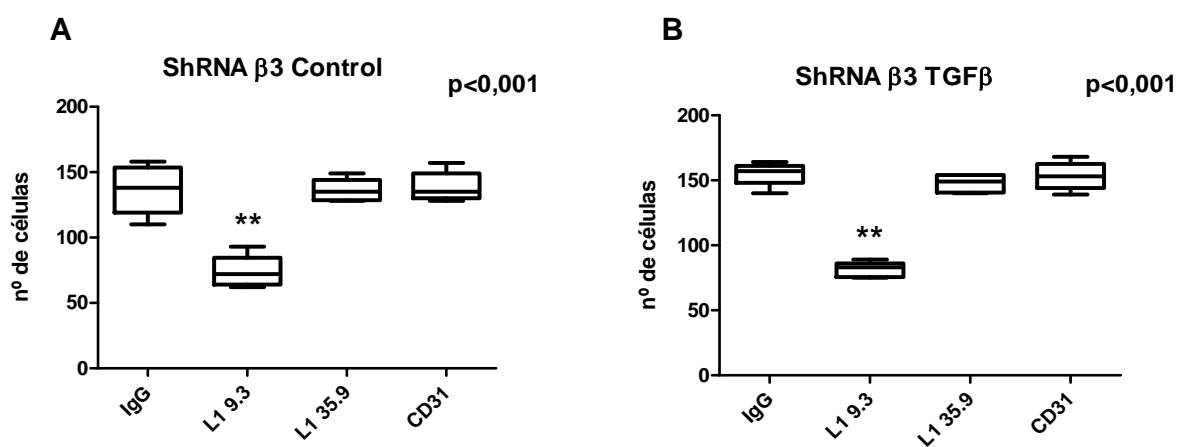


Figura R27. Ensayos de trans migración a través de monocapas de endotelio linfático de células de carcinoma pulmonar H157 control (A) y en las que se había silenciado la expresión de la integrina $\beta 3$ (B) realizados en presencia o en ausencia de anticuerpos bloqueantes de las moléculas de adhesión L1CAM y CD31. Ensayo realizado con 7×10^4 células H157 shRNA $\beta 3$. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba Anova con comparaciones múltiples post hoc de Dunnett (** $p < 0,001$).

También analizamos, mediante microscopía confocal, si existía una posible co-localización entre la integrina $\beta 3$ y sus receptores L1CAM y CD31 en la superficie de las células de endotelio linfático, pero no hemos podido obtener un resultado claro y a que además estas moléculas se expresaban en ambos tipos celulares y no formaban estructuras de adhesión significativas.

3.3 Ruta de trans migración de células H157 a través de LECS

Se ha descrito que, al igual que sucede en el tránsito de leucocitos a través de monocapas endoteliales, las células tumorales tienen dos mecanismos de trans migración endotelial: la trans migración paracelular, a través de las uniones inter-endoteliales ricas en proteínas de adhesión como JAMs, ocludina, claudinas, y la migración transcelular, en la que las células migran a través del citoplasma de las células endoteliales. Este proceso ocurre preferentemente en la microvasculatura, donde se ha descrito la participación de ICAM-1, caveolina y de los filamentos intermedios de vimentina (Carman y Springer, 2004). Con

objetivo de estudiar si la ruta de trans migración de las células H157 se modificaba tras la adición de TGF β , se analizaron por microscopía confocal las adhesiones a endotelio linfático de células tumorales tratadas y sin tratar con TGF β . Los resultados están descritos en la figura R28. No se observan diferencias importantes en el modo de migración transendotelial entre las células control y las células tratadas con TGF β , en ambos casos aproximadamente un 30% de las células atravesaron el citoplasma de las células endoteliales (vía transcelular) mientras que el 70% restante lo hacía desplazándose hasta las uniones célula-célula (vía paracelular).

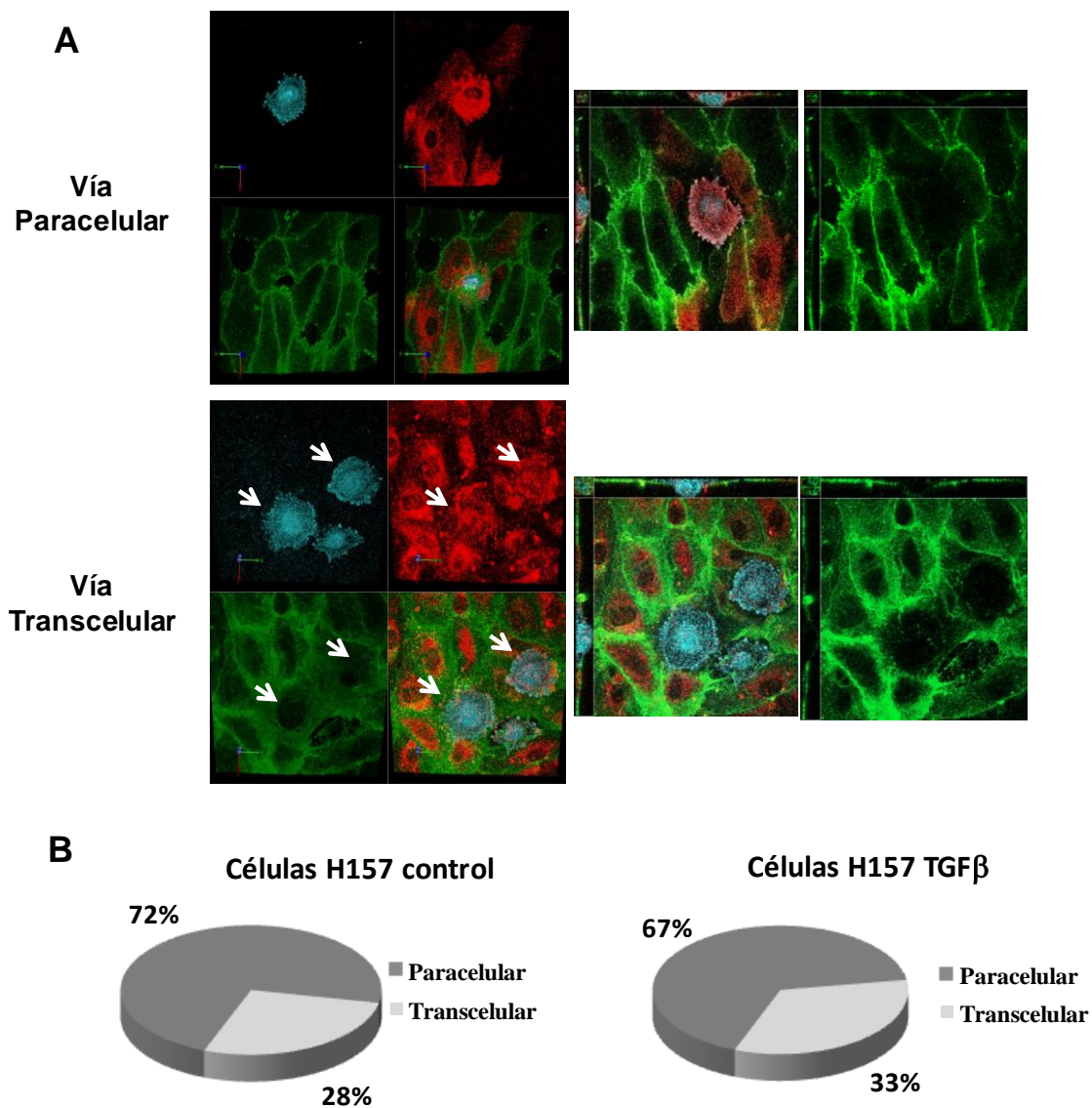


Figura R28. Análisis de las rutas de trans migración a través del endotelio de células H157. (A) Detección mediante inmunofluorescencia de la expresión de CD31 (verde) e integrina β 3 (rojo), en las zonas de contacto entre la células tumorales H157 (azul) y monocapas de endotelio linfático. (B) Cuantificación de los porcentajes de células que atraviesan el endotelio mediante la ruta transcelular y paracelular.

PARTE 4- Establecimiento de un modelo murino ortotópico de cáncer de pulmón y estudio de la aparición de metástasis en ganglios linfáticos

Los ganglios linfáticos son el primer lugar de establecimiento de metástasis en la mayoría de los carcinomas sólidos. Por esta razón, en este trabajo se quiso estudiar si el tratamiento con TGF β alteraba la incidencia de metástasis ganglionares obtenidas a partir de la implantación de células de carcinoma pulmonar H157 en ratones inmunodeprimidos. También se analizó la participación de la integrina β 3 en este proceso.

4.1. Inyección de células tumorales en las almohadillas de las patas traseras del ratón

Inicialmente, se intentó establecer un modelo de ratón muy sencillo de metástasis a ganglios linfáticos a partir de un tumor primario subcutáneo. Para ello se implantaron las células tumorales en las almohadillas de las patas traseras de ratones atímicos, y se analizó la presencia de células tumorales en los ganglios poplíteos tres semanas después. Con este modelo no fue posible encontrar células tumorales en los ganglios, aunque sí se observó una clara activación de los ganglios en aquellos ratones a los que se inyectaron células tumorales tanto tratadas con TGF β como sin tratar. En la figura R29, están representados el promedio de los nódulos linfoides primarios y nódulos linfoides secundarios, también llamados centros germinativos, de 12 ganglios poplíteos de ratones a los que se implantaron tumores de células H157 control y tratadas con TGF β . En el ensayo realizado, se observó que los ganglios poplíteos de los ratones pinchados con tumores de células tratadas con TGF β presentaron una mayor cantidad de nódulos linfoides primarios, respecto a los ganglios de los ratones a los que se les habían inyectado células no tratadas (control). Estos resultados sugirieron que el TGF β en este contexto, puede estar contribuyendo a una mayor proliferación de linfocitos, en este caso de linfocitos B, en los ganglios linfáticos más próximos al tumor primario, mediante la secreción de factores que “pre-condicionen” a éstos para la recepción de células tumorales, tal y como describieron Hood y colaboradores (Hood *et al*, 2011).

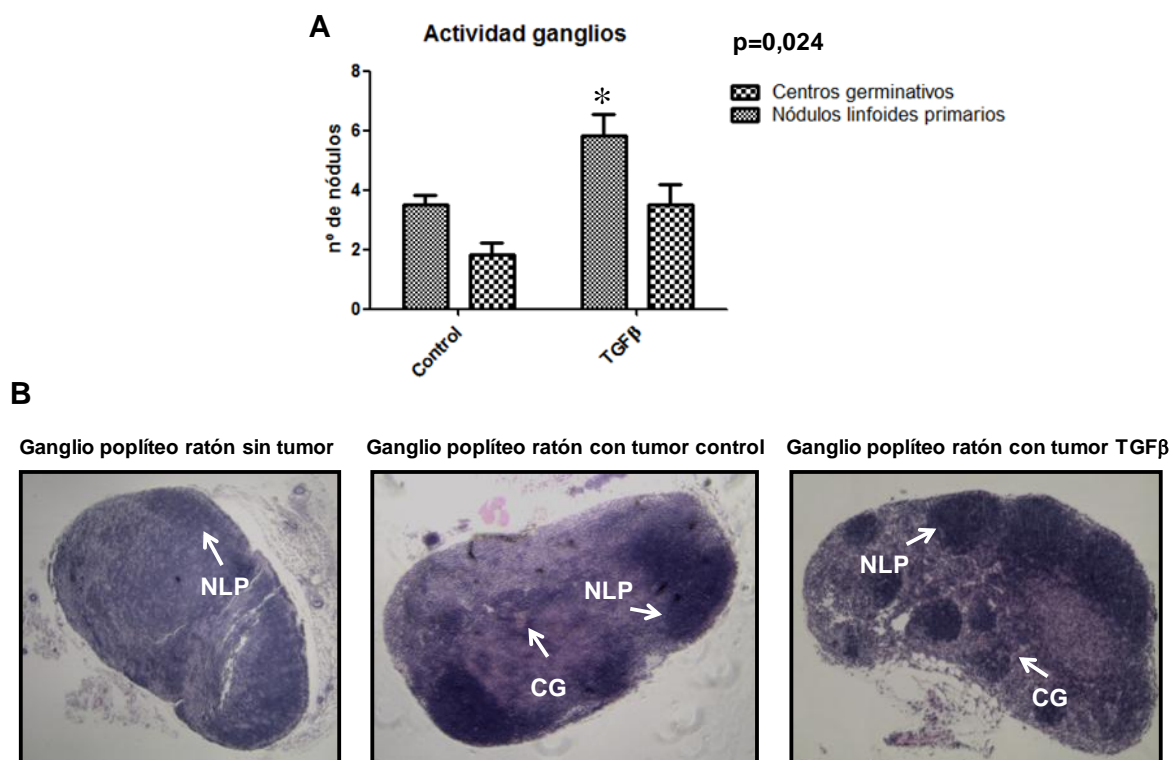


Figura R29: (A) Número de nódulos linfoides primarios en los ganglios poplíteos de los ratones inyectados con células H157 pretratadas o no con TGFβ. (B) Microfotografías (aumento 4x) de un ganglio poplíteo de cada uno de los grupos de ratones. Las flechas blancas indican un ejemplo de nódulo linfoide primario (NLP) y de un centro germinativo (CG). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba *t* de Student, (* $p=0,024$).

4.2. Implantación ortotópica de células tumorales en el pulmón

4.2.1. Efecto de los tratamiento con los inhibidores de TGFβ p17 y p144 en la cicatrización post-cirugía de los animales.

Ya que el modelo de implantación subcutánea no nos resultó adecuado para el estudio de la aparición de metástasis en nódulos linfáticos, decidimos poner a punto un modelo de inyección intrapulmonar (ortotópica) de células de carcinoma humano en ratones atímicos. De esta manera el contexto tumoral se parecería más al fisiológico y aunque presentaba dificultades técnicas nos pareció más completo.

La implantación ortotópica se realizó mediante la inyección de células tumorales a través del músculo intercostal, directamente dentro del pulmón izquierdo del ratón. Se dividieron los ratones en doce grupos distintos de entre seis y ocho ratones cada uno:

- Control: a los que se les introdujeron células tumorales no pretratados con TGF β .
- Control shRNA scramble: a los que se les introdujeron células tumorales no pretratados con TGF β , y transfectados con shRNA scramble (inespecífico).
- Control shRNA β 3: a los que se les introdujeron células tumorales no pretratados con TGF β y transfectados con shRNA β 3 (específico frente a integrina β 3).
- TGF β : a los que se les introdujeron células tumorales pretratados con TGF β .
- ShRNA scramble TGF β : a los que se les inyectaron células tumorales tratadas con TGF β y transfectadas con shRNA inespecífico (scramble).
- ShRNA β 3 TGF β : a los que se les inyectaron células tumorales tratadas con TGF β y transfectadas con shRNA específico frente a integrina β 3.

Los grupos de ratones a los que se introdujeron células tratadas con TGF β a su vez fueron divididos en subgrupos que fueron tratados sistémicamente con los péptidos inhibidores de TGF β P17, p144 o se mantuvieron sin tratamiento (PBS). Se les administró intraperitonealmente el tratamiento con los péptidos desde el día de la inoculación de las células tumorales hasta el día de su sacrificio, aproximadamente cuatro semanas después. Aunque el uso de estos inhibidores está bastante descrito y se ha demostrado su capacidad de bloquear la actividad del TGF β y su baja toxicidad en los animales, nos llamó la atención observar una peor cicatrización en aquellos ratones tratados con los péptidos, especialmente los que recibieron el péptido p144. Como se puede observar en la figura R30, el 97% de los ratones no tratados, después de 8 días de la implantación ortotópica, presentaban las heridas ya totalmente cerradas, con una cicatriz muy pequeña. En cambio, los ratones tratados con los péptidos todavía mantenían las heridas en el proceso de cicatrización en el mismo periodo de tiempo. Estos resultados apuntan a que al bloquear el mecanismo de acción del TGF β se impide la fibrinogénesis, y por lo tanto la correcta cicatrización y reparación de los tejidos lesionados.

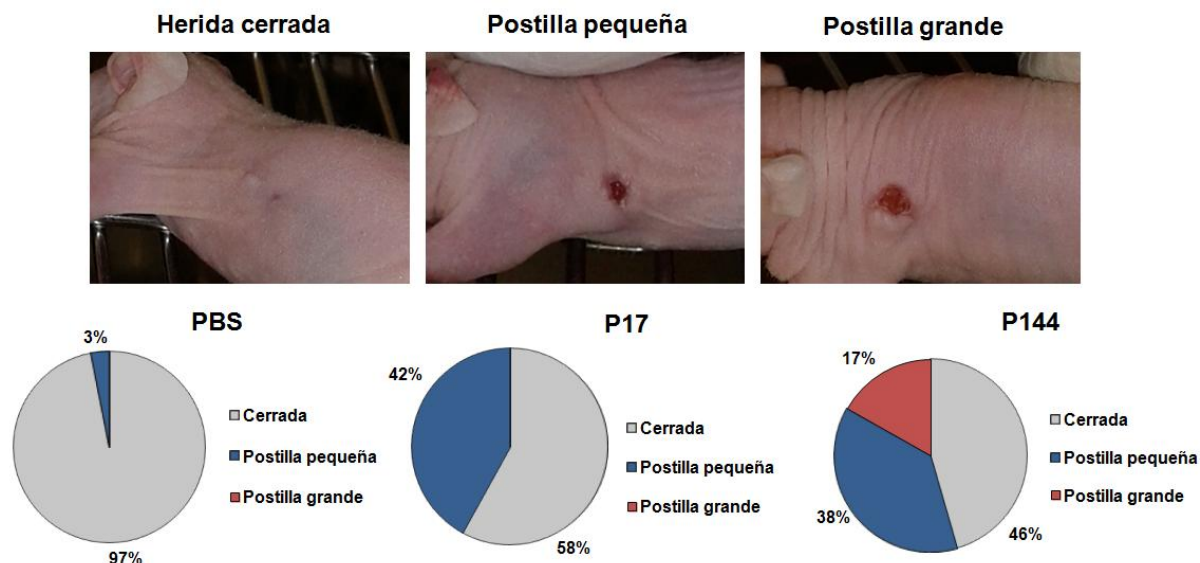


Figura R30. Cicatrización de las heridas 8 días después de la incisión y sutura realizada durante el procedimiento de implantación ortotópica de células tumorales en el pulmón.

4.2.2. Estudio del crecimiento tumoral y supervivencia de los ratones

Curvas de supervivencia

Se compararon mediante curvas de Kaplan–Meier, la supervivencia de los ratones en función de las células tumorales inyectadas y del tratamiento administrado a los animales. Como se puede observar en la figura R31A, si agrupamos todos los ratones atendiendo a si han recibido o no tratamiento con péptido, observamos que presentan una mayor supervivencia los ratones tratados con el p144: únicamente murieron 2 de los 24 ratones tratados con este péptido (índice de supervivencia de 92%). También se observa en la gráfica, que entre los ratones tratados con el péptido p17 y sin tratar (PBS), no hay diferencias significativas en supervivencia, lo cual indica que en nuestro modelo animal este péptido presenta una menor actividad en comparación con p144. A pesar de que el grupo de ratones tratado con p17 obtuvo un porcentaje de supervivencia del 63%, estos ratones se empezaron a morir dos días antes (día 13 del experimento) que los del grupo control (día 15), cuyo índice de supervivencia es inferior (48%).

En un análisis posterior se estudió la supervivencia de los ratones en función del clon de células de carcinoma escamoso de pulmón H157 inyectadas (Fig. R31B). Observamos una supervivencia del 100% en aquellos ratones cuyos tumores procedían de células pretratadas

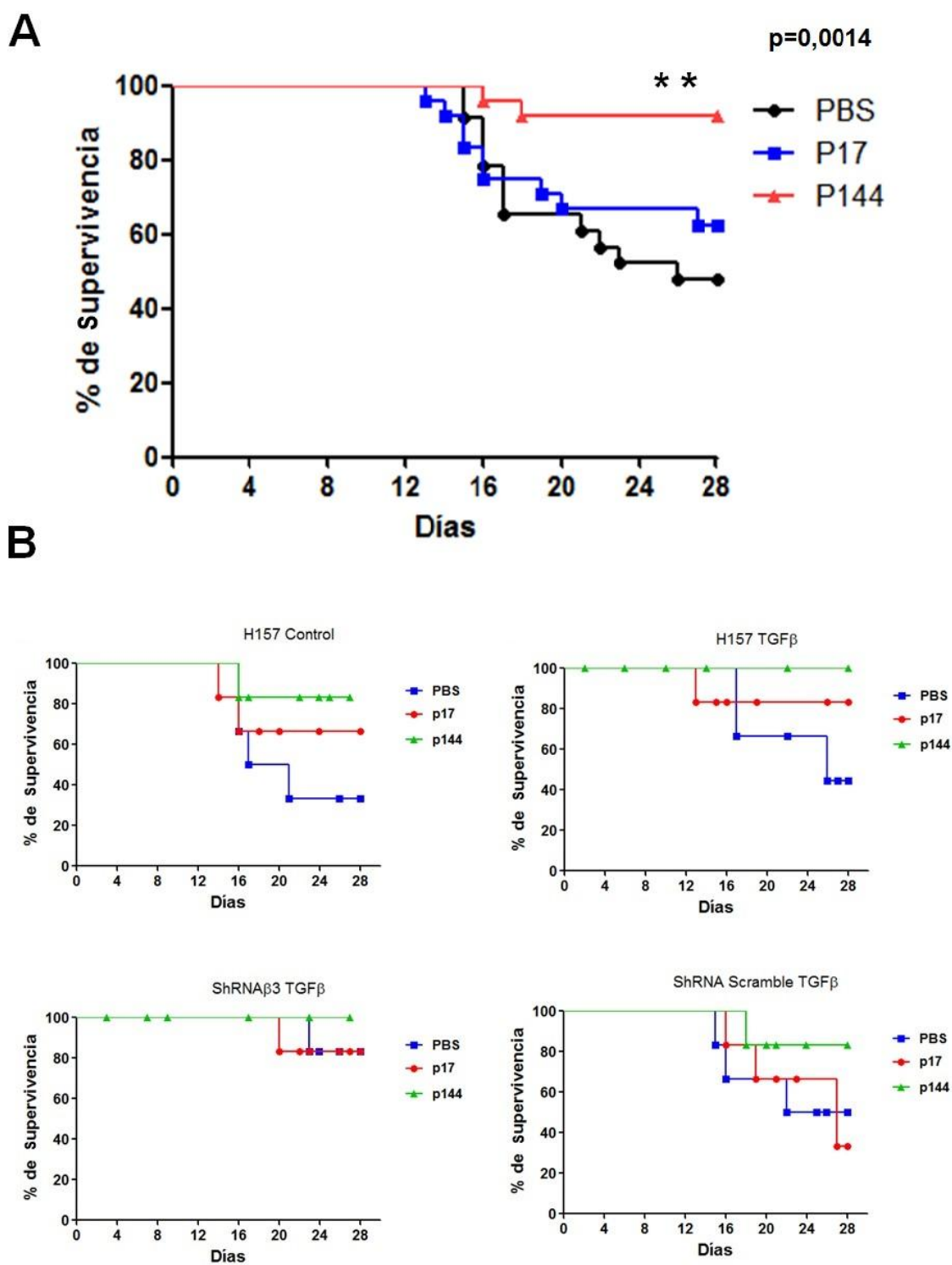


Figura R31. (A) Curvas de supervivencia de los ratones en función del tratamiento recibido. (B) Curvas de supervivencia de ratones en función del tipo de células tumorales implantadas ortotópicamente en el pulmón de los ratones: células H157 no tratadas (Control), células H157 tratadas con TGFβ (TGFβ), células H157 transfectadas con un ShRNA de secuencia aleatoria y tratadas con TGFβ (ShRNA scramble TGFβ) y células H157 transfectadas con un ShRNA frente a la integrina β3 y tratadas con TGFβ (ShRNA β3 TGFβ). El porcentaje de supervivencia de los ratones fue representado utilizando curvas de Kaplan-Meier, y las diferencias significativas entre los grupos respecto al grupo control fueron testadas utilizando el test de Log-rank: p144 respecto PBS (** p= 0,0014).

con TGF β (con y sin expresión de la integrina β 3) a los que se les administró el péptido inhibidor de TGF β p144 intraperitonealmente. Por el contrario, la supervivencia más baja se obtuvo en ratones a los que se les inocularon células no pretratadas con TGF β y no tratados con péptidos y en aquellas tratadas con p17 que recibieron células transfectadas establemente con secuencias aleatorias de shRNA (35%). De modo sorprendente se observó una mayor supervivencia en los ratones que recibieron células pretratadas con TGF β respecto a los mismos clones de células no pretratadas con la citoquina.

De estos datos se deduce que la inhibición de TGF β mediante el tratamiento con los péptidos siempre mejora la supervivencia respecto a los grupos no tratados, siendo el efecto mucho más evidente en el caso de p144. Además, el silenciamiento de la integrina β 3 mejora la supervivencia respecto a sus controles. Como se discutirá en el siguiente apartado, en los experimentos *in vivo* los tumores procedentes de células en las que se realizó una transfección estable con shRNA scramble dieron lugar a una supervivencia menor en ratones, muy probablemente por la acción de inhibición inespecífica de otras vías de señalización.

Área tumoral y micro-CT

Al sacrificarse los ratones, se extrajeron los pulmones y los ganglios axilares y braquiales de ambos lados del animal. Después de fijarlos con formaldehído, las muestras fueron incluidas en parafina y se realizaron cortes histológicos. Para el cálculo del área tumoral, los cortes de los pulmones que contenían el tumor primario fueron teñidos con hematoxilina-eosina y microfotografiados con un aumento de 4x. A continuación, utilizando el software de procesamiento de imágenes *Fiji* se midió en μm^2 el área delimitada en función de los píxeles que componen la imagen.

La figura R32 demuestra cómo en el grupo de ratones sin tratamiento (PBS), en aquellos animales a los que se inyectaron células H157 tratadas con TGF β , los tumores crecen 2,3 veces más que los tumores de los ratones a los que se inocularon células tumorales sin tratar (Control). Sin embargo, los tumores de los ratones en los que se implantaron células tumorales transfectadas con el shRNA β 3, el tamaño medio adquirido fue de 0,06 cm^2 ; mientras que su control, los tumores de ratones a los que se inyectaron células shRNA scramble, adquirieron un tamaño semejante al de los tumores de células tumorales sin tratar (0,3 cm^2).

Si analizamos el efecto del tratamiento de los ratones con el p17 en los distintos grupos de ratones a los que se les inocularon células pretratadas o no con TGF β , se observa que no afectó al crecimiento de las células que no fueron expuestas a la citoquina mientras que el crecimiento de los tumores procedentes de las células pretratadas con TGF β , presentó una tendencia ($p=0,117$) hacia tamaños menores. Tampoco observamos reducciones significativas en los tamaños de los tumores procedentes de células transfectadas con los vectores de expresión de shRNA, prácticamente presentan el mismo tamaño que los tumores de los ratones que no recibieron tratamiento (PBS).

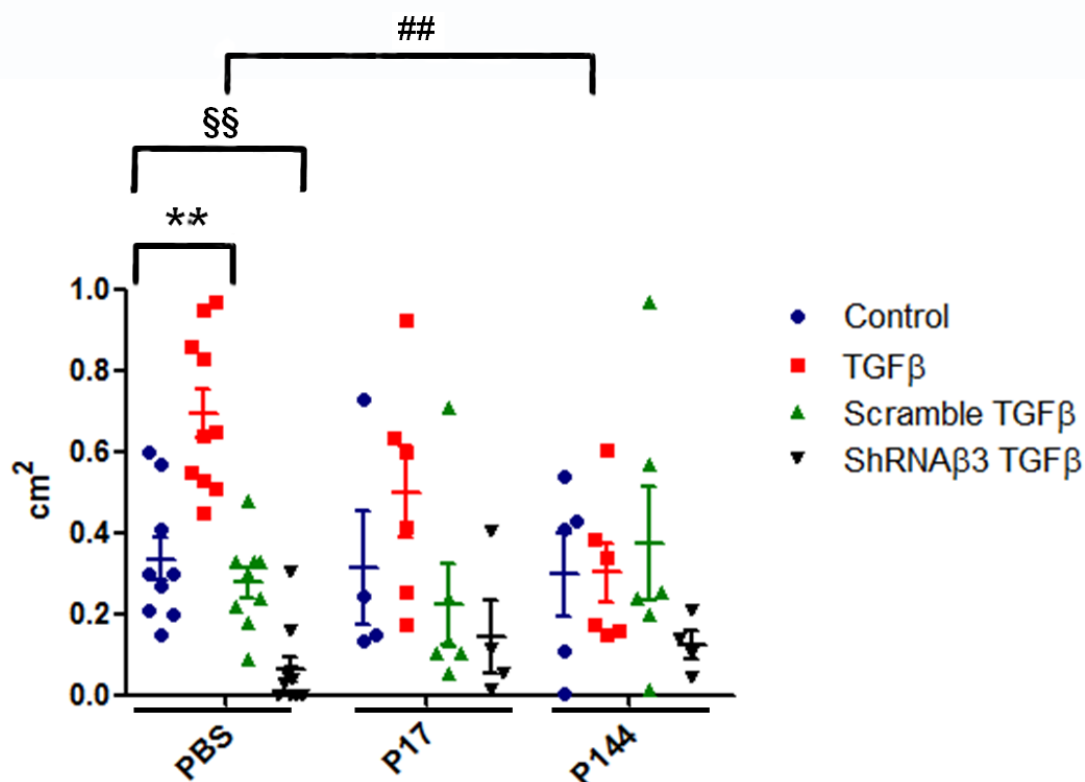


Figura R32. Cuantificación del área de los tumores a partir de cortes de parafina teñida con hematoxilina-eosina y analizados utilizando el software de procesamiento de imágenes *Fiji*. H157 TGF β PBS respecto a H157 control PBS (** $p < 0,001$); ShRNA β 3 TGF β PBS respecto a H157 control PBS (§§ $p = 0,001$); y H157 TGF β PBS respecto a H157 TGF β p144 (## $p = 0,004$). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA de un factor con comparaciones múltiples post-hoc de Dunnett.

En cuanto al tratamiento de los ratones con el péptido p144, los resultados indican que los tumores procedentes de células H157 que no recibieron pretratamiento con TGF β , adquieren el mismo tamaño tumoral que los inducidos en los ratones que no recibieron tratamiento con péptido (PBS). Sin embargo, los tumores procedentes de células pretratadas con TGF β proliferaron 2,3 veces menos en los animales tratados con p144, respecto a sus

correspondientes controles (PBS), hasta alcanzar tamaños próximos a los producidos al inyectar células H157 sin pretratamiento, demostrando la eficiencia del péptido p144. En los ratones a los que se implantaron células transfectadas con el shRNA $\beta 3$, el tratamiento con el péptido p144 no afectó al crecimiento tumoral, que fue en todos los casos pequeño y similar al obtenido en ratones no tratados (tamaño medio de $0,1 \text{ cm}^2$). Lo mismo ocurrió en los tumores de células transfectadas con el shRNA, el promedio de tamaño de los tumores no sufrió variaciones significativas.

Antes del sacrificio de los animales se realizó un análisis piloto utilizando la técnica de micro-CT para evaluar el daño pulmonar de ratones en los grupos H157 control, H157 TGF β y shRNA $\beta 3$ TGF β , sin tratar y tratados con p144 (Fig. R33). La microtomografía computarizada es una técnica por la cual mediante rayos-X se obtienen múltiples imágenes de cortes tomográficos reconstruidos en planos paralelos, formando imágenes en 3 dimensiones. En las imágenes obtenidas de los ratones, se pueden observar zonas blancas que son la columna vertebral y las costillas de los animales y zonas oscuras que son los pulmones que durante la respiración controlada del ratón son capaces de llenarse de aire y proporcionar el contraste necesario para la captación de la imagen. Las demás regiones sin marcaje localizadas en la cavidad torácica delimitada por las costillas y el diafragma, indican que el tejido pulmonar en esta zona está dañado, bien porque es tejido tumoral o bien por ser un tejido fibrótico afuncional.

Los resultados obtenidos con las imágenes del micro-CT muestran que los ratones a los que se inyectaron células transfectadas con el shRNA $\beta 3$ tratadas con TGF β y los ratones tratados con el péptido p144, presentan una menor área pulmonar afectada. También llama la atención la extensión de la lesión en los ratones del grupo H157 control y H157 TGF β , en las que apenas existe pulmón funcional.

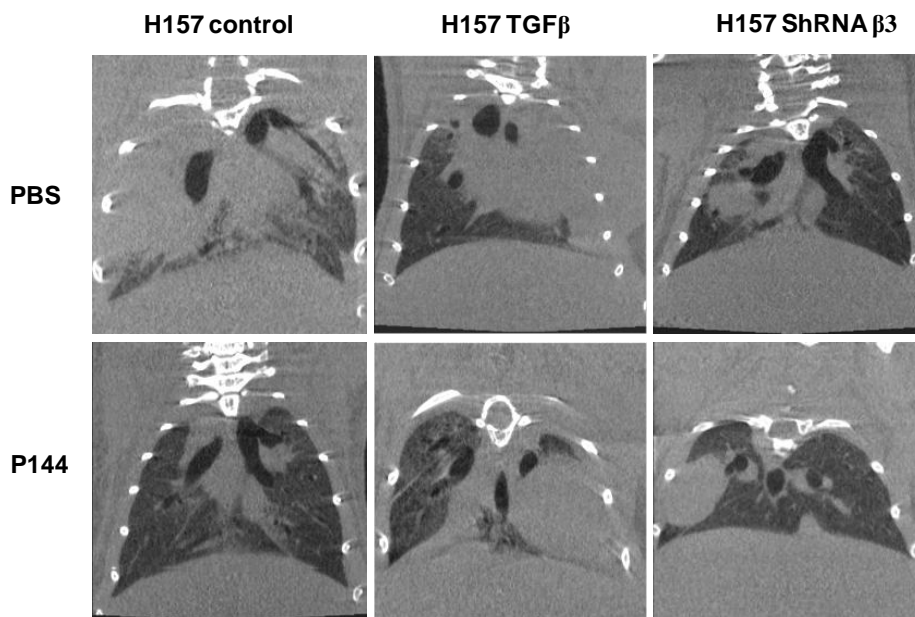


Figura R33. Micro-CT de pulmones de ratones con tumores procedentes de células H157, células H157 tratadas con el péptido p144 y células H157 shRNA β3 con y sin tratar con TGFβ.

4.2.3. Metástasis de células tumorales a ganglios linfáticos

Con objeto de estudiar *in vivo* si el tratamiento con TGFβ incrementa la metástasis a través de los vasos linfáticos y si ésta depende de la expresión de la integrina β3, se analizó la presencia de células tumorales en los ganglios axilares y braquiales derechos e izquierdos de ratones a los que se les había inyectado células tumorales en el pulmón.

En primer lugar, nos llamó la atención observar en bastantes ganglios un acúmulo significativo de linfa en su interior (Fig R34). Al analizar en qué grupos de ratones ocurría esto (Tabla R3), nos dimos cuenta de que sucedía en los ratones tratados con p17 y en aquellos a los que se les habían implantado células tumorales que no expresaban la integrina β3. No observamos ninguna asociación entre la acumulación de líquido en los ganglios linfáticos y el tamaño del tumor, ni con la incidencia de metástasis ganglionar. Parece más bien un efecto secundario del tratamiento con el péptido y/o de la inhibición de la expresión de integrina β3. De hecho en experimentos realizados por otros grupos que utilizan estos mismos péptidos en modelos murinos, se ha observado una vasodilatación importante en aquellos ratones que recibieron dosis continuadas y altas del péptido p17 (datos no publicados). El mecanismo molecular subyacente no se ha descrito todavía pero podría estar

relacionado, entre otros factores, con la inhibición de la expresión de endoglina, un receptor auxiliar de TGF β inducido por esta citoquina cuyo bloqueo induce alteraciones en la permeabilidad vascular (Park *et al*, 2013)

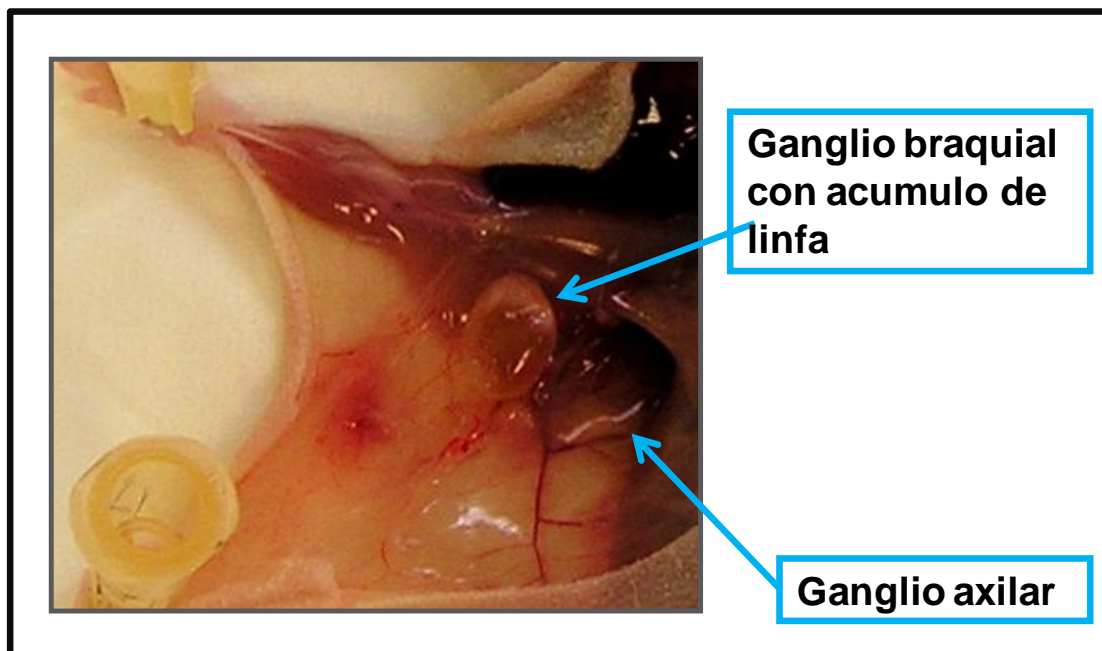


Figura R34. Fotografía de un ejemplo de ganglios con y sin acúmulo de linfa en el modelo ortotópico de carcinoma escamoso de pulmón.

Tabla R3. Porcentaje de ganglios con acúmulo de linfa según el tratamiento administrado a los ratones (PBS, p17 y p144) y el tipo celular inyectado en el pulmón (H157 control, H157 transfectadas con el shRNA scramble, H157 transfectadas con el shRNA β 3) tratado o no con TGF β .

	PBS	P17	P144
Control	6,50%	12,90%	9,70%
Scramble	6,50%	---	---
ShRNA β 3	3,20%	---	---
TGF β	0,10%	6,50%	3,20%
Scramble TGF β	3,20%	16%	3,20%
ShRNA β 3 TGF β	12,90%	19,40%	3,20%

A continuación, se realizaron cortes histológicos de los ganglios extraídos y embebidos en parafina. En estas muestras inicialmente encontramos muchas dificultades para

encontrar algún marcador específico que reconociera solamente las células de carcinoma escamoso de pulmón H157. Se realizaron pruebas con las citoqueratinas 14, 19, AE1, AE3, 8 y 18 descritos en la literatura como marcadores de expresión en carcinomas escamosos humanos, E-cadherina y el factor de transcripción p63. En ninguno de los casos estos marcadores resultaron adecuados, bien sea porque las células H157 no los expresaban en cultivo, o porque no lo expresaba en los tumores originados en los pulmones, o porque los anticuerpos presentaban una alta inespecificidad en ganglio. Por esta razón se decidió transfectar establemente a las células H157 con un vector de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) y utilizar para los experimentos las poblaciones celulares que expresaban niveles altos de esta proteína una vez aisladas las poblaciones mediante citometría de flujo.

Para la detección de marcaje para GFP en los tumores se utilizaron anticuerpos específicos frente a esta proteína y se puso a punto variando las condiciones de fijación de las muestras, ya que se perdía tinción dependiendo de las condiciones de fijación utilizadas. Determinamos el uso de la solución de Bouin, en vez de formaldehído exclusivamente, como la mejor opción (Fig. 35).

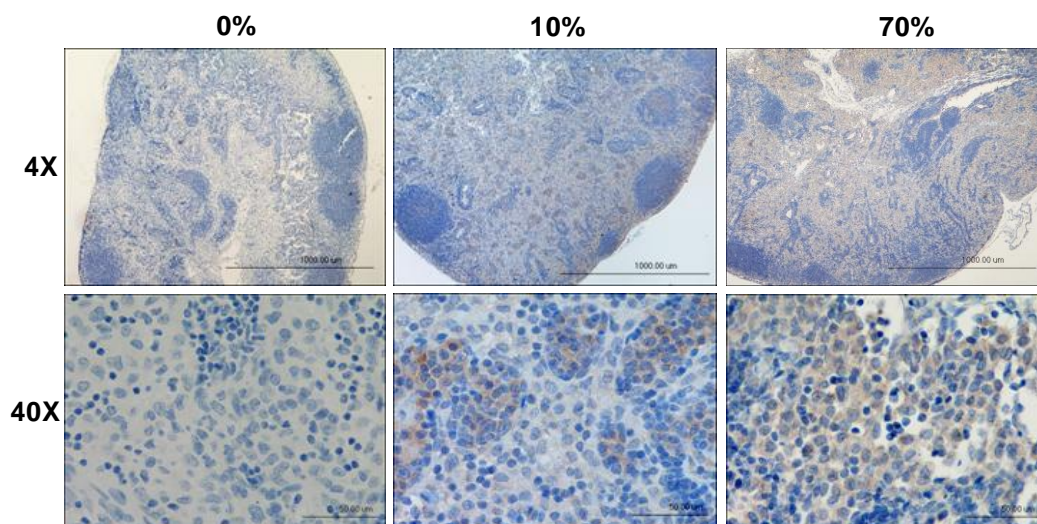


Figura R35. Detección de la expresión de GFP en ganglios linfáticos de ratones a los que se generaron tumores a partir de la inyección de células H157. El porcentaje sobre cada imagen indica el porcentaje de células tumorales respecto al número total de células en el ganglio.

Los resultados obtenidos en el análisis de la presencia de células tumorales metastásicas en los ganglios están representados en la tabla R4 y en la figura R36. Éstos indican que aproximadamente el 80% de los ganglios de los ratones tratados con PBS

(tratamiento control), presentaban células tumorales. El porcentaje tan elevado de metástasis en todos los casos nos indica que quizá hayamos esperado demasiado tiempo antes de sacrificar a los animales tal y como tratamos en la discusión.

Tabla R4. Tabla de los porcentajes de ganglios que presentaban células tumorales, según el tratamiento de los ratones (PBS, p17 y p144) a los que se inyectaron células H157, células H157 transfectadas con el shRNA $\beta 3$ y células H157 transfectadas con el shRNA scramble, con y sin tratar con TGF β .

	Control	ShRNA scramble	ShRNA $\beta 3$	TGF β	ShRNA scramble TGF β	ShRNA $\beta 3$ TGF β
PBS	80%	83%	57%	83%	81%	82%
p17	58%	---	---	67%	88%	79%
p144	21%	---	---	86%	83%	42%

A pesar de ello, cuando comparamos el número de ganglios que presentaron células tumorales de cada grupo respecto a las observadas en ratones control obtuvimos resultados de gran interés. En primer lugar observamos que el tratamiento con los péptidos resultó eficaz únicamente en el caso de inyectar células de carcinoma pulmonar no tratadas previamente con TGF β . Así el tratamiento con p17 ejerció un efecto inhibitor moderado al disminuir un 20% la incidencia de metástasis ganglionares respecto a los controles, pero el tratamiento con el péptido p144 las disminuyó muy notablemente (60%). Esto quiere decir que la inhibición del TGF β del estroma dificulta de algún modo la dispersión tumoral hacia los ganglios linfáticos.

Los resultados no fueron tan positivos cuando analizamos la incidencia de metástasis tras inyectar tumores de células que habían sido pretratadas con TGF β . En la gran mayoría de los grupos el tratamiento con cualquiera de los péptidos resultó irrelevante: no se observan diferencias significativas respecto a las células no tratadas con péptido. Esto quiere decir que las células pretratadas con la citoquina han adquirido alguna ventaja adaptativa que las hace insensibles al bloqueo de la señalización por TGF β . Resultó paradójico observar que a pesar de que en los experimentos in vitro estas células eran más motiles, se adherían mejor a los nódulos linfáticos y los traspasaban con mayor facilidad, en el modelo animal no dieron lugar a un mayor número de metástasis ganglionares.

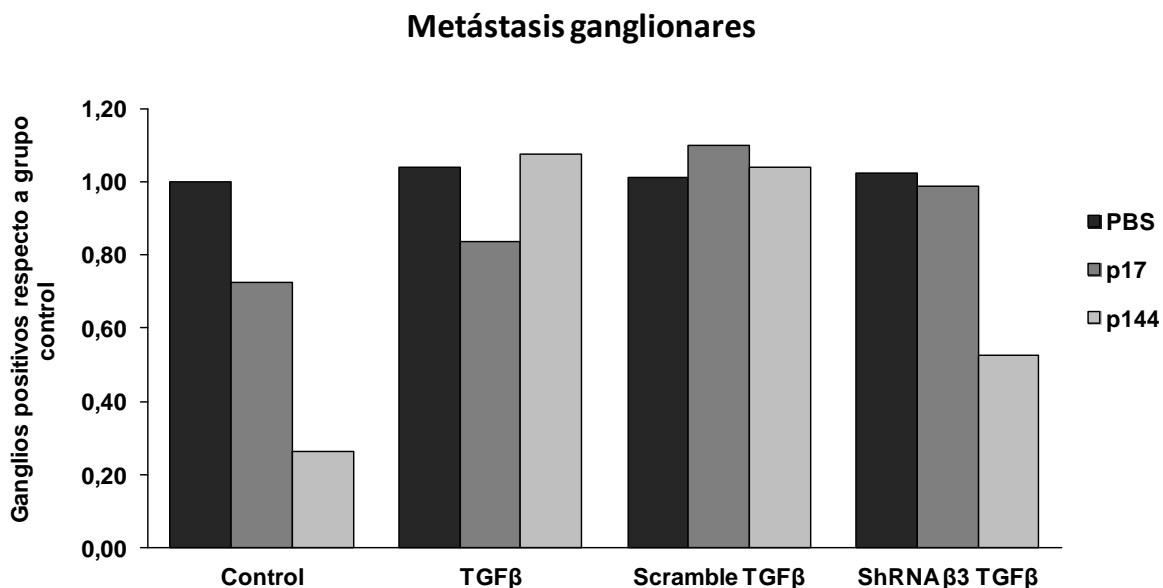


Figura R36. Proporción de ganglios linfáticos afectados respecto a los encontrados en ratones de grupo control, a los que se les inyectaron células H157 no tratadas con TGFβ.

Por último, resultó muy interesante observar que únicamente se obtiene una inhibición considerable en el número de ganglios afectados por células tumorales en el caso de implantar en los ratones células a las que se les ha silenciado la expresión de la integrina β3. Este dato sí que apoya las evidencias obtenidas *in vitro* y apunta a que esta integrina es realmente importante en el establecimiento de metástasis y su función depende de la existencia de TGFβ en el estroma.

Por otra parte se estudió la densidad de células tumorales en cada ganglio afectado y se establecieron comparaciones entre los grupos. De estas comparaciones dedujimos que la densidad de células tumorales en los ganglios afectados es la misma independientemente de los grupos (en torno a un 50%). Es decir, una vez que las células son reclutadas hacia el ganglio llegan a él en igual proporción.

Analizamos también si existía una mayor densidad de vasos linfáticos peri- y/o intratumorales en los diferentes grupos, marcando de modo específico los vasos linfáticos con anticuerpos frente a LYVE-1 de ratón y no observamos diferencias significativas. Así que no parece que el tratamiento con TGFβ induzca la linfoangiogénesis tumoral.

DISCUSIÓN

1. Integración de la respuesta fenotípica y genómica de células de NSCLC a TGF β

En este trabajo nos propusimos estudiar cómo el tratamiento con TGF β afectaba la migración de las células de carcinoma escamoso de pulmón hacia los vasos linfáticos y el papel que la integrina β 3 podría estar desempeñando en dicho proceso. Nos basamos en el hecho de que tanto las células del estroma como las tumorales presentan habitualmente niveles de expresión significativamente elevados de esta citoquina respecto a los niveles presentes en tejido sano, lo cual confiere al tumor una mayor capacidad invasiva, inmunosupresora y migratoria (Heldin *et al*, 2012). Iniciamos nuestro estudio midiendo la expresión basal de la citoquina y del receptor de tipo II, así como la activación de la vía de señalización en respuesta al tratamiento con TGF β en las 3 líneas celulares de NSCLC: A549, H157 y H1299. Se observó que las células H1299 responden en menor medida al TGF β que las otras líneas. Este hecho coincide con la baja expresión del receptor T β RII y corrobora el fenotipo de esta línea celular, en que las células son pobremente diferenciadas y potencialmente más malignas. De hecho, se ha descrito que tras el desarrollo de la carcinogénesis, las células neoplásicas del epitelio bronquial se vuelven resistentes a la inhibición del crecimiento inducida por el TGF β . Esto puede estar mediado por una disminución de la expresión del T β RII, por una mutación en los genes de las proteínas Smad 2 o Smad 4 (Elliott y Blobel, 2005), o incluso de una de las Smad inhibitorias (I-Smad) Smad 6 o Smad 7.

Una vez analizado el perfil de expresión y la respuesta al TGF β , estudiamos cómo dicha citoquina actúa sobre la proliferación de las células de NSCLC. El tratamiento con TGF β provocó una disminución significativa de la tasa proliferativa únicamente en la línea celular de adenocarcinoma A549, a diferencia de las células H157 y H1299, que mantuvieron unos índices de proliferación muy similares a los niveles basales. Este resultado indica que las células A549 no han perdido la capacidad de responder a esta citoquina en cuanto a su función anti-proliferativa. En cambio en los tres tipos celulares se observaron alteraciones en la morfología de las células tratadas con TGF β , que pasó a ser más alargada con una clara reorganización de las fibras de actina. Estos resultados indican la adquisición de un fenotipo propio de la TEM para el cual se ha descrito una pérdida de adhesión de las células epiteliales, la expresión *de novo* de α -actina, la reorganización de las fibras de actina, y la interrupción de la membrana basal (Wendt *et al*, 2012). Una vez experimentada la TEM las células se vuelven más invasivas. En consonancia con esto, en nuestros ensayos de adhesión a

matrices extracelulares llevados a cabo con estas líneas celulares de NSCLC observamos cómo el tratamiento con TGF β induce un pequeño aumento en la adhesividad, principalmente a fibronectina, y a vitronectina. Comparando las tres líneas tumorales entre sí, las células A549 son el único tipo celular que aumentó su adhesión a estas tres matrices tras el tratamiento con TGF β . En este sentido, estos resultados, junto con los de proliferación celular, parecen indicar que el aumento en los niveles de adhesión extracelular por parte de la línea celular A549 podría ser utilizado como una estrategia anti-apoptótica mediada por TGF β (Zhang *et al*, 2011).

A diferencia del efecto moderado observado en los experimentos de adhesión, el tratamiento con TGF β originó unos incrementos muy significativos en la migración de las células de carcinoma de pulmón, en ensayos en los que se usaron cámaras Boyden recubiertas con las proteínas de la matriz extracelular fibronectina y vitronectina, lo cual apunta a una posible intervención de moléculas de adhesión a la matriz extracelular en este proceso. Este incremento en la capacidad migratoria podría indicar un aumento de la malignización, puesto que las células de carcinoma necesitan adquirir motilidad para invadir otros nichos celulares (Zhang *et al*, 2011). Además, hay que tener en cuenta que la progresión tumoral no solamente depende del potencial intrínseco de las células tumorales, sino también de la composición y transformación de la matriz extracelular que las rodean. De hecho, se ha descrito que dependiendo del contexto, las proteínas de la matriz extracelular regulan procesos celulares como crecimiento, muerte, adhesión y diferenciación, además de controlar la angiogénesis y la metástasis (Wendt *et al*, 2012). Por esta razón nos propusimos analizar los cambios en la expresión de moléculas de adhesión, MMPs y componentes de la matriz extracelular en células H157 tras el tratamiento con TGF β . Así, utilizando un array de expresión específico para genes relacionados con la adhesión celular, se observaron alteraciones en la expresión de una gran cantidad de moléculas relacionadas con este proceso, como distintos tipos de colágenos, MMPs, integrinas, y otros componentes de la matriz extracelular.

Las MMPs son proteasas capaces de degradar proteínas de la matriz extracelular y procesar receptores de membrana y distintos factores de crecimiento, de modo que regula la señalización celular (Coronato *et al*, 2012). Durante la progresión tumoral, la remodelación de la matriz extracelular es un proceso activo que facilita la supervivencia y la proliferación de las células tumorales. De hecho, se ha demostrado en diversos estudios cómo la participación de las MMPs en este proceso favorece la invasión y el crecimiento tumoral. Por

ejemplo, se ha descrito en tumores de mama, que la sobreexpresión de las MMP 2 y 9 se asocian a mal pronóstico debido a la degradación del colágeno tipo IV localizado en las membranas basales y a la inducción de la expresión de factores angiogénicos (González *et al*, 2008).

Otras moléculas implicadas en la adhesión celular, y cuya expresión se modula en respuesta al tratamiento con TGF β , son las integrinas. El análisis por citometría de flujo de su expresión reveló un aumento en la expresión de las integrinas $\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ en células A549 tras el tratamiento con TGF β , mientras que en las células H157 fueron las integrinas αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ las que aumentaron su expresión. Estos resultados corroboran los obtenidos mediante el uso del array de expresión de cDNA en esta línea celular de NSCLC. Además, se observó una sobreexpresión de las integrinas αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ en la línea celular H1299. Estos datos sugieren que posiblemente estas líneas celulares de NSCLC estén utilizando estas integrinas para unirse a la fibronectina y a la vitronectina tras el tratamiento con TGF β , ya que estas proteínas de la matriz extracelular tienen sitios de unión específicos para ellas. La fibronectina es una proteína clave de la matriz extracelular que es depositada por células endoteliales durante el proceso de angiogénesis. La vitronectina es una glicoproteína extracelular encontrada principalmente en el plasma, así como en diversos tejidos extravasculares. La secuencia proteica de ambas proteínas contiene la secuencia Arg–Gly–Asp (RGD), que es reconocida por diversas integrinas. La fibronectina interacciona principalmente con αv , $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ (Avraamides *et al*, 2008), y la vitronectina presenta sitios de unión para las integrinas $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ (Aaboe *et al*, 2003).

La integrina $\alpha v\beta 3$ es una de las integrinas más estudiadas como posible diana terapéutica. Sus antagonistas son capaces de inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis, puesto que impiden el desarrollo de nuevos vasos. Además, se ha descrito que en las líneas de carcinoma de pulmón no microcítico H157 y H460, la radioterapia aumenta la expresión de esta integrina, como un mecanismo de supervivencia a la radiación. De hecho, al combinar la administración de Cilengitide, antagonista de la integrina $\alpha v\beta 3$, con la radioterapia se consigue inhibir el crecimiento tumoral y la angiogénesis en modelos de NSCLC (Albert *et al*, 2006). Por todo ello nos pareció interesante estudiar el efecto que ejerce sobre el desarrollo tumoral el silenciamiento o bloqueo de esta integrina.

En nuestro estudio, elegimos utilizar la línea celular H157 ya que expresa el receptor de TGF β , es insensible a las señales antiproliferativas desencadenadas por esta citoquina pero responde a la misma incrementando su tasa de adhesión y migración hacia factores quimioatrayentes. Además, responde a la inhibición de la señalización mediante péptidos inhibidores de TGF β y presenta una elevada expresión de la integrina $\beta 3$ en la superficie celular. Prestamos una especial atención a la participación de esta integrina en el aumento de la migración celular mediada por la citoquina. Lo más interesante de estos datos es que los incrementos observados *in vitro* en la adhesión, en la migración y en el dinamismo de las células tumorales tratadas con TGF β parecen ser dependientes de la correcta funcionalidad de la integrina $\beta 3$, ya que al tratar células deficientes en la integrina con TGF β , no se restauran los niveles de motilidad observados en las células H157 control. En este sentido, los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, demuestran que las células H157 deficientes en la expresión de la integrina $\beta 3$ se adhieren y transmigran menos a través de monocapas de endotelio linfático de pulmón. Además, las células transfectadas con el shRNA específico frente a $\beta 3$ tardan más en adherirse al endotelio que las células control. Estas células también presentan una motilidad muy reducida sobre monocapas de endotelio linfático de pulmón, se expanden menos sobre las células endoteliales y emiten menos “blebs” cuando están en contacto con el endotelio antes de adherirse. Estos datos por tanto indican cómo esta integrina participa en el desarrollo tumoral, no sólo por su función en las células del estroma, principalmente en el endotelio, sino en las células tumorales. Esto es importante porque apoyaría el uso de terapias frente a esta integrina, en estadios muy tempranos, antes de que comience la vascularización tumoral.

2. El tratamiento con TGF β incrementa el dinamismo celular

Las células metastásicas presentan un importante incremento de su motilidad. En el presente trabajo hemos podido demostrar mediante vídeos de microscopía confocal a tiempo real, que las células H157 tratadas con TGF β son más dinámicas sobre monocapas de endotelio linfático en comparación con células sin tratamiento. En estos vídeos identificamos dos tipos de migraciones: la primera, observada principalmente en aquellas células tratadas con TGF β , conlleva la formación de lamelipodios y se caracteriza por ser un tipo de migración mesenquimal; y la segunda, observada en prácticamente todos los vídeos tanto en

células control como tratadas con la citoquina, se caracteriza por la formación de “blebs” y está relacionada con la migración tipo ameboide.

El mecanismo de migración tipo mesenquimal es típico de las células tumorales sometidas a la TEM siendo células con una morfología más alargada. Bergat y colaboradores (Bergert *et al*, 2012) han descrito que la formación de lamelipodios está mediada por la activación de la GTPasa Rac1 que conlleva una polimerización protrusiva de actina y permite la formación de estas estructuras. En cuanto a la migración tipo ameboide, se ha descrito que la formación de “blebs” en la membrana celular aparece como resultado de la presión intracelular generada por contracciones del sistema actina-miosina, mediado por la activación de RhoA/Rock (Lämmermann y Sixt, 2009). Además, resulta muy interesante que la capacidad adhesiva de las células en movimiento también ejerza una influencia importante en el tipo de migración (Friedl y Wolf, 2010). De hecho, la migración tipo ameboide está asociada a fuerzas de tracción reducidas y una baja adhesión celular. Sin embargo, las células que presentan una migración mesenquimal, normalmente se encuentran fuertemente adheridas (Friedl y Wolf, 2003). En nuestro caso resultó muy claro cómo el tratamiento con TGF β incrementaba el movimiento mesenquimal mediante un mecanismo dependiente de integrina β 3 al menos en parte, porque al silenciar su expresión las células volvían al movimiento ameboide que presentaban las células control. Sería muy interesante profundizar en la regulación de las vías de señalización hacia proteínas del citoesqueleto en nuestro sistema experimental.

Por otra parte, para formar un tumor secundario, las células tumorales deben invadir los vasos sanguíneos o los vasos linfáticos peritumorales y así diseminarse a otros órganos. Las células pueden atravesar el endotelio mediante diapédesis paracelular o transcelular (Woodward, 2008). Durante la transmigración paracelular las células tumorales migran entre las uniones inter-endoteliales. En células tumorales de colon, este mecanismo está regulado por la molécula de adhesión E-selectina y la señalización mediada por ERK. En la migración transcelular, la célula tumoral atraviesa el citoplasma de la célula endotelial. Existen evidencias de este tipo de migración en el que las células tumorales son envueltas en grandes vacuolas por las células endoteliales que las transportan a través del endotelio (Tremblay *et al*, 2008).

Al observar alteraciones tan claras en la adhesión de las células H157 tras el tratamiento con TGF β , supusimos que también podrían cambiar el tipo de diapédesis. Sin

embargo, no observamos alteraciones en los porcentajes de células que utilizaban la ruta transcelular o paracelular. Por tanto no parece que el TGF β esté implicado en la regulación del tipo de tránsito a través del endotelio linfático. De hecho, los vasos linfáticos poseen unas características morfológicas que los hacen especialmente permeables al paso de células a su través (Farnsworth *et al*, 2006). Así, se ha descrito que el tránsito de leucocitos a través del endotelio linfático sucede mediante procesos en los que no intervienen integrinas, sino que es un proceso meramente mecánico (Lämmermann *et al*, 2008). Sin embargo, también se ha descrito que en condiciones de inflamación, los mecanismos de migración también pueden ser dependientes de integrina, como es el caso de las células dendríticas que atraviesan los vasos mediante un proceso dependiente de la expresión de la integrina LFA-1 (Rouzaut *et al*, 2010). Una situación semejante se ha descrito en la transmigración de células de melanoma a través de endotelio vascular sanguíneo. En este trabajo, Ghislin y colaboradores confirman la intervención de la integrina leucocitaria LFA-1 y de su receptor ICAM, mediante bloqueos dirigidos a estas moléculas (Ghislin *et al*, 2012).

En nuestro trabajo describimos por primera vez mecanismos de transmigración integrina-dependiente en el tránsito de células de NSCLC a través de endotelio linfático. En concreto, demostramos la intervención de la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ y de sus ligandos L1CAM y PECAM-1 (CD31). Observamos que tras inhibir la expresión de la integrina β3 mediante la transfección de células con un shRNA específico (ShRNA β3), o utilizando anticuerpos bloqueantes frente a ella o sus ligandos L1CAM y CD31, disminuye significativamente la transmigración de las células H157 a través de monocapas de endotelio linfático. L1CAM y CD31 son glicoproteínas, miembros de la superfamilia de moléculas de adhesión de inmunoglobulinas (Ig). CD31 se encuentra expresada en células endoteliales y se concentra en las uniones interendoteliales (Ma *et al*, 2012). La expresión de L1CAM fue identificada por primera vez y de manera exclusiva en el sistema nervioso, aunque también se ha descrito en la superficie de células epiteliales, en leucocitos y en varios tipos de tumores (Kiefel *et al*, 2012). De hecho, la sobreexpresión de L1CAM está correlacionada con un mal pronóstico en pacientes con carcinomas de ovario, de endometrio y con carcinoma hepatocelular. L1CAM está asociado con un incremento en las metástasis en melanoma y carcinoma colorectal (Guo *et al*, 2012; Issa *et al*, 2009). La unión de la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ expresada por las células tumorales y L1CAM expresada por el endotelio vascular sanguíneo durante la intravasación de células neoplásicas, ya ha sido observada en modelos de melanoma (Voura *et al*, 2001) y en tumores pancreáticos (Issa *et al*, 2009). Sin embargo, no hay trabajos que describan la

transmigración integrina-dependiente de células tumorales a través del endotelio linfático. Por tanto los resultados obtenidos en este trabajo nos parecen muy interesantes. De hecho, se ha descrito que la expresión de citoquinas inmunomoduladoras, tales como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ y $\text{TGF}\beta 1$, aumentan la expresión de L1CAM en células endoteliales (Issa *et al.*, 2009). En nuestro caso, no hemos observado cambios en la expresión de L1CAM en células de endotelio linfático de pulmón tras el tratamiento con $\text{TNF}\alpha$ o con $\text{TGF}\beta 1$, sin embargo, sí detectamos cambios en la expresión de L1CAM en células H157 tratadas con $\text{TGF}\beta$. Todo ello nos lleva a pensar en la intervención conjunta de las uniones homotípicas L1CAM/L1CAM y heterotípicas L1CAM/integrina en la transmigración de células de NSCLC a través del endotelio linfático. Queda pendiente aportar evidencias morfológicas de la interacción entre la integrina $\beta 3$ y sus ligandos en el endotelio linfático. En nuestras manos se observaron puntos discretos de interacción pero no detectamos estructuras de adhesión claras en los que se concentraran la integrina y sus receptores.

3. Estudio *in vivo* del efecto del $\text{TGF}\beta$ y de la participación de la integrina $\beta 3$ en la progresión tumoral

En este trabajo se estableció un modelo de ratón para el estudio de las metástasis a nódulos linfáticos de células de carcinoma escamoso de pulmón que se implantaron de manera ortotópica en los pulmones de los ratones atímicos. Así, con este modelo murino pudimos estudiar los efectos del tratamiento crónico con $\text{TGF}\beta$ y/o sistémico en el desarrollo tumoral y en la capacidad migratoria de células H157 hacia ganglios linfáticos. Además, este modelo también nos permitió estudiar los efectos de la ausencia de la integrina $\beta 3$ en la generación de tumores y en la migración de estas células a los nódulos linfáticos.

En primer lugar, observamos que tanto la implantación de células tumorales en las almohadillas de las patas traseras de los ratones, como la implantación ortotópica de células tumorales en el pulmón, promueven una activación de los ganglios linfáticos regionales, principalmente cuando las células tumorales inyectadas habían sido tratadas previamente con $\text{TGF}\beta$. Esta activación se manifiesta en una hiperplasia ganglionar y en un número más elevado de centros germinativos. De hecho, se ha descrito que en presencia de un tumor primario, los ganglios linfáticos regionales que drenan este tumor aumentan de tamaño, sin que exista ninguna evidencia de metástasis. Esta situación también es conocida como

linfadenopatía reactiva al tumor (Qian *et al*, 2006). Así, la inyección de células tumorales en nuestro modelo también induce la activación ganglionar, seguramente mediante la inducción de citoquinas proinflamatorias que pueden precondicionar el ganglio linfático.

Cuando analizamos el tamaño de los tumores observamos un aumento notable en aquellos procedentes de células tratadas con TGF β , aunque la supervivencia de los ratones no varió. Curiosamente, en los ensayos *in vitro* no se detectaron diferencias significativas en la proliferación o apoptosis de las células H157 tratadas con TGF β respecto a sus controles. Esto nos sugiere que las células pretratadas con la citoquina responden en mayor medida a señales procedentes del estroma que facilitan su proliferación y supervivencia probablemente alterando la expresión de receptores de membrana (Connolly *et al*, 2012).

En los análisis de supervivencia nos llamó la atención observar una supervivencia del 100% en aquellas células en las que se había silenciado la expresión de la integrina $\beta 3$ sin tratar con TGF β , mientras que si se les trataba con TGF β , la supervivencia era de un 80%. En ambos casos suponía una mejoría respecto a los ratones control en los cuales la supervivencia fue de un 30% a los mismos tiempos. Los datos de supervivencia coinciden en parte con los obtenidos al medir el volumen tumoral, donde las células en las que se había silenciado la integrina produjeron tumores de tamaño muy reducido, independientemente de que las células hubiesen sido tratadas o no con TGF β . Estos datos nos hacen pensar que la supervivencia no depende tanto del tamaño del tumor primario como de otros factores, como la capacidad de metastatizar y expandir la enfermedad. Diversos trabajos apuntan a la participación de la integrina $\beta 3$ en la progresión tumoral (Desgrosellier *et al*, 2009; Marchán *et al*, 2010); por ejemplo, en carcinomas de mama y de próstata. Además, la integrina $\alpha \beta 3$ promueve la metástasis a hueso aumentando la adhesión de las células tumorales (McCabe *et al*, 2007; Sloan *et al*, 2006). También se ha descrito que la expresión de la integrina $\alpha \beta 3$ se correlaciona con la progresión de la enfermedad y una disminución de la supervivencia en pacientes con carcinomas cervicales (Gruber *et al*, 2005). Por último, se ha descrito que en adenocarcinomas de páncreas el 58% de los tumores humanos expresan $\alpha \beta 3$, y esta expresión está asociada con un aumento de la metástasis a ganglios linfáticos (Hosotani *et al*, 2002).

Para poder estudiar si las variaciones observadas se debían a la respuesta a TGF β procedente del estroma, introdujimos varios grupos de ratones a los que tratamos diariamente

con los péptidos inhibidores de TGF β p17 y p144. Con estos tratamientos buscamos inhibir el efecto del TGF β endógeno. Diversos trabajos publicados previamente demuestran la eficacia *in vitro* (Dotor *et al*, 2007) e *in vivo* (Díaz-Valdés *et al*, 2011) de estos péptidos en la inhibición de las respuestas pro-tumorales inducidas por el TGF β en estadios avanzados del cáncer. Por ejemplo, en un trabajo desarrollado por Zubeldia y colaboradores (Zubeldia *et al*, 2013) se demuestra como el tratamiento con los péptidos p17 y p144 inhibe el crecimiento tumoral generado por células de cáncer colorectal, pretratadas con TGF β e inyectadas en el bazo de los animales. Además, en este mismo trabajo se aprecia una disminución de la metástasis a hígado en un 50% en los ratones tratados con el p17, y en un 87% en el caso de los ratones tratados con el p144. Por otra parte, se ha descrito que estos péptidos inhiben la fibrosis (Hermida *et al*, 2009) y potencian la inmunoterapia antitumoral (Llopiz *et al*, 2009).

Al analizar en su conjunto los grupos de animales que recibieron el tratamiento con los péptidos inhibidores, se puede observar que los dos péptidos no actúan del mismo modo. El tratamiento con el péptido p17 mostró un efecto moderado, mientras que el tratamiento de los animales con p144 resultó ser más eficaz. La diferente actividad de los péptidos, puede deberse tanto a su estructura química (el p17 es mucho más soluble que el p144), como a su vida media y su biodisponibilidad. De hecho, el p17 es un péptido cuya secuencia fue obtenida a partir de una biblioteca de fagos, y el péptido p144 tiene la secuencia derivada del T β RIII (β -glicanos), aunque ambos péptidos bloquean el mismo ligando (Dotor *et al*, 2007; Ezquerro *et al*, 2003).

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con el péptido p144 aumenta significativamente la supervivencia de los animales. Esto podría estar relacionado con el hecho de que el p144 inhibe el efecto que tiene el TGF β sobre la inducción de las NADPH oxidasas (Baltanás *et al*, 2013), que reducen el estrés oxidativo de las células no tumorales y por tanto, mejoran el estado general del animal. Nos pareció interesante observar que el tratamiento con el péptido p144 sólo afecta al crecimiento de aquellos tumores que fueron expuestos *in vitro* a TGF β , mientras que no es eficaz a la hora de frenar el crecimiento de aquellos tumores no pretratados con esta citoquina. De nuevo, parece que las células pretratadas con TGF β han experimentado alteraciones que las hacen insensibles al bloqueo de TGF β , bien sea por la activación constitutiva de sus receptores o de moléculas que forman parte de la vía de señalización activada por el TGF β , o por alteraciones en la respuesta a factores de crecimiento u otros reguladores producidas por el estroma. A este respecto se ha

publicado cómo el TGF β tanto en las células tumorales como en las células del estroma, induce la expresión de receptores de factores de crecimiento como VEGF (Mirzoeva *et al*, 2013), CTGF (Mazzocca *et al*, 2010), FGF (Franco *et al*, 2011), IL-8 (Lu y Dong, 2006), las metaloproteasas de matriz MMP2 y MMP9 (Padua y Massagué, 2009) y otras proteínas que componen y modulan la matriz extracelular (Doyle *et al*, 2012). Todos estos factores favorecen la proliferación celular, la angiogénesis, la metástasis y mantienen un microambiente tumoral idóneo para la progresión de la enfermedad.

Por tanto, podemos resumir los resultados obtenidos respecto al crecimiento tumoral diciendo que: 1) aquellas células pretratadas con TGF β originan tumores de mayor tamaño al ser introducidas en los pulmones de ratones atímicos, 2) la administración sistémica de péptidos bloqueantes de TGF β sólo detiene el crecimiento de aquellas células que no han sido expuestas a la citoquina, y 3) las células en las que se ha silenciado de manera estable la integrina β 3 originan tumores significativamente más pequeños, aunque hayan sido pretratadas *in vitro* con TGF β . Por tanto la adhesión al estroma mediada por esta integrina parece importante para el crecimiento tumoral.

El fin último de nuestro trabajo estaba dirigido a analizar si el tratamiento con TGF β inducía en las células una mayor facilidad para atravesar los vasos linfáticos y establecer metástasis en los nódulos linfáticos. Mediante los ensayos *in vitro* vimos claramente que se incrementaba la quimiotaxis hacia estos vasos, así como la capacidad de adherirse y atravesar monocapas de endotelio linfático. Además, vimos cómo en este proceso, la integrina β 3 parecía desarrollar una función importante.

Así, analizamos la incidencia de metástasis en los ganglios linfáticos axiales y pulmonares de los ratones a los que inyectamos los distintos grupos experimentales de células H157 en el pulmón. Esperábamos que aquellas que habían sido pretratadas con TGF β colonizaran en mayor medida a los nódulos linfáticos, ya que observamos que la inyección de células tumorales provocó la hiperplasia de los ganglios linfáticos. Sin embargo, nos llamó la atención observar el mismo porcentaje de células tumorales en los ganglios que aquellos ratones a los que se inyectaron células H157 tratadas y no tratadas con TGF β (80% H157 control, y 83% H157 TGF β). Este resultado nos llevó a pensar que en nuestro modelo es irrelevante el tratamiento previo de las células H157 con TGF β , en cuanto a su capacidad de migrar a los ganglios linfáticos, o que existía algún defecto en el diseño experimental.

Podemos interpretar estos resultados de distintos modos. En primer lugar, podría ser que las moléculas implicadas en la transmigración de las células tumorales a través de los vasos linfáticos y consecuentemente la migración hacia los ganglios, mantengan su función independientemente de los efectos producidos por el TGF β en la célula tumoral. De hecho, Giampieri y colaboradores (Giampieri *et al.*, 2009; Giampieri *et al.*, 2010) observaron que al bloquear la señalización de TGF β en un tumor primario de mama, las células eran capaces de invadir solamente los vasos linfáticos y no los vasos sanguíneos. Además, estos datos están en consonancia con el hecho de que el tratamiento de células H157 con TGF β apenas afectó el aumento en la expresión de los receptores de citoquinas CXCR4 y CCR7, receptores de factores quimiotácticos expresados por el endotelio linfático. Otra explicación plausible sería que las cuatro semanas de duración del ensayo constituyen un tiempo demasiado extenso para observar diferencias entre los grupos. De hecho, el porcentaje de ganglios afectados es muy elevado en todos ellos (80% en el grupo control).

Aquellos tumores en los que se había silenciado la expresión de la integrina $\beta 3$ dieron lugar a una incidencia menor de metástasis en ganglios linfáticos (57% respecto al 80% del grupo control) únicamente si las células no habían sido pretratadas con TGF β . De nuevo aquí surge la idea de una mayor malignidad y complejidad de mecanismos migratorios en las células pretratadas con TGF β , de forma que migran de una manera independiente de la integrina $\beta 3$. Esto no es de extrañar, ya que como observamos en el análisis transcriptómico, se induce la expresión de otras integrinas y proteínas que intervienen en la migración, como las integrinas $\alpha v \beta 5$ y $\alpha 4 \beta 1$ (Hosotani *et al.*, 2002), y las proteínas de la matriz: colágenos, laminina, fibronectina (Kopfstein y Christofori, 2006), CTGF (Chen *et al.*, 2012), TNC (Dornhöfer *et al.*, 2006) y VCAN (Zhuang *et al.*, 2010), que podrían ejercer un mecanismo compensatorio y ser protagonistas del proceso metastásico. La integrina $\beta 3$ se ha asociado con la metástasis de carcinomas de diversos órganos. Así, se ha observado en cáncer de mama cómo la sobreexpresión de la integrina $\alpha v \beta 3$ está asociada con la aparición de metástasis en hueso (Marchán *et al.*, 2010). Además, Hosotani y colaboradores (Takayama *et al.*, 2005) demostraron que en cáncer pancreático el aumento en la expresión de la integrina $\alpha v \beta 3$ se asocia con un incremento en la activación de la MMP2 y de la metástasis a ganglios linfáticos.

Por último, los resultados obtenidos a partir de los ratones tratados con los péptidos nos han parecido muy interesantes como apoyo a una propuesta de terapia combinada.

Observamos que el tratamiento de los animales con el péptido p17, en coherencia con los datos obtenidos al analizar el crecimiento tumoral, produjo un efecto moderado en lo referente al bloqueo de la aparición de metástasis, disminuyeron en torno a un 20% respecto al grupo control. En el resto de los grupos no observamos ningún efecto. En cambio, el tratamiento con p144 bloqueó la aparición de metástasis ganglionares muy significativamente en aquellos ratones a los que se inyectaron células tumorales sin pretratar con TGF β (60% menos que en las células control), aunque mostró no ser eficaz en la mayoría de los ratones con tumores procedentes de células H157 tratadas con TGF β , en sintonía con resultados anteriores.

Estos datos abren dos líneas de estudio: en primer lugar se observa de nuevo que los tumores procedentes de las células pretratadas con TGF β son refractarias a los efectos de la inhibición de la citoquina endógena, mientras que los procedentes de células no tratadas si lo son. Como en la comparación transcriptómica restringida a genes relacionados con la adhesión observamos diferencias muy significativas en la expresión de varios genes, sería interesante como posibilidad de futuro, estudiar si este perfil de expresión puede determinar qué pacientes responderán más o menos a terapias dirigidas a bloquear TGF β o su señalización. En segundo lugar, ya que observamos que mientras que el bloqueo de TGF β o de la integrina β 3 no resultan eficaces en la aparición de metástasis en aquellos tumores que han sido pretratados TGF β , su combinación sí que lo es, lo cual abre perspectivas muy interesantes para plantear terapias combinadas. El tratamiento con p144 redujo la incidencia de metástasis ganglionares en aquellos ratones a los que se implantaron células que no expresaban la integrina β 3 pero que fueron pretratadas con TGF β . Por lo tanto, podemos postular que la integrina β 3 puede ser una molécula de adhesión de estadios tempranos, que facilita la supervivencia. Cuando la célula progresa hacia estadios más agresivos debido a la recepción de señales promotoras de la progresión tumoral desde el estroma, se induce la expresión de una batería de moléculas de adhesión más complejas que complementan y hacen dispensable la presencia de la integrina β 3. Por tanto, sería necesario dirigir la terapia tanto frente a la molécula de adhesión primaria, como hacia aquellas moléculas o señales causantes del cambio fenotípico, en este caso la citoquina TGF β , para obtener resultados más eficaces a nivel terapéutico.

4. La vía de señalización del TGF β como diana terapéutica frente al cáncer

En las últimas décadas se ha demostrado ampliamente la función dual del TGF β en la carcinogénesis, y cómo en estadios avanzados del cáncer actúa como factor oncogénico, induciendo la proliferación, la angiogénesis, la invasión y la metástasis, además de inhibir la respuesta inmunológica anti-tumoral. A partir de los avances logrados en este campo, el bloqueo de la señalización mediada por el TGF β ha despertado un gran interés en la comunidad científica por ser una posible diana terapéutica frente al cáncer. Por ejemplo, se ha descrito que la proteína inhibitoria de la vía de señalización del TGF β , Smad 7, bloquea el mecanismo de transición epitelio-mesénquima activado por la citoquina y, en consecuencia, también la metástasis a pulmón e hígado de células de cáncer de mama en modelos singénicos de ratón (Pirinen *et al*, 2005). Sin embargo, la función del TGF β en la homeostasis tisular indica que el bloqueo de esta señalización puede también inducir algún tipo de toxicidad no deseada. De hecho, en ratones que no expresan algunos de los genes de los componentes de la vía de señalización del TGF β , o en personas que padecen los síndromes de Marfan y de Loeys-Dietzel, en que los receptores T β RI o T β RII contienen mutaciones, presentan incrementos en la vascularización y aneurismas (Miyazono *et al*, 2012). Esto enfatiza la necesidad de estudiar cuidadosamente la biología del TGF β , a fin de seleccionar una estrategia apropiada para inhibir la señalización de la citoquina, definir el perfil adecuado de los pacientes receptores, y diseñar protocolos terapéuticos óptimos.

Diversas empresas han desarrollado compuestos inhibitorios de la señalización de TGF β basados en distintas estrategias (Fig. D1). Una de ellas consiste en secuestrar el ligando y evitar que éste se una a su receptor. Para ello se pueden utilizar diversas estrategias: utilización de los ligandos *trap*, que son proteínas solubles con ectodominios de los receptores T β RII y T β RIII, o anticuerpos bloqueantes, pequeñas moléculas, aptámeros, o péptidos que se unen específicamente a los ligandos. También se han desarrollado inhibidores de las quinasas de T β RII y T β RI para bloquear la activación de los receptores. Otra estrategia se basa en la interrupción de la traducción del mRNA de TGF β mediante oligonucleótidos (ASOs), impidiendo la producción del ligando. Además, otros compuestos empleados en la terapia dirigida al TGF β , inhiben la transformación de la forma latente a la forma activa de la citoquina (Seoane, 2008).

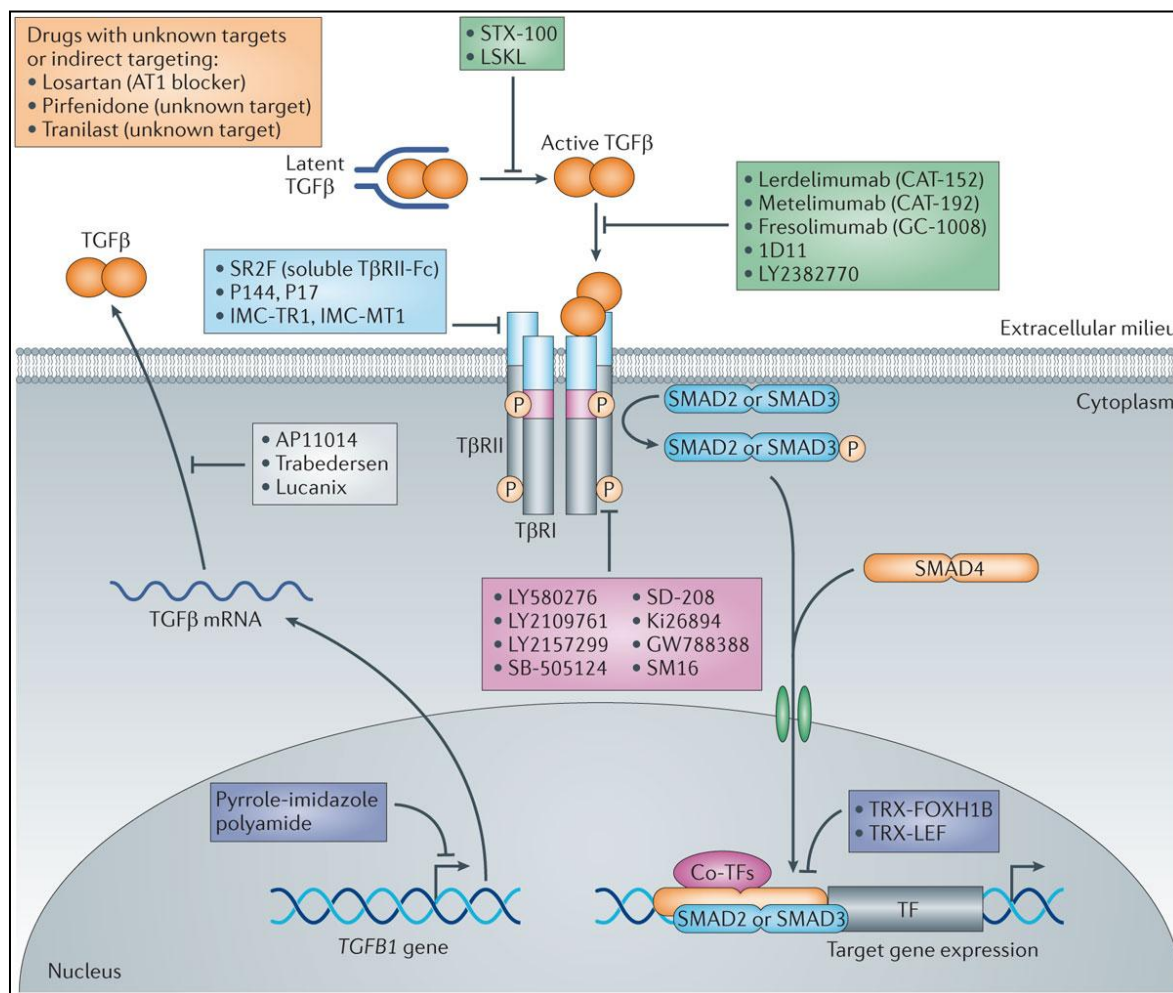


Figura D1. Representación esquemática de las moléculas actualmente utilizadas en aproximaciones terapéuticas. Obtenida de (Akhurst y Hata, 2012)

A pesar de que en modelos de ratón la inhibición de la señalización de TGFβ conlleva a una significativa reducción en la metástasis, los resultados en la clínica han sido menos esperanzadores, ya que no parece que se inhiba de modo significativo el crecimiento del tumor primario (Akhurst y Hata, 2012). En nuestro caso, tal como hemos visto, la inhibición conjunta de la síntesis de TGFβ producido por las células del estroma, y de la expresión de integrinas en la célula tumoral, resultó una combinación positiva. Este hecho sugiere que una terapia combinada puede aumentar la eficacia de los inhibidores de TGFβ en un contexto clínico. Así, se ha visto que el bloqueo del TGFβ por inhibidores es capaz de hacer el tumor más sensible a la radiación o a agentes citotóxicos como son la Rapamicina y la Doxorubicina (Seoane, 2008). Por todo lo comentado, a pesar de los riesgos que conlleva la inhibición de una molécula tan importante en las funciones fisiológicas normales como es

el TGFβ, actualmente hay diversos ensayos clínicos que utilizan inhibidores específicos de esta citoquina (Tabla D1), y que pueden abrir nuevas perspectivas para lograr tratamientos más eficaces contra el cáncer.

Tabla D1. Inhibidores de TGFβ en ensayos clínicos en pacientes con cáncer.

Nombre del inhibidor y empresa fabricante	Tipo	Diana	Enfermedad aplicable	Estadio	Identificador del ensayo clínico	Resultados parciales
Trabedersen (AP12009); Antisense Pharma	Oligo antisentido	Ligando TGFβ2	Cáncer de páncreas, colon y melanoma	Fase I	NCT00844064	Ensayos clínicos en curso
Belagenpumatucel-L (Lucanix); NovaRx	Vacuna terapéutica alogénica antisentido modificada genéticamente	TGFβ2	NSCLC	Fase III	NCT00676507	Bien tolerado en 75 pacientes. Mejoras en la supervivencia. Otros ensayos clínicos en curso
LY2157299; Eli Lilly	Molécula pequeña	Quinasa TβRI	Melanoma, glioblastoma, carcinoma hepatocelular y carcinoma pancreático	Fase II	NCT10038320 NCT01582269 NCT01220271 NCT01246986 NCT01373164	Ensayos clínicos en curso. También utilizado en terapias combinadas con radioterapia y quimioterapia (Iomustine, temozolomida, gemcitabina)
IMC-TR1; ImClone Systems/Eli Lilly	Anticuerpo humanizado	TβRII	Cáncer de colon y de mama	Fase I	NCT01646203	Ensayos clínicos en curso

5. Crítica al modelo experimental utilizado

En este trabajo se estableció un modelo experimental de implantación ortotópica de células de carcinoma escamoso de pulmón en ratones *nude*, para estudiar la función del TGFβ y la integrina β3 en el desarrollo tumoral y en la metástasis a los ganglios linfáticos regionales, axilares y braquiales. La elección del modelo animal es un paso fundamental para aproximarse a los objetivos del estudio. Existe la tendencia a valorar el modelo animal según la similitud entre la enfermedad animal y la humana, aunque debido a la complejidad del cáncer en pacientes, es muy difícil modelarlo con un único sistema (Connolly *et al*, 2012). Por esta razón, es importante conocer las ventajas y las desventajas de cada modelo, y así, poder elegir el más apropiado para estudiar los problemas y las cuestiones puntuales.

En nuestro caso, en primer lugar elegimos que nuestro modelo animal fuera de xenotransplantes, y no un modelo singénico de ratón, para así, poder seguir utilizando la misma línea tumoral de NSCLC H157 y poder dar continuidad a los resultados obtenidos *in vitro*. Sin embargo, hay que tener muy claras las limitaciones que conlleva esta aproximación. En los modelos de xenotransplantes el tumor es mixto, un mosaico de células tumorales humanas, mezclado con células del estroma murino. En esos casos, algunas vías de señalización son especie-específicas y no se pueden tener en consideración en el desarrollo tumoral experimental. Además, no es posible estudiar la respuesta inmunológica frente al tumor porque los animales deben ser inmunodeprimidos para no rechazar la presencia de células de otra especie en su organismo. Según la severidad de la inmunodeficiencia del animal, también hay diferencias en la interpretación del resultado. Los ratones *nude*, por ejemplo, son atímicos, deficientes en linfocitos T, presentan una disfunción de las células B, y además se ha descrito que tienen una angiogénesis alterada (Khanna y Hunter, 2005). En nuestro caso, puesto que no íbamos a centrarnos en analizar la respuesta inmunológica del animal ni tampoco en la angiogénesis, decidimos que estos ratones eran adecuados para nuestros intereses. También hay estudios que demuestran que los ratones SCID (inmunodeficiencia severa combinada), carentes de células T y B, mantienen una alta actividad de células NK, y un fallo en la mutación SCID asociado a la edad que permiten una respuesta inmunológica del animal para eliminar las células metastásicas, imposibilitando en determinadas circunstancias el estudio del cáncer (Takizawa, 1997).

En segundo lugar, como el principal objetivo de nuestro trabajo era analizar la participación del TGF β y de la integrina β 3 en la metástasis de tumores de pulmón de células H157 a los ganglios linfáticos, optamos por un modelo de metástasis espontáneo a partir de un tumor ortotópico. Los tumores ortotópicos de modo general aumentan la posibilidad de múltiples metástasis y la dispersión del cáncer a partir de un tumor primario localizado en el ambiente de origen. Esta aproximación en el animal se asemeja más a las condiciones reales de un determinado tipo de cáncer en pacientes. Además, para seguir todas las etapas del proceso de metástasis se puede extraer quirúrgicamente el tumor primario en estadios más avanzados, prolongando así la supervivencia del animal necesaria para la formación de tumores secundarios en otros órganos. El proceso de metástasis también se puede monitorizar utilizando líneas celulares tumorales que expresan marcadores moleculares, como por ejemplo luciferasa (Khanna y Hunter, 2005).

El diseño experimental se realizó a partir de los trabajos previos realizados por el grupo de Doki y colaboradores (Doki *et al*, 1999; Yamaura *et al*, 2000) y Onn y colaboradores (Onn *et al*., 2003). En estas publicaciones, utilizando distintas líneas celulares de cáncer de pulmón, los autores describen la metástasis a ganglios linfáticos mediastinos y a los lóbulos pulmonares contralaterales al tumor primario. Estos estudios adolecen una buena explicación de la metodología utilizada en cuanto a la detección de metástasis a ganglios linfáticos. Por ejemplo, en el trabajo de Doki y colaboradores, detectan macroscópicamente las células tumorales comparando los pesos de los ganglios o mediante el estudio de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. Estos dos métodos de detección de células tumorales en ganglios linfáticos no son del todo convincentes ya que, como se ha discutido anteriormente, la presencia del tumor promueve linfangiogénesis y aumenta el flujo de linfa en los ganglios linfáticos regionales, promoviendo la formación de acúmulos locales de linfa. A pesar de que la presencia de acúmulo de linfa es un indicativo de la presencia de células tumorales en gran parte de los casos, otras veces este fenómeno ocurre antes de la llegada de las células neoplásicas al ganglio. En nuestro caso, aquellos animales en los cuales se habían inyectado células H157 tratadas con TGF β , prácticamente no presentaron acúmulo de linfa (0,1%), y curiosamente el tratamiento con los péptidos, principalmente el p17, favoreció la aparición de acúmulo de linfa en los ganglios de los ratones con tumores de células H157, independientemente del tratamiento previo con TGF β . Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que el TGF β es un potente inhibidor de la proliferación de las células endoteliales, y la inhibición sistémica de los efectos del TGF β favorece la linfangiogénesis (Yan *et al*, 2011), aunque en nuestro caso analizamos el número de vasos peri e intratumorales en los diferentes grupos y no observamos diferencias. Además, creemos que la tinción con hematoxilina-eosina no es la metodología más adecuada para identificar células tumorales, ya que en los ganglios, la tinción con hematoxilina no siempre es homogénea debido a la heterogeneidad de sus poblaciones celulares.

Por otra parte, Onn y colaboradores (Onn *et al*, 2003) utilizaron líneas celulares de carcinomas de pulmón transfectadas con un vector de expresión estable de GFP. Describen la detección las células tumorales mediante un estereomicroscopio de fluorescencia, si bien no muestran ningún ganglio con células tumorales verdes, solamente un nódulo tumoral en el pulmón. Al igual que otros autores, en nuestro trabajo también utilizamos células H157 con expresión estable de GFP, y observamos los pulmones y los ganglios a través de microscopía de fluorescencia. Sin embargo, debido a la autofluorescencia basal de los ganglios, no fue

posible diferenciar células tumorales dentro de éstos. También se intentó observar la progresión tumoral *in vivo* utilizando un aparato de bioluminiscencia/fluorescencia, pero los resultados no eran suficientemente consistentes para su cuantificación. Puesto que no obtuvimos los resultados esperados, se optó por detección mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo frente a la proteína GFP. Este enfoque metodológico proporcionó una idea bastante aproximada de la proporción de células tumorales que se encontraron en el ganglio al momento del sacrificio de los animales. Sin embargo, esta técnica fue en cierto punto limitante porque solamente aportó los datos de un único momento de la progresión tumoral: momento del sacrificio o muerte espontánea del animal. Por todas estas razones, nos parece más apropiado que en posteriores experimentos se desarrollen células que expresen establemente un marcador bioluminiscente, como por ejemplo la luciferasa, para poder seguir de modo continuado la llegada de células al ganglio sin sacrificar al animal (Jiang *et al*, 2012).

Otro aspecto que debería ser modificado en el modelo experimental de este trabajo es la secuencia del shRNA scramble. Considerando los resultados obtenidos *in vivo* con las células transfectadas con el shRNA de secuencia aleatoria (scramble), es sorprendente el comportamiento de estas células, pues ofrecían respuestas variables: unas veces actuaban como células control, como en el caso de la metástasis a ganglios linfáticos, y otras veces se comportaban de forma similar a las células deficientes en la expresión de la integrina $\beta 3$, como por ejemplo, en el tamaño tumoral. Esto nos indica una posible unión a secuencias diana inespecíficas que pueden haber afectado el comportamiento de las células shRNA scramble.

Por esa razón, con el objetivo de analizar posibles homologías parciales que puedan estar interfiriendo en la expresión normal de proteínas, se comparó la secuencia del ShRNA de secuencia aleatoria, con la base de datos de microRNAs (MiRBase, -Kozomara y Griffiths, 2011- University of Manchester, Reino Unido). Los resultados obtenidos en la base de datos (Fig. D2) indican que la secuencia del ShRNA scramble es parcialmente homóloga con tres microRNAs. Sin embargo, al analizar la secuencia del ShRNA $\beta 3$ (nº ref. TI348322: 5'GTGACGACTTCTCCTGTGTCCGCTACAAG 3', Origene Technologies, Rockville, MD, EE.UU.), no se encontró ninguna homología con microRNAs. Por lo tanto, las células con la integrina $\beta 3$ silenciada no sufren el riesgo de un supuesto bloqueo inespecífico mediado por el shRNA $\beta 3$.

A continuación, se utilizó otro programa de análisis de microRNAs, *DIANA-microT-CDS v.5.0* (Atenas, Grecia), para conocer los genes diana descritos para cada microRNA en cuestión. Los resultados pueden ser consultados en su página web (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/micro-CDS/>). Cada microRNA tienen alrededor de 850 genes diana con su correspondiente mirSVR (método de regresión lineal que indica la probabilidad del gen de ser diana del microRNA). En el apartado ANEXOS (págs. 167-170), presentamos una lista de los mRNA más importantes con mayor afinidad por estos microRNAs, como por ejemplo, el gen precursor de la interleuquina 13 (IL13), el gen del receptor de la proteína morfogénica del hueso tipo II (BMP2), el gen precursor del factor de crecimiento insulínico tipo 1A (IGF1A), y el gen que codifica la proteína de señalización de la familia de TGFβ, Smad 5, lo cual nos pareció relevante. De estos resultados concluimos que a pesar de que el shRNA scramble haya sido testado por la casa comercial, es mejor elegir una secuencia que no tenga ningún tipo de homología con el genoma. En nuestro caso, aunque los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* ofrecieron garantías de ser una buena secuencia control, al realizar los experimentos *in vivo* no fue así.

Accession	ID	Query start	Query end	Subject start	Subject end	Strand	Score	Evalue	Alignment
MIMAT0005950	hsa-miR-1306-3p	2	17	3	18	-	62	4.3	Align
MIMAT0018951	hsa-miR-4435	7	22	5	20	+	62	4.3	Align
MIMAT0018939	hsa-miR-4424	9	29	1	21	+	60	6.3	Align

Alignment of Query to mature miRNAs

Query: 2-17	hsa-miR-1306-3p : 3-18	score: 62	evaluate: 4.3
UserSeq	17 cacuaccagagcuaac	2	
hsa-miR-1306-3p	3 caccaccagagccaac	18	
Query: 7-22	hsa-miR-4435 : 5-20	score: 62	evaluate: 4.3
UserSeq	7 ccagagcuaacucaga	22	
hsa-miR-4435	5 ccagagcucacacaga	20	
Query: 9-29	hsa-miR-4424 : 1-21	score: 60	evaluate: 6.3
UserSeq	9 agagcuaacucagauaguacu	29	
hsa-miR-4424	1 agaguuaacuaaaauggacu	21	

Figura D2. Comparación de la secuencia de shRNA scramble con la base de datos de microRNAs MiRBase, (Kozomara y Griffiths, 2011).

Otro resultado interesante que merece la pena ser discutido es la dificultad que se presentó en la cicatrización de heridas en los ratones tratados con los péptidos inhibidores de TGF β . Solamente el 58% de los ratones que recibieron el péptido p17 y el 46% de los ratones tratados con p144 presentaban la herida curada una semana tras la operación, mientras que el 97% de los ratones no tratados con péptidos habían cicatrizado correctamente. Este fenómeno es muy interesante porque indica que los péptidos están inhibiendo la función del TGF β en los procesos de fibrinogénesis del tejido del ratón. De hecho se ha descrito en un modelo de ratón de esclerodermia como el tratamiento con p144 disminuyó significativamente la fibrosis en la piel afectada de los ratones (Francia *et al*, 2011). Además, la diferencia observada entre los péptidos se justifica porque el p144 al ser prácticamente insoluble y tener una vida media más larga que el p17, puede tener un efecto más duradero y acentuado (Santiago *et al*, 2005). Por estos motivos, en futuros ensayos en los que se utilicen los péptidos inhibidores de TGF β , esperaremos 24 h desde la implantación ortotópica antes de administrar de la primera dosis de péptido para permitir la cicatrización interna.

Por último, para completar los resultados obtenidos en este trabajo, sería interesante añadir un grupo de ratones a los que se implantasen tumores de células transfectadas con el shRNA β 3 y sin tratar con TGF β , y administrarle los péptidos inhibidores de la citoquina. De esta manera demostraríamos si el bloqueo conjunto de la expresión de la integrina β 3 y del TGF β endógeno, podría también resultar en un modelo interesante para una posible terapia frente al cáncer escamoso de pulmón humano.

CONCLUSIONES

1- El tratamiento *in vitro* de células de carcinoma escamoso de pulmón H157 con TGF β induce cambios genéticos y funcionales que parecen indicar un fenotipo más agresivo, es decir, provoca incrementos en la adhesión a fibronectina y vitronectina; genera aumentos en la actividad metaloproteasa; aumenta la migración hacia suero; favorece el crecimiento independiente de anclaje; incrementa la adhesión a monocapas de endotelio linfático; e induce la expresión de genes codificantes para metaloproteasas, proteínas de la matriz extracelular e integrinas.

2- De entre las integrinas analizadas, la integrina $\beta 3$ desarrolla una importante función en la migración de las células de carcinoma escamoso de pulmón H157 tratadas con TGF β , ya que su bloqueo restaura la migración de las células hacia factores quimiotácticos a los niveles más bajos obtenidos en ausencia de esta citoquina.

3- Las células de carcinoma de pulmón H157 tratadas con TGF β atraviesan en mayor medida monocapas de endotelio linfático. Además, alteran el tipo de deslizamiento sobre este endotelio pasando de tipo ameboide a tipo mesenquimal, este último ligado a la unión dependiente de integrinas. Estos incrementos se previenen si los experimentos se realizan en presencia de péptidos inhibidores de TGF β o si se silencia la expresión de la integrina $\beta 3$ en las células tumorales.

4- Los ligandos de integrina $\beta 3$, las proteínas L1CAM y CD31/PECAM-1, participan también en la transmigración de las células tumorales a través del endotelio linfático ya que su bloqueo disminuyó significativamente este proceso. Este bloqueo no fue eficaz en células en las que se silenció la expresión de la integrina $\beta 3$.

5- El estudio de las consecuencias del tratamiento con TGF β en un modelo ortotópico de carcinoma pulmonar en ratones *nude* demostró que:

- a) El pretratamiento de las células tumorales con TGF β origina tumores de mayor tamaño que los procedentes de células no tratadas.

b) El tratamiento sistémico con el péptido inhibidor de TGF β p144 mejora en gran medida la supervivencia en los ratones, mientras que el péptido p17 produce sólo un beneficio moderado.

c) El silenciamiento de la expresión de la integrina β 3 origina tumores significativamente más pequeños y mejora la supervivencia, resaltando la importancia de la adhesión al estroma para el crecimiento del tumor primario.

d) En cuanto a la incidencia de metástasis ganglionares: el pretratamiento con TGF β *per se* no incrementó la incidencia de metástasis, mientras que el bloqueo del TGF β endógeno mediante tratamiento con péptido p144 lo hizo de manera considerable. El péptido p17 también disminuyó la metástasis de las células inoculadas no pretratadas con TGF β .

e) En aquellos ratones a los que se les inocularon células de carcinoma escamoso previamente tratadas con TGF β , sólo se consiguió disminuir la incidencia de metástasis ganglionares en aquellas poblaciones en las que se silenció la expresión de la integrina β 3 y además se trataron sistémicamente con péptido p144. Esto indica la necesidad de bloquear tanto las señales procedentes del estroma como las capacidades adquiridas tras la exposición continuada a TGF β .

6- Por tanto, es interesante determinar si los tumores han adquirido competencias funcionales que los hacen refractarios a una monoterapia frente a TGF β , y si es el caso, se debería plantear una terapia dirigida a bloquear tanto la adhesión de las células tumorales como la recepción de señales pro-metastásicas procedentes del TGF β .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaboe, M., Offersen, B., Christensen, A., y Andreasen, P. (2003). Vitronectin in human breast carcinomas. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1638(1), 72-82
- Akhurst, R., y Hata, A. (2012). Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nature Reviews.Drug Discovery*, 11(10), 790-811. doi: 10.1038/nrd3810
- Al Azayzih, A., Gao, F., Goc, A., y Somanath, P. (2012). TGF β -1 induces apoptosis in invasive prostate cancer and bladder cancer cells via akt-independent, p38 MAPK and JNK/SAPK-mediated activation of caspases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 427(1), 165-170. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.035
- Albert,Jeffrey; Cao,Carolyn; Geng,Ling; Leavitt,Lauren; Hallahan,Dennis; y Lu,Bo. Integrin alpha v beta 3 antagonist Cilengitide enhances efficacy of radiotherapy in endothelial cell and non-small-cell lung cancer models. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, 2006, 65, 5, 1536-1543, Elsevier
- Alitalo, K. (2011). The lymphatic vasculature in disease. *Nature Medicine*, 17(11), 1371-1380. doi: 10.1038/nm.2545
- Arsura, M., Panta, G., Bilyeu, J., Cavin, L., Sovak, M., Oliver, A., y Sonenshein, G. (2003). Transient activation of NF-kappaB through a TAK1/IKK kinase pathway by TGF-beta1 inhibits AP-1/SMAD signaling and apoptosis: Implications in liver tumor formation. *Oncogene*, 22(3), 412-425. doi: 10.1038/sj.onc.1206132
- Arvelo, F., y Poupon, M. F. (2001). Molecular and cell aspects of the cancer metastasis. *Acta Científica Venezolana*, 52(4), 304-312
- Avraamides, C., Garmy Susini, B., y Varner, J. (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews.Cancer*, 8(8), 604-617. doi: 10.1038/nrc2353
- Baltanás, A., Miguel Carrasco, J., San-José, G., Cebrián, C., Dotor, J., Moreno, M. U., y Zalba, G. (2013). A synthetic peptide from Transforming Growth Factor - β 1 type III receptor inhibits NADPH oxidase and prevents oxidative stress in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *Antioxidants Redox Signalling*, doi: 10.1089/ars.2012.4653
- Baluk, P., Fuxe, J., Hashizume, H., Romano, T., Lashnits, E., Butz, S., y McDonald, D. (2007). Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic

- vessels. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(10), 2349-2362. doi: 10.1084/jem.20062596
- Banerji, S., Ni, J., Wang, S. X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R., y Jackson, D. G. (1999). LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *The Journal of Cell Biology*, 144(4), 789-801. doi: 10.1083/jcb.144.4.789
- Barczyk, M., Carracedo, S., y Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and Tissue Research*, 339(1), 269-280. doi: 10.1007/s00441-009-0834-6
- Bergert, M., Chandradoss, S., Desai, R., y Paluch, E. (2012). Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(36), 14434-14439. doi: 10.1073/pnas.1207968109
- Bertolino, P., Deckers, M., Lebrin, F., y ten Dijke, P. (2005). Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest*, 128(6 Suppl), 585S-590S. doi: 10.1378/chest.128.6_suppl.585S
- Bhowmick, N. A., Zent, R., Ghiassi, M., McDonnell, M., y Moses, H. L. (2001). Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 46707-46713. doi: 10.1074/jbc.M106176200
- Bilandzic, M., y Stenvers, K. (2011). Betaglycan: A multifunctional accessory. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 339(1-2), 180-189. doi: 10.1016/j.mce.2011.04.014
- Biswas, S., Guix, M., Rinehart, C., Dugger, T., Chytil, A., Moses, y H., Arteaga, C. (2007). Inhibition of TGF-beta with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1305-1313. doi: 10.1172/JCI30740
- Breiteneder Geleff, S., Soleiman, A., Kowalski, H., Horvat, R., Amann, G., Kriehuber, E., y Kerjaschki, D. (1999). Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: Podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium.

- The American Journal of Pathology*, 154(2), 385-394. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65285-6
- Buscemi, L., Ramonet, D., Klingberg, F., Formey, A., Smith Clerc, J., Meister, J., y Hinz, B. (2011). The single-molecule mechanics of the latent TGF β 1 complex. *Current Biology*, 21(24), 2046-2054. doi: 10.1016/j.cub.2011.11.037
- Cai, Q., Lin, T., Kamarajugadda, S., y Lu, J. (2012). Regulation of glycolysis and the warburg effect by estrogen-related receptors. *Oncogene*, doi: 10.1038/onc.2012.221
- Carman, C. V., y Springer, T. A. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *The Journal of Cell Biology*, 167(2), 377-388. doi: 10.1083/jcb.200404129
- Chen, J., Alexander, J. S., y Orr, A. W. (2012). Integrins and their extracellular matrix ligands in lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 853703-853703. doi: 10.1155/2012/853703
- Chiang, C., Tsai, C., Chou, T., Chen, Y., Lai, S., Shih, J., y Lee, Y. (2013). Erlotinib in patients with advanced lung squamous cell carcinoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71(1), 203-208. doi: 10.1007/s00280-012-1997-5
- Connolly, E., Freimuth, J., y Akhurst, R. (2012). Complexities of TGF β targeted cancer therapy. *International Journal of Biological Sciences*, 8(7), 964-978. doi: 10.7150/ijbs.4564
- Coronato, S., Laguens, G., y Di Girolamo, V. (2012). Role of metalloproteinases and their inhibitors in tumors. *Medicina*, 72(6), 495-502
- Cunningham, H., Shannon, L., Calloway, P., Fassold, B., Dunwiddie, I., Vielhauer, G., y Vines, C. (2010). Expression of the C-C chemokine receptor 7 mediates metastasis of breast cancer to the lymph nodes in mice. *Translational Oncology*, 3(6), 354-361
- Dejana, E., Tournier Lasserre, E., y Weinstein, B. (2009). The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: Molecular basis and pathological implications. *Developmental Cell*, 16(2), 209-221. doi: 10.1016/j.devcel.2009.01.004

- Desgrosellier, J., Barnes, L., Shields, D., Huang, M., Lau, S., Prévost, N., y Cheresh, D. (2009). An integrin alpha(v)beta(3)-c-src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nature Medicine*, *15*(10), 1163-1169. doi: 10.1038/nm.2009
- Desgrosellier, J., y Cheresh, D. (2010). Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews.Cancer*, *10*(1), 9-22. doi: 10.1038/nrc2748
- Detterbeck, F., Boffa, D., y Tanoue, L. (2009). The new lung cancer staging system. *Chest*, *136*(1), 260-271. doi: 10.1378/chest.08-0978
- Díaz-Valdés, N., Basagoiti, M., Dotor, J., Aranda, F., Monreal, I., Riezu Boj, J., Feijóo, E. (2011). Induction of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-10 by TGFbeta1 in melanoma enhances tumor infiltration and immunosuppression. *Cancer Research*, *71*(3), 812-821. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2698
- Doki, Y., Murakami, K., Yamaura, T., Sugiyama, S., Misaki, T., y Saiki, I. (1999). Mediastinal lymph node metastasis model by orthotopic intrapulmonary implantation of lewis lung carcinoma cells in mice. *British Journal of Cancer*, *79*(7-8), 1121-1126. doi: 10.1038/sj.bjc.6690178
- Dornhöfer, N., Spong, S., Bennewith, K., Salim, A., Klaus, S., Kambham, N., y Giaccia, A. (2006). Connective tissue growth factor-specific monoclonal antibody therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Research*, *66*(11), 5816-5827. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0081
- Dotor, J., López-Vázquez, A. B., Lasarte, J. J., Sarobe, P., García-Granero, M., Riezu-Boj, J. I., Borrás-Cuesta, F. (2007). Identification of peptide inhibitors of transforming growth factor beta 1 using a phage-displayed peptide library. *Cytokine*, *39*(2), 106-115. doi: 10.1016/j.cyto.2007.06.004
- Doyle, J. J., Gerber, E. E., y Dietz, H. C. (2012). Matrix-dependent perturbation of TGFβ signaling and disease. *FEBS Letters*, *586*(14), 2003-2015. doi: 10.1016/j.febslet.2012.05.027

- Elliott, R., y Blobe, G. (2005). Role of transforming growth factor beta in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(9), 2078-2093. doi: 10.1200/JCO.2005.02.047
- Ezquerro, I., Lasarte, J., Dotor, J., Castilla-Cortázar, I., Bustos, M., Peñuelas, I., Borrás-Cuesta, F. (2003). A synthetic peptide from transforming growth factor beta type III receptor inhibits liver fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride liver injury. *Cytokine*, 22(1-2), 12-20. doi: 10.1016/S1043-4666(03)00101-7
- Farnsworth, R., Achen, M., y Stacker, S. (2006). Lymphatic endothelium: An important interactive surface for malignant cells. *Pulmonary Pharmacology Therapeutics*, 19(1), 51-60. doi: 10.1016/j.pupt.2005.02.003
- Francia, G., Cruz Munoz, W., Man, S., Xu, P., y Kerbel, R. (2011). Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nature Reviews.Cancer*, 11(2), 135-141. doi: 10.1038/nrc3001
- Franco, D. L., Mainez, J., Vega, S., Sancho, P., Murillo, M., de Frutos ,C.; Del Castillo, G., López C. B., Fabregat, I. y Nieto, M. A. Snail1 suppresses TGF-beta-induced apoptosis and is sufficient to trigger EMT in hepatocytes. *J.Cell.Sci.*, 2010, 123, 20, 3467-3477, Co. of Biologists, Cambridge, U.K
- Franco, O., Jiang, M., Strand, D., Peacock, J., Fernandez, S., Jackson, R., Hayward, S. (2011). Altered TGF β signaling in a subpopulation of human stromal cells promotes prostatic carcinogenesis. *Cancer Research*, 71(4), 1272-1281. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3142
- Friedl, P., y Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: A multiscale tuning model. *The Journal of Cell Biology*, 188(1), 11-19. doi: 10.1083/jcb.200909003
- Friedl, P., y Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews.Cancer*, 3(5), 362-374. doi: 10.1038/nrc1075
- Galliher, A. J., y Schiemann, W. P. (2007). Src phosphorylates Tyr284 in TGF β type II receptor and regulates TGF β stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Research*, 67(8), 3752-3758. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3851

- Gallier, A., Neil, J., y Schiemann, W. (2006). Role of transforming growth factor-beta in cancer progression. *Future Oncology*, 2(6), 743-763. doi: 10.2217/14796694.2.6.743
- Gálvez-Gastlum, F., Sandoval-Rodríguez, A., y Armendriz-Borunda, J. (2004). Transforming growth factor-beta as a therapeutic target. *Salud Pública De México*, 46(4), 341-350. doi: 10.1590/S0036-36342004000400009
- Ghislin, S., Obino, D., Middendorp, S., Boggetto, N., Alcaide L.C., y Deshayes, F. (2012). LFA-1 and ICAM-1 expression induced during melanoma-endothelial cell co-culture favors the transendothelial migration of melanoma cell lines in vitro. *BMC Cancer*, 12, 455-455, BioMed Central
- Giampieri, S., Manning, C., Hooper, S., Jones, L., Hill, C., y Sahai, E. (2009). Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nature Cell Biology*, 11(11), 1287-1296. doi: 10.1038/ncb1973
- Giampieri, S., Pinner, S., y Sahai, E. (2010). Intravital imaging illuminates transforming growth factor beta signaling switches during metastasis. *Cancer Research*, 70(9), 3435-3439. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0466
- Gold, K., Wistuba, I., y Kim, E. (2012). New strategies in squamous cell carcinoma of the lung: Identification of tumor drivers to personalize therapy. *Clinical Cancer Research*, 18(11), 3002-3007. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2055
- Goldschmidt, R. C., y Kimelberg, H. K. (1989). Protein analysis of mammalian cells in monolayer culture using the bicinchoninic assay. *Analytical Biochemistry*, 177(1), 41-45. doi: 10.1016/0003-2697(89)90010-9
- González, L. O., Corte, M. D., Vázquez, J., Junquera, S., Sánchez, R., Viña, A., Vizoso, F. (2008). Study of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in ductal in situ carcinomas of the breast. *Histopathology*, 53(4), 403-415. doi: 10.1111/j.1365-2559.2008.03136.x
- González-Arriaga, P., Pascual, T., García-Alvarez, A., Fernández-Somoano, A., López Cima, M., y Tardón, A. (2012). Genetic polymorphisms in MMP 2, 9 and 3 genes modify lung cancer risk and survival. *BMC Cancer*, 12, 121-121. doi: 10.1186/1471-2407-12-121

- Goodman, S., y Picard, M. (2012). Integrins as therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences*, doi: 10.1016/j.tips.2012.04.002
- Goumans, M., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P., y ten Dijke, P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO Journal*, 21(7), 1743-1753. doi: 10.1093/emboj/21.7.1743
- Gruber, G., Hess, J., Stiefel, C., Aebersold, D. M., Zimmer, Y., Greiner, R. H., y Djonov, V. (2005). Correlation between the tumoral expression of beta3-integrin and outcome in cervical cancer patients who had undergone radiotherapy. *British Journal of Cancer*, 92(1), 41-46. doi: 10.1038/sj.bjc.6602278
- Guadamillas, M., Cerezo, A., y Del Pozo, M. (2011). Overcoming anoikis pathways to anchorage-independent growth in cancer. *Journal of Cell Science*, 124(19), 3189-3197. doi: 10.1242/jcs.072165
- Guo, X., Xiong, L., Zou, L., Sun, T., Zhang, J., Li, H., y Zhao, J. (2012). L1 cell adhesion molecule overexpression in hepatocellular carcinoma associates with advanced tumor progression and poor patient survival. *Diagnostic Pathology*, 7, 96-96. doi: 10.1186/1746-1596-7-96
- Hanahan, D., y Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hasegawa, Y., Takanashi, S., Kanehira, Y., Tsushima, T., Imai, T., y Okumura, K. (2001). Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, 91(5), 964-971. doi: 10.1002/1097-0142(20010301)91:5<964::AID-CNCR1086>3.0.CO;2-O
- Heldin, C., Vanlandewijck, M., y Moustakas, A. (2012). Regulation of EMT by TGFβ in cancer. *FEBS Letters*, 586(14), 1959-1970. doi: 10.1016/j.febslet.2012.02.037
- Hermida, N., López, B., González, A., Dotor, J., Lasarte, J., Sarobe, P., Díez, J. (2009). A synthetic peptide from transforming growth factor-beta1 type III receptor prevents myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research*, 81(3), 601-609. doi: 10.1093/cvr/cvn315

- Hinck, A. (2012). Structural studies of the TGF β s and their receptors - insights into evolution of the TGF β superfamily. *FEBS Letters*, 586(14), 1860-1870. doi: 10.1016/j.febslet.2012.05.028
- Hood, J., y Cheresch, D. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Reviews.Cancer*, 2(2), 91-100. doi: 10.1038/nrc727
- Hood, J., San, R., y Wickline, S. (2011). Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Research*, 71(11), 3792-3801. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4455
- Horbelt, D., Denkis, A., y Knaus, P. (2012). A portrait of transforming growth factor β superfamily signalling: Background matters. *International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 44(3), 469-474. doi: 10.1016/j.biocel.2011.12.013
- Hosotani, R., Kawaguchi, M., Masui, T., Koshiba, T., Ida, J., Fujimoto, K., Imamura, M. (2002). Expression of integrin α V β 3 in pancreatic carcinoma: Relation to MMP-2 activation and lymph node metastasis. *Pancreas*, 25(2), e30-e35. doi: 10.1097/00006676-200208000-00021
- Huttenlocher, A., y Horwitz, A. (2011). Integrins in cell migration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(9), a005074-a005074. doi: 10.1101/cshperspect.a005074
- Ignotz, R. A., y Honeyman, T. (2000). TGF-beta signaling in A549 lung carcinoma cells: Lipid second messengers. *Journal of Cellular Biochemistry*, 78(4), 588-594. doi: 10.1002/1097-4644(20000915)78:4<588::AID-JCB8>3.0.CO 2-6
- Irigoyen, M., Pajares, M., Agorreta, J., Ponz Sarvisé, M., Salvo, E., Lozano, M., y Rouzaut, A. (2010). TGFBI expression is associated with a better response to chemotherapy in NSCLC. *Molecular Cancer*, 9, 130-130. doi: 10.1186/1476-4598-9-130
- Issa, Y., Nummer, D., Seibel, T., Mürköster, S., Koch, M., Schmitz Winnenthal, F., y Altevogt, P. (2009). Enhanced L1CAM expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration. *Journal of Molecular Medicine*, 87(1), 99-112. doi: 10.1007/s00109-008-0410-7

- Jiang, Z., Sato, M., y Wu, L. (2012). Chapter five--the development of transcription-regulated adenoviral vectors with high cancer-selective imaging capabilities. *Adv Cancer Res*, 115, 115-146. doi: 10.1016/B978-0-12-398342-8.00005-7
- Jin, H., Su, J., Garmy Susini, B., Kleeman, J., y Varner, J. (2006). Integrin alpha4beta1 promotes monocyte trafficking and angiogenesis in tumors. *Cancer Research*, 66(4), 2146-2152. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2704
- Jinka, R., Kapoor, R., Sistla, P., Raj, T. A., y Pande, G. (2012). Alterations in cell-extracellular matrix interactions during progression of cancers. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 219196-219196. doi: 10.1155/2012/219196
- Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van Hinsbergh, V. W., Fang, G. H., Dumont, D., y Alitalo, K. (1995). Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), 3566-3570. doi: 10.1073/pnas.92.8.3566
- Kanamoto, T., Hellman, U., Heldin, C., y Souchelnytskyi, S. (2002). Functional proteomics of transforming growth factor-beta1-stimulated Mv1Lu epithelial cells: Rad51 as a target of TGFbeta1-dependent regulation of DNA repair. *EMBO Journal*, 21(5), 1219-1230. doi: 10.1093/emboj/21.5.1219
- Kang, Y. (2006). Pro-metastasis function of TGFbeta mediated by the smad pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(6), 1380-1390. doi: 10.1002/jcb.20928
- Khanna, C., y Hunter, K. (2005). Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis*, 26(3), 513-523. doi: 10.1093/carcin/bgh261
- Kiefel, H., Bondong, S., Hazin, J., Ridinger, J., Schirmer, U., Riedle, S., y Altevogt, P. (2012). L1CAM: A major driver for tumor cell invasion and motility. *Cell Adhesion Migration*, 6(4), 374-384. doi: 10.4161/cam.20832
- Kim, A., Johnson, K., y Detterbeck, F. (2012). The lung cancer stage page: There when you need it--staginglungcancer.org. *Chest*, 141(3), 581-586. doi: 10.1378/chest.11-3192

- Kim, M., Koh, Y., Kim, K., Koh, B., Nam, D., Alitalo, K., Koh, G. (2010). CXCR4 signaling regulates metastasis of chemoresistant melanoma cells by a lymphatic metastatic niche. *Cancer Research*, 70(24), 10411-10421. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2591
- Kopczyńska, E., Dancewicz, M., Kowalewski, J., Kardymowicz, H., y Tyrakowski, T. (2007). The serum concentration of metalloproteinase 9 and 2 in non-small cell lung cancer patients. *Polski Merkurusz Lekarski*, 22(132), 539-541
- Kopfstein, L., y Christofori, G. (2006). Metastasis: Cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(4), 449-468. doi: 10.1007/s00018-005-5296-8
- Koukoulis, G. K., Howedy, A. A., Korhonen, M., Virtanen, I., y Gould, V. E. (1993). Distribution of tenascin, cellular fibronectins and integrins in the normal, hyperplastic and neoplastic breast. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 25(2), 285-295
- Kozomara, A., y Griffiths J.S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, 2011, 39, Database issue, D152-D157
- Kwak, E., Bang, Y., Camidge, D. R., Shaw, A., Solomon, B., Maki, R., y Iafrate, A. J. (2010). Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 363(18), 1693-1703. doi: 10.1056/NEJMoa1006448
- Lallemand, F., Mazars, A., Prunier, C., Bertrand, F., Kornprost, M., Gallea, S., Atfi, A. (2001). Smad 7 inhibits the survival nuclear factor kappaB and potentiates apoptosis in epithelial cells. *Oncogene*, 20(7), 879-884. doi: 10.1038/sj.onc.1204167
- Lämmermann, T., Bader, B., Monkley, S., Worbs, T., Wedlich-Säldner, R., Hirsch, K., y Sixt, M. (2008). Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*, 453(7191), 51-55. doi: 10.1038/nature06887
- Lämmermann, T., y Sixt, M. (2009). Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(5), 636-644. doi: 10.1016/j.ceb.2009.05.003

- Lee, H., Ahn, H., Jeong, J., Kwon, M., Han, J., Sun, J., y Ahn, M. (2012). Favorable clinical outcomes of pemetrexed treatment in anaplastic lymphoma kinase positive non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, doi: 10.1016/j.lungcan.2012.10.002
- Leifheit Nestler, M., Conrad, G., Heida, N., Limbourg, A., Limbourg, F., Seidler, T., y Schäfer, K. (2010). Overexpression of integrin beta 5 enhances the paracrine properties of circulating angiogenic cells via src kinase-mediated activation of STAT3. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(7), 1398-1406. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.206086
- Levy, L., y Hill, C. (2006). Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 17(1-2), 41-58. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.09.009
- Li, H., y Liu, J. (2007). Mechanisms of action of TGF β in cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1114(1), 56-68. doi: 10.1196/annals.1396.016
- Llopiz, D., Dotor, J., Casares, N., Bezunartea, J., Díaz-Valdés, N., Ruiz, M., y Sarobe, P. (2009). Peptide inhibitors of transforming growth factor-beta enhance the efficacy of antitumor immunotherapy. *International Journal of Cancer*, 125(11), 2614-2623. doi: 10.1002/ijc.24656
- Lu, S., y Dong, Z. (2006). Characterization of TGF-beta-regulated interleukin-8 expression in human prostate cancer cells. *The Prostate*, 66(9), 996-1004. doi: 10.1002/pros.20424
- Luo, B., Carman, C., y Springer, T. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual Review of Immunology*, 25, 619-647. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618
- Ma, L., Cheung, K. C. P., Kishore, M., Nourshargh, S., Mauro, C., y Marelli Berg, F. (2012). CD31 exhibits multiple roles in regulating T lymphocyte trafficking in vivo. *The Journal of Immunology*, 189(8), 4104-4111. doi: 10.4049/jimmunol.1201739
- Mamuya, F., y Duncan, M., (2012). α v integrins and TGF- β -induced EMT: a circle of regulation. *J.Cell.Mol.Med.*, 16, 3, 445-455

- Marchán, S., Pérez-Torras, S., Vidal, A., Adan, J., Mitjans, F., Carbó, N., y Mazo, A. (2010). Dual effects of $\beta 3$ integrin subunit expression on human pancreatic cancer models. *Analytical Cellular Pathology*, 33(5), 191-205. doi: 10.3233/ACP-CLO-2010-0538
- Margadant, C., Monsuur, H., Norman, J., y Sonnenberg, A. (2011). Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(5), 607-614. doi: 10.1016/j.ceb.2011.08.005
- Marshall, H., Leong, S., Bowman, R., Yang, I., y Fong, K. (2012). The science behind the 7th edition tumour, node, metastasis staging system for lung cancer. *Respirology*, 17(2), 247-260. doi: 10.1111/j.1440-1843.2011.02083.x
- Massagué, J. (2012). TGF β signalling in context. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology*, 13(10), 616-630. doi: 10.1038/nrm3434
- Massagué, J., y Gomis, R. (2006). The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Letters*, 580(12), 2811-2820. doi: 10.1016/j.febslet.2006.04.033
- Mazzocca, A., Fransvea, E., Dituri, F., Lupo, L., Antonaci, S., y Giannelli, G. (2010). Down-regulation of connective tissue growth factor by inhibition of transforming growth factor beta blocks the tumor-stroma cross-talk and tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 51(2), 523-534. doi: 10.1002/hep.23285
- McCabe, N. P., De, S., Vasanji, A., Brainard, J., y Byzova, T. V. (2007). Prostate cancer specific integrin alphavbeta3 modulates bone metastatic growth and tissue remodeling. *Oncogene*, 26(42), 6238-6243. doi: 10.1038/sj.onc.1210429
- Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, A. R., y Derynck, R. (1994). TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: Involvement of type I receptors. *The Journal of Cell Biology*, 127(6), 2021-2036. doi: 10.1083/jcb.127.6.2021
- Millard, M., Odde, S., Neamati, N., (2011). Integrin targeted therapeutics. *Theranostics*, 2011, 1, 154-188

- Mirzoeva, S., Franzen, C., y Pelling, J. (2013). Apigenin inhibits TGF β -induced VEGF expression in human prostate carcinoma cells via a Smad2/3- and src-dependent mechanism. *Molecular Carcinogenesis*, doi: 10.1002/mc.22005
- Miura, S., Murakami, H., Tamiya, A., Morii, S., Akamatsu, H., Ono, A., y Yamamoto, N. (2011). Differential efficacy of docetaxel according to non-small cell lung cancer histology and the therapeutic effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Oncology Letters*, 2(6), 1059-1064. doi: 10.3892/ol.2011.400
- Miyazono, K., ten Dijke, P., y Heldin, C. H. (2000). TGF-beta signaling by smad proteins. *Adv Immunol*, 75, 115-157. doi: 10.1016/S0065-2776(00)75003-6
- Miyazono, K., Ehata, S., y Koinuma, D. (2012). Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 117(2), 143-152. doi: 10.3109/03009734.2011.638729
- Moses, H. L., Branum, E. L., Proper, J. A., y Robinson, R. A. (1981). Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Research*, 41(7), 2842-2848
- Mumprecht, V., y Detmar, M. (2009). Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8A), 1405-1416. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00834.x
- Nagahashi, M., Ramachandran, S., Rashid, O., y Takabe, K. (2010). Lymphangiogenesis: A new player in cancer progression. *World Journal of Gastroenterology*, 16(32), 4003-4012. doi: 10.3748/wjg.v16.i32.4003
- Onn, A., Isobe, T., Itasaka, S., Wu, W., O'Reilly, M., Ki Hong, W., y Herbst, R. (2003). Development of an orthotopic model to study the biology and therapy of primary human lung cancer in nude mice. *Clinical Cancer Research*, 9(15), 5532-5539
- Osada, H., Tatematsu, Y., Masuda, A., Saito, T., Sugiyama, M., Yanagisawa, K., y Takahashi, T. (2001). Heterogeneous transforming growth factor (TGF)-beta unresponsiveness and loss of TGF-beta receptor type II expression caused by histone deacetylation in lung cancer cell lines. *Cancer Research*, 61(22), 8331-8339

- Padua, D., y Massagué, J. (2009). Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Research*, 19(1), 89-102. doi: 10.1038/cr.2008.316
- Padua, D., Zhang, X. H., Wang, Q., Nadal, C., Gerald, W. L., Gomis, R. R., y Massague, J. (2008). TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*, 133(1), 66-77. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.046
- Papageorgis, P., Cheng, K., Ozturk, S., Gong, Y., Lambert, A., Abdolmaleky, H., y Thiagalingam, S. (2011). Smad 4 inactivation promotes malignancy and drug resistance of colon cancer. *Cancer Research*, 71(3), 998-1008. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3269
- Park, S., Dimairo, T., Liu, W., Wang, S., Sorenson, C., y Sheibani, N. (2013). Endoglin regulates the activation and quiescence of endothelium by participating in canonical and non-canonical TGFβ signaling pathways. *Journal of Cell Science*, doi: 10.1242/jcs.117275
- Peralta Z., O., Lagunas-Martínez, A., y Madrid M. V. (2001). Transforming growth factor beta-1: Structure, function, and regulation mechanisms in cancer. *Salud Pública De México*, 43(4), 340-351. doi: 10.1590/S0036-36342001000400011
- Pérez G. E., Del Castillo, G., Santibáñez, J., Lepez N.J., Bernabéu, C., y Quintanilla, M. (2010). The role of the TGFβ coreceptor endoglin in cancer. *TheScientificWorldjournal*, 10, 2367-2384. doi: 10.1100/tsw.2010.230
- Perez M., P., Brambilla, E., Thomas, R., y Soria, J. (2012). Squamous cell carcinoma of the lung: Molecular subtypes and therapeutic opportunities. *Clinical Cancer Research*, 18(9), 2443-2451. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2370
- Perrot, C., Javelaud, D., y Mauviel, A. (2012). Overlapping activities of TGFβ and hedgehog signaling in cancer: Therapeutic targets for cancer treatment. *Pharmacology Therapeutics*, doi: 10.1016/j.pharmthera.10.002
- Pirinen, R., Leinonen, T., Böhmhm, J., Johansson, R., Ropponen, K., Kumpulainen, E., y Kosma, V. (2005). Versican in nonsmall cell lung cancer: Relation to hyaluronan,

- clinicopathologic factors, and prognosis. *Human Pathology*, 36(1), 44-50. doi: 10.1016/j.humpath.2004.10.010
- Provencio, M., Isla, D., Sánchez, A., y Cantos, B. (2011). Inoperable stage III non-small cell lung cancer: Current treatment and role of vinorelbine. *Journal of Thoracic Disease*, 3(3), 197-204. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2011.01.02
- Qian, C., Berghuis, B., Tsarfaty, G., Bruch, M., Kort, E., Ditlev, y J., Teh, B. (2006). Preparing the "soil": The primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells. *Cancer Research*, 66(21), 10365-10376. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2977
- Ribatti, D., Nico, B., y Crivellato, E. (2011). The role of pericytes in angiogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 55(3), 261-268. doi: 10.1387/ijdb.103167dr
- Rossi, E., Sanz Rodriguez, F., Eleno, N., Düwell, A., Blanco, F., Langa, C., y Bernabeu, C. (2012). Endothelial endoglin is involved in inflammation: Role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood*, doi: 10.1182/blood-2012-06-435347
- Rouzaut, A., Garasa, S., Teijeira, A., González, I., Martínez Forero, I., Suárez, N., y Melero, I. (2010). Dendritic cells adhere to and transmigrate across lymphatic endothelium in response to IFN α . *European Journal of Immunology*, 40(11), 3054-3063. doi: 10.1002/eji.201040523
- Rovenská, E., y Rovensky, J. (2011). Lymphatic vessels: Structure and function. *The Israel Medical Association Journal*, 13(12), 762-768
- Sandler, A., Gray, R., Perry, M., Brahmer, J., Schiller, J., Dowlati, A., y Johnson, D. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 355(24), 2542-2550. doi: 10.1056/NEJMoa061884
- Santiago, B., Gutierrez-Cañas, I., Dotor, J., Palao, G., Lasarte, J., Ruiz, J., y Pablos, J. (2005). Topical application of a peptide inhibitor of transforming growth factor-beta1 ameliorates bleomycin-induced skin fibrosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(3), 450-455. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23859.x

- Schäfer, H., Dieckmann, C., Korniienko, O., Moldenhauer, G., Kiefel, H., Salnikov, A., y Sebens, S. (2012). Combined treatment of L1CAM antibodies and cytostatic drugs improve the therapeutic response of pancreatic and ovarian carcinoma. *Cancer Letters*, 319(1), 66-82. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.035
- Seoane, J. (2008). The TGF β pathway as a therapeutic target in cancer. *Clinical Translational Oncology*, 10(1), 14-19. doi: 10.1007/s12094-008-0148-2
- Shah, P. P., Fong, M. Y., y Kakar, S. S. (2012). PTTG induces EMT through integrin $\alpha\beta$ 3-focal adhesion kinase signaling in lung cancer cells. *Oncogene*, 31(26), 3124-3135. doi: 10.1038/onc.2011.488
- Shattil, S., Kim, C., y Ginsberg, M. (2010). The final steps of integrin activation: The end game. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology*, 11(4), 288-300. doi: 10.1038/nrm2871
- Siegel, P., y Massagué, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nature Reviews.Cancer*, 3(11), 807-821. doi: 10.1038/nrc1208
- Siegel,R., Naishadham,D., Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2013, 63, 1, 11-30.
- Skobe, M., y Detmar, M. (2000). Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *The Journal of Investigative Dermatology.Symposium Proceedings*, 5(1), 14-19. doi: 10.1046/j.1087-0024.2000.00001.x
- Sleeman, J. P., Krishnan, J., Kirkin, V., y Baumann, P. (2001). Markers for the lymphatic endothelium: In search of the holy grail? *Microscopy Research and Technique*, 55(2), 61-69. doi: 10.1002/jemt.1157
- Sloan, E., Pouliot, N., Stanley, K., Chia, J., Moseley, J., Hards, D., y Anderson, R. (2006). Tumor-specific expression of α v β 3 integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. *Breast Cancer Research*, 8(2), R20-R20. doi: 10.1186/bcr1398
- Sporn, M. B., y Roberts, A. B. (1992). Transforming growth factor-beta: Recent progress and new challenges. *The Journal of Cell Biology*, 119(5), 1017-1021. doi: 10.1083/jcb.119.5.1017

- Stupack, D. G., y Cheresch, D. A. (2004). Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol*, 64, 207-238. doi: 10.1016/S0070-2153(04)64009-9
- Stupack, D. G., Puente, X. S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C. M., y Cheresch, D. A. (2001). Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *The Journal of Cell Biology*, 155(3), 459-470. doi: 10.1083/jcb.200106070
- Swartz, M., y Lund, A. (2012). Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: Linking mechanobiology with immunity. *Nature Reviews.Cancer*, 12(3), 210-219. doi: 10.1038/nrc3186
- Szabo, A., Howell, N., Pellegrini, P., Greguric, I., y Katsifis, A. (2012). Development and validation of competition binding assays for affinity to the extracellular matrix receptors, $\alpha(v)\beta(3)$ and $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$ integrin. *Analytical Biochemistry*, 423(1), 70-77. doi: 10.1016/j.ab.2011.12.046
- Takayama, S., Ishii, S., Ikeda, T., Masamura, S., Doi, M., y Kitajima, M. (2005). The relationship between bone metastasis from human breast cancer and integrin $\alpha(v)\beta(3)$ expression. *Anticancer Research*, 25(1A), 79-83
- Takizawa, Y. (1997). New immunodeficient (nude-scid, beige-scid) mice as excellent recipients of human skin grafts containing intraepidermal neoplasms. *Archives of Dermatological Research*, 289(4), 213-218. doi: 10.1007/s004030050182
- Tammela, T., y Alitalo, K. (2010). Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell*, 140(4), 460-476. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.045
- Taverna, D., Moher, H., Crowley, D., Borsig, L., Varki, A., y Hynes, R. (2004). Increased primary tumor growth in mice null for $\beta(3)$ - or $\beta(3)/\beta(5)$ -integrins or selectins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(3), 763-768. doi: 10.1073/pnas.0307289101
- Thiagalingam, S., Lengauer, C., Leach, F. S., Schutte, M., Hahn, S. A., Overhauser, J., y Vogelstein, B. (1996). Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nature Genetics*, 13(3), 343-346. doi: 10.1038/ng0796-343

- Thiery, J., Acloque, H., Huang, R. Y. J., y Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871-890. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007
- Tian, M., Neil, J., y Schiemann, W. (2011). Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer. *Cellular Signalling*, 23(6), 951-962. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.10.015
- Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350-4354. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350
- Travis, W., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A., Geisinger, K., Yatabe, Y., y Yankelewitz, D. (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(2), 244-285. doi: 10.1097/JTO.0b013e318206a221
- Tremblay, P., Huot, J., y Auger, F. (2008). Mechanisms by which E-selectin regulates diapedesis of colon cancer cells under flow conditions. *Cancer Research*, 68(13), 5167-5176. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1229
- Vega, S., Morales, A., Ocaña, O., Valdés, F., Fabregat, I., Nieto, M. A. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes development*, 2004, 18, 10, 1131-1143, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Voura, E. B., Ramjeesingh, R. A., Montgomery, A. M., y Siu, C. H. (2001). Involvement of integrin $\alpha(v)\beta(3)$ and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells. *Molecular Biology of the Cell*, 12(9), 2699-2710
- Wendt, M., Tian, M., y Schiemann, W. (2012). Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF β -induced EMT during cancer progression. *Cell and Tissue Research*, 347(1), 85-101. doi: 10.1007/s00441-011-1199-1
- Wigle, J. T., y Oliver, G. (1999). Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*, 98(6), 769-778. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81511-1

- Wood, D., Eapen, G., Ettinger, D., Hou, L., Jackman, D., Kazerooni, E., y Yang, S. (2012). Lung cancer screening. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 10(2), 240-265
- Woodward, J. (2008). Crossing the endothelium: E-selectin regulates tumor cell migration under flow conditions. *Cell Adhesion Migration*, 2(3), 151-152. doi: 10.4161/cam.2.3.6820
- Yamaura, T., Doki, Y., Murakami, K., y Saiki, I. (1999). Model for mediastinal lymph node metastasis produced by orthotopic intrapulmonary implantation of lung cancer cells in mice. *Human Cell*, 12(4), 197-204
- Yamaura, T., Murakami, K., Doki, Y., Sugiyama, S., Misaki, T., Yamada, Y., y Saiki, I. (2000). Solitary lung tumors and their spontaneous metastasis in athymic nude mice orthotopically implanted with human non-small cell lung cancer. *Neoplasia*, 2(4), 315-324. doi: 10.1038/sj.neo.7900098
- Yan, A., Avraham, T., Zampell, J., Haviv, Y., Weitman, E., Mehrara, B. Adipose-derived stem cells promote lymphangiogenesis in response to VEGF-C stimulation or TGF- β 1 inhibition. *Future oncology*, 2011, 7, 12, 1457-1473
- Yano, T., Haro, A., Shikada, Y., Maruyama, R., y Maehara, Y. (2011). Non-small cell lung cancer in never smokers as a representative 'non-smoking-associated lung cancer': Epidemiology and clinical features. *International Journal of Clinical Oncology*, 16(4), 287-293. doi: 10.1007/s10147-010-0160-8
- Zamarron, B., y Chen, W. (2011). Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *International Journal of Biological Sciences*, 7(5), 651-658. doi: 10.7150/ijbs.7.651
- Zhang, H., Su, J., Zhu, J., Wang, H., Zhou, W., Zhao, M., y Chen, X. (2011). Transforming growth factor- β promotes lung adenocarcinoma invasion and metastasis by epithelial-to-mesenchymal transition. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 355(1-2), 309-314. doi: 10.1007/s11010-011-0869-3

- Zhao, Y., Bachelier, R., Treilleux, I., Pujuguet, P., Peyruchaud, O., Baron, R., y Clzardin, P. (2007). Tumor alphavbeta3 integrin is a therapeutic target for breast cancer bone metastases. *Cancer Research*, 67(12), 5821-5830. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4499
- Zhu, C., Popova, S., Brown, E. R. S., Barsyte L. D., Navab, R., Shih, W., Tsao, M. (2007). Integrin alpha 11 regulates IGF2 expression in fibroblasts to enhance tumorigenicity of human non-small-cell lung cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(28), 11754-11759. doi: 10.1073/pnas.0703040104
- Zhu, H. J., y Burgess, A. W. (2001). Regulation of transforming growth factor-beta signaling. *Molecular Cell Biology Research Communications*, 4(6), 321-330. doi: 10.1006/mcbr.2001.0301
- Zhuang, Z., Jian, P., Longjiang, L., Bo, H., y Wenlin, X. (2010). Oral cancer cells with different potential of lymphatic metastasis displayed distinct biologic behaviors and gene expression profiles. *Journal of Oral Pathology Medicine*, 39(2), 168-175. doi: 10.1111/j.1600-0714.2009.00817.x
- Zi, Z., Chapnick, D., y Liu, X. (2012). Dynamics of TGF- β /Smad signaling. *FEBS Letters*, 586(14), 1921-1928. doi: 10.1016/j.febslet.2012.03.063
- Zochbauer Muller, S., Gazdar, A., y Minna, J. (2002). Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annual Review of Physiology*, 64, 681-708. doi: 10.1146/annurev.physiol.64.081501.155828
- Zubeldia, I., Bleau, A., Redrado, M., Serrano, D., Agliano, A., Gil Puig, C., Calvo, A. (2013). Epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes leading to liver metastasis are abrogated by the novel TGF β 1 targeting peptides p17 and p144. *Experimental Cell Research*, 319(3), 12-22. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.11.004

ANEXOS

Introducción

Tabla A.1. Clasificación de NSCLC a partir de pequeñas biopsias y citología propuesta por IASLC/ATS/ERS Obtenida de (Travis *et al*, 2011)).

2004 WHO Classification	Small Biopsy/Cytology: IASLC/ATS/ERS
Adenocarcinoma	<i>Morphologic adenocarcinoma patterns clearly present:</i>
Mixed subtype	Adenocarcinoma, describe identifiable patterns present (including micropapillary pattern not included in 2004 WHO classification)
Acinar	Comment: If pure lepidic growth—mention an invasive component cannot be excluded in this small specimen
Papillary	Adenocarcinoma with lepidic pattern (if pure, add note: an invasive component cannot be excluded)
Solid	Mucinous adenocarcinoma (describe patterns present)
Bronchioloalveolar carcinoma (nonmucinous)	Adenocarcinoma with fetal pattern
Bronchioloalveolar carcinoma (mucinous)	Adenocarcinoma with colloid pattern
Fetal	Adenocarcinoma with (describe patterns present) and signet ring features
Mucinous (colloid)	Adenocarcinoma with (describe patterns present) and clear cell features
Signet ring	<i>Morphologic adenocarcinoma patterns not present (supported by special stains):</i>
Clear cell	Non-small cell carcinoma, favor adenocarcinoma
No 2004 WHO counterpart - most will be solid adenocarcinomas	
Squamous cell carcinoma	<i>Morphologic squamous cell patterns clearly present:</i>
Papillary	Squamous cell carcinoma
Clear cell	
Small cell	
Basaloid	
No 2004 WHO counterpart	<i>Morphologic squamous cell patterns not present (supported by stains):</i> Non-small cell carcinoma, favor squamous cell carcinoma
Small cell carcinoma	Small cell carcinoma
Large cell carcinoma	Non-small cell carcinoma, not otherwise specified (NOS)
Large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC)	Non-small cell carcinoma with neuroendocrine (NE) morphology (positive NE markers), possible LCNEC
Large cell carcinoma with NE morphology (LCNEM)	Non-small cell carcinoma with NE morphology (negative NE markers) — see comment Comment: This is a non-small cell carcinoma where LCNEC is suspected, but stains failed to demonstrate NE differentiation.
Adenosquamous carcinoma	<i>Morphologic squamous cell and adenocarcinoma patterns present:</i> Non-small cell carcinoma, with squamous cell and adenocarcinoma patterns Comment: this could represent adenosquamous carcinoma.
No counterpart in 2004 WHO classification	<i>Morphologic squamous cell or adenocarcinoma patterns not present but immunostains favor separate glandular and adenocarcinoma components</i> Non-small cell carcinoma, NOS, (specify the results of the immunohistochemical stains and the interpretation) Comment: this could represent adenosquamous carcinoma.
Sarcomatoid carcinoma	Poorly differentiated NSCLC with spindle and/or giant cell carcinoma (mention if adenocarcinoma or squamous carcinoma are present)

IASLC/ATS/ERS, International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society; LCNEC, large cell neuroendocrine carcinoma; LCNECM, large cell carcinoma with NE morphology; NE, neuroendocrine; NOS, not otherwise specific; NSCLC, nonsmall cell lung cancer; WHO, World Health Organization.

Tabla A.2. Estadaje y pronóstico del cáncer de pulmón según la clasificación TNM (Detterbeck *et al*, 2009; Kim *et al*, 2012).

(T) Tumor primario

T0/TX	No se detecta tumor primario
T1	T1a- Tumor \leq 2cm T1b - Tumor $>$ 2cm \leq 3cm
T2	T2a - Tumor $>$ 3cm \leq 5cm T2b - Tumor $>$ 5cm \leq 7cm
T3	Tumor $>$ 7cm Invasión pleural Nódulo tumoral en el mismo lóbulo
T4	Invasión corazón, vasos, tráquea, esófago Nódulo tumoral en distinto lóbulo

(N) Nódulo linfático regional

N0	No metástasis en ganglio linfático regional
N1	Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales peribronquiales, hiliares o intrapulmonares
N2	Metástasis en los ganglios linfáticos ipsilaterales mediastínicos o subcarinos
N3	Metastasis en los ganglios linfáticos contralaterales mediastínicos y hiliares, ipsilaterales o contralaterales escalenos, o supraclaviculares

(M) = metástasis a distancia

M0	No metástasis
M1	M1a- nódulo tumoral en lóbulo contralateral o diseminación pleural M1b- Metástasis a distancia

Estadios	T1	T2	T3	T4	M1
N0	IA	IB	IIB	IIIB	IV
N1	IIA	IIB	IIIA		IV
N2	IIIA		IV		
N3	IIIB		IV		
Estadio	TMS* (meses)		> 5 años		
IA	60-119		50-73%		
IB	43-81		43-56%		
IIA	34-49		36-46%		
IIB	18-31		25-36%		
IIIA	14-22		19-24%		
IIIB	10-13		7-9%		
IV	6-17		2-13%		

*Tiempo medio de supervivencia (TM)

Tabla A.3. Frecuencia de anomalías genéticas en NSCLC. Adaptada de (Perez *et al*, 2012)

Alteración genética	Gen/localización	Carcinoma escamoso	Adenocarcinoma
TP53	17p13.1	51%	36%
PI3KCA (amplificación)	3q26.3	33%	6%
SOX2 (amplificación)	3q26.3-q27	23%	muy raro
FGFR1 (amplificación)	8p12	22%	1%
PTEN (mutación)	10q23.3	10%	2%
MET (amplificación)	7q31.1	3%-21%	3%-21%
PTEN (deleción)	10q23.3	8%-20%	8%-20%
KRAS (mutación)	12p12.1	6%	21%
Variant III (mutación)	7p12	5%	muy raro
LKB1 (mutación)	19p13.3	5%	23%
DDR2 (mutación)	1q23.3	4%	1%
HER2 (sobrexpresión)	17q11.2-q12,17q21	3%-5%	5%-9%
PI3KCA (mutación)	3q26.3	3%	3%
BRAF (mutación)	7p34	2%	1%-3%
EGFR (mutación)	7p12	<5%	10%-15%
AKT1 (mutación)	14q32.32	1%	muy raro
MET (mutación)	7q31.1	1%	2%
HER2 (mutación)	17q11.2-q12,17q21	1%	2%
EML4-ALK (fusión)	2p21,2p23	1%	2%-7%

Adaptada de Perez-Moreno P, Brambilla E, Thomas R, Soria JC. Clin Cancer Res. 2012

Materiales y métodos**Tabla A.4.** Anticuerpos para citometría de flujo frente a moléculas de adhesión en la superficie celular de células de NSCLC y HMVEC-Lly.

Proteína	Anticuerpo primario	Casa comercial	Anticuerpo secundario	Control de isotipo
Integrina α 1	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la integrina α 1, clon FB12	MAB1973Z. (Chemicon International/Millipore, California, EE.UU.)	Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG. (Molecular Probes, Barcelona, España)	anti-IgG2b (MAB004, RyD Systems, Minneapolis, EE.UU)
Integrina α 4	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la integrina α 4, clon L25	340976, (BD Biosciences San José, CA, EE.UU.)	Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG	anti-IgG2b (MAB004, RyD Systems)
Integrina α 5 β 1	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la integrina α 5 β 1, clon HA5	Integrin Classics Kit - ECM43, (Part No. MAB1999; Chemicon International-Millipore),	Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG	Anti-IgG2b (MAB004, RyD Systems)
Integrina α v	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la integrina α v, clon P3G8	Integrin Classics Kit - ECM43, (Part No. MAB1953Z; Chemicon International-Millipore),	Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG	Anti-IgG1 de ratón (clon MG1-45, Biologend, San Diego, CA, EE.UU.)
Integrina α v β 3	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la integrina α v β 3, clone LM609	MAB1976Z, (Chemicon International-Millipore),	Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG	Anti-IgG1 de ratón (clon MG1-45, Biologend)
Integrina α v β 5	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la integrina α v β 5, clon P1F6	Integrin Classics Kit - ECM43, (Part No. MAB1961Z Chemicon International-Millipore),	Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG	Anti-IgG1 de ratón (clon MG1-45, Biologend)

Proteína	Anticuerpo primario	Casa comercial	Anticuerpo secundario	Control de isotipo
Integrina β 2	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la integrina β 2, clon P4H9	Integrin Classics Kit - ECM43, (Part No. MAB1962Z) Chemicon International (Millipore)	Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG	Anti-IgG2b (MAB004, RyD Systems)
Integrina β 3	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la integrina β 3, clon B3A	MAB2023Z, Chemicon International (Millipore),	Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG	Anti-IgG2b de ratón (MAB004, RyD Systems)
CXCR4	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a CXCR4 marcado con PE, clon 12G5	eBioscience, (San Diego, California, EE.UU.)	----	Anti-IgG1 de ratón clon P3.6.2.8.1 marcado con PE (eBioscience)
CCR7	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a CCR7 marcado con PE, clon 3D12	eBioscience.	----	Anti-IgG1 de ratón clon P3.6.2.8.1 marcado con PE (eBioscience)
CCR5	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a CCR5 marcado con PE, clon eBioT21/8	eBioscience	----	Anti-IgG1 de ratón clon P3.6.2.8.1 marcado con PE (eBioscience)
ICAM	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a ICAM (CD54), clon HA58	eBioscience.	----	Anti-IgG1 de ratón clon P3.6.2.8.1 marcado con PE (eBioscience)
VCAM	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a VCAM (CD106), clon STA	eBioscience	----	Anti-IgG1 de ratón clon P3.6.2.8.1 marcado con PE (eBioscience)

Proteína	Anticuerpo primario	Casa comercial	Anticuerpo secundario	Control de isotipo
L1CAM	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a CD171 marcado con PE, clon 5G3	eBioscience	----	Anti - IgG2a K de ratón marcado con PE (eBioscience)
E-selectina	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a E-selectina (CD62E) marcado con PE, clon P2H3	eBioscience	----	Anti-IgG1 de ratón clon P3.6.2.8.1 marcado con PE (eBioscience)

Resultados

Videos A.5- Videos (CD) de la adhesión de células H157 a monocapas de endotelio linfático.

Vídeo 1#: Células H157-GFP sin tratar en verde y endotelio linfático de pulmón en azul cian.

Vídeo 2#: Células H157-GFP tratadas con TGF β en verde y endotelio linfático de pulmón en azul cian.

Vídeo 3#: Células H157 ShRNA β 3 GFP sin tratar en verde y endotelio linfático de pulmón en azul cian.

Vídeo 4#: Células H157 ShRNA β 3 GFP tratadas con TGF β en verde y endotelio linfático de pulmón en azul cian.




Vídeo 5#: Células H157 ShRNA scramble-GFP sin tratar en verde y endotelio linfático de pulmón en azul cian.

Vídeo 6#: Células H157 ShRNA scramble-GFP tratadas con TGF β en verde y endotelio linfático de pulmón en azul cian.







Análisis de las posibles causas de la inespecificidad del plásmido ShRNA scramble - n° cat. TR30012, OriGene Technologies (Rockville, MD):

Los genes diana de los microRNAs parcialmente homólogos a la secuencia del shRNA de secuencia aleatoria (Scramble) comercial (n° ref. TR30012): 5' GCACTACCAGAGCTAA CTCAGATAGTACT 3', están descritos en la figura A1.

A

microRNA	Gene	miTG Score		
1 hsa-miR-1306-3p	WAPAL (ENSG00000062650)	0.930876		
Gene Description: WINGS APART-LIKE PROTEIN HOMOLOG (FRIEND OF EBNA2 PROTEIN) [SOURCE:UNIPROTKB/SWISS-PROT;ACC:Q7Z5K2]				
PubMed Links: miRNA gene both				
KEGG Pathways: -				
Gene Links: 				
ENST00000298767				
Region	Binding Type	Position	Score	Conservation
UTR3	8mer	2186 - 2194	0.0532037	13
Position on chromosome: 10 : 88185085 - 88185113				
Conserved species: panTro2,rheMac2,m4,mm8,oryCun1,bosTau3,canFam2,dasNov1,loxAfr1,echTel1,monDom4,galGal3,xenTro2				
RNA hybrid:				
	(3' UTR)	5'	GCUGUGAUCUUUGG_G_AA_____G 3'	
			_____A_CA_____AGCCAACG_____	
			_____ _____ _____	
			_____U_GU_____UCGGUUGC_____	
	(miRNA)	3'	_____G_G_GGUC_____A 5'	
2 hsa-miR-1306-3p	ENSG00000214905	0.917844		
3 hsa-miR-1306-3p	ZNF14 (ENSG00000105708)	0.905638		
Gene Description: ZINC FINGER PROTEIN 14 (ZINC FINGER PROTEIN KOX6)(GONADOTROPIN-INDUCIBLE TRANSCRIPTION REPRESSOR 4)(GIOT-4) [SOURCE:UNIPROTKB/SWISS-PROT;ACC:P17017]				
PubMed Links: miRNA gene both				
KEGG Pathways: -				
Gene Links: 				
ENST00000379428				
Region	Binding Type	Position	Score	Conservation
UTR3	8mer	1419 - 1427	0.0476677	2
Position on chromosome: 19 : 19701326 - 19701354				
Conserved species: panTro2,rheMac2				
RNA hybrid:				
	(3' UTR)	5'	CAGGAGUU_AG_____CCU_____ 3'	
			_____CG_ACCAG_____GGCCAACGU_____	
			_____ _____ _____ _____	
			_____GU_UGGUC_____UCGGUUGCA_____	
	(miRNA)	3'	_____GG_____ 5'	
4 hsa-miR-1306-3p	FAM182B (ENSG00000175170)	0.905464		
5 hsa-miR-1306-3p	GOLIM4 (ENSG00000173905)	0.853821		
Gene Description: GOLGI INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN 4 (GOLGI PHOSPHOPROTEIN 4)(GOLGI INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN, CIS)(GIMPC)(GOLGI-LOCALIZED PHOSPHOPROTEIN OF 130 KDA)(GOLGI PHOSPHOPROTEIN OF 130 KDA) [SOURCE:UNIPROTKB/SWISS-PROT;ACC:O00461]				
PubMed Links: miRNA gene both				
KEGG Pathways: -				
Gene Links: 				
ENST00000309027				
Region	Binding Type	Position	Score	Conservation
UTR3	8mer	26 - 34	0.039551	3
Position on chromosome: 3 : 169210716 - 169210744				
Conserved species: panTro2,mm8,canFam2				
RNA hybrid:				
	(3' UTR)	5'	CCAAUUUCUAGA_A_C_____G 3'	
			_____CA_CGCU_____AGCCAACG_____	
			_____ _____ _____ _____	
			_____GU_GUGG_____UCGGUUGC_____	
	(miRNA)	3'	_____G_UC_____A 5'	

B

	microRNA	Gene	miTG Score	
1	hsa-miR-4435	FAM27C (ENSG00000154537)	0.999674	
2	hsa-miR-4435	VASH2 (ENSG00000143494)	0.999194	
Gene Description:		VASOHIBIN-2 (VASOHIBIN-LIKE PROTEIN) [SOURCE:UNIPROT/SWISS-PROT;ACC:Q86V25]		
PubMed Links:		miRNA gene both		
KEGG Pathways:		-		
Gene Links:		 		
ENST00000366969				
Region	Binding Type	Position	Score	Conservation
UTR3	6mer	1801 - 1809	0.00211489	2
UTR3	8mer	2803 - 2811	0.124997	8
3	hsa-miR-4435	LSM14A (ENSG00000105216)	0.997472	
4	hsa-miR-4435	DCDC2B (ENSG00000222046)	0.995511	
5	hsa-miR-4435	ENSG00000185904	0.995136	
6	hsa-miR-4435	CYORF14 (ENSG00000176728)	0.991673	
7	hsa-miR-4435	NTRK2 (ENSG00000148053)	0.990344	
8	hsa-miR-4435	HRNR (ENSG00000197915)	0.989834	
9	hsa-miR-4435	CKM (ENSG00000104879)	0.989758	
10	hsa-miR-4435	BMPR2 (ENSG00000204217)	0.986239	
Gene Description:		BONE MORPHOGENETIC PROTEIN RECEPTOR TYPE-2 PRECURSOR (EC 2.7.11.30)(BONE MORPHOGENETIC PROTEIN RECEPTOR TYPE II)(BMP TYPE II RECEPTOR)(BMPR-II) [SOURCE:UNIPROT/SWISS-PROT;ACC:Q13873]		
PubMed Links:		miRNA gene both		
KEGG Pathways:		TGF-beta signaling pathway Cytokine-cytokine receptor interaction		
Gene Links:		 		
ENST00000374574				
Region	Binding Type	Position	Score	Conservation
UTR3	6mer	1290 - 1298	0.00223994	4
UTR3	7mer	3535 - 3543	0.00255373	2
UTR3	8mer	7319 - 7327	0.0757346	2
11	hsa-miR-4435	CAPRIN1 (ENSG00000135387)	0.985769	
12	hsa-miR-4435	IGF1 (ENSG00000017427)	0.985034	
Gene Description:		INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR IA PRECURSOR (IGF-IA)(SOMATOMEDIN-C)(MECHANO GROWTH FACTOR)(MGF) [SOURCE:UNIPROT/SWISS-PROT;ACC:P01343]		
PubMed Links:		miRNA gene both		
KEGG Pathways:		mTOR signaling pathway Melanoma Glioma Prostate cancer Focal adhesion Long-term depression Pathways in cancer p53 signaling pathway		
Gene Links:		 		

ENST00000337514				
Region	Binding Type	Position	Score	Conservation
UTR3	8mer	933 - 941	0.0459166	8
UTR3	7mer	1514 - 1522	0.00815745	2
UTR3	6mer	5490 - 5498	0.00156785	2
UTR3	8mer	6373 - 6381	0.0234944	2
13	hsa-miR-4435	C21ORF124 (ENSG00000215465)		0.983366
14	hsa-miR-4435	ENSG00000215512		0.982452
15	hsa-miR-4435	ENSG00000213971		0.979385

	microRNA	Gene	miTG Score
61	hsa-miR-4435	MSL1 (ENSG00000188895)	0.927297
62	hsa-miR-4435	RYBP (ENSG00000163602)	0.926882
63	hsa-miR-4435	MAPK8 (ENSG00000107643)	0.926836
64	hsa-miR-4435	MDN1 (ENSG00000112159)	0.926765
65	hsa-miR-4435	HSPA12A (ENSG00000165868)	0.926732
66	hsa-miR-4435	PIK3R3 (ENSG00000117461)	0.924809

Gene Description: PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE REGULATORY SUBUNIT GAMMA (PI3-KINASE P85 SUBUNIT GAMMA) (PTDINS-3-KINASE P85-GAMMA)(P55PIK) [SOURCE:UNIPROT/KB/SWISS-PROT;ACC:Q92569]

PubMed Links: [miRNA | gene | both](#)

KEGG Pathways: [mTOR signaling pathway](#)
[Acute myeloid leukemia](#)
[Fc epsilon RI signaling pathway](#)
[ErbB signaling pathway](#)
[Apoptosis](#)
[Melanoma](#)
[Leukocyte transendothelial migration](#)
[Glioma](#)
[Small cell lung cancer](#)
[Phosphatidylinositol signaling system](#)
[Insulin signaling pathway](#)
[Toll-like receptor signaling pathway](#)
[Jak-STAT signaling pathway](#)
[Natural killer cell mediated cytotoxicity](#)
[Regulation of actin cytoskeleton](#)
[VEGF signaling pathway](#)
[Colorectal cancer](#)
[Non-small cell lung cancer](#)
[Renal cell carcinoma](#)
[Endometrial cancer](#)
[Chemokine signaling pathway](#)
[B cell receptor signaling pathway](#)
[Prostate cancer](#)
[Focal adhesion](#)
[T cell receptor signaling pathway](#)
[Pathways in cancer](#)
[Type II diabetes mellitus](#)
[Chronic myeloid leukemia](#)
[Pancreatic cancer](#)

Gene Links: [UniProt](#) [NCBI](#)

ENST00000372006				
Region	Binding Type	Position	Score	Conservation
UTR3	8mer	2824 - 2832	0.0176052	3
UTR3	8mer	3484 - 3492	0.0341167	7
67	hsa-miR-4435	EPHB2 (ENSG00000133216)		0.924213
68	hsa-miR-4435	ZHX3 (ENSG00000174306)		0.923865
69	hsa-miR-4435	C2ORF24 (ENSG00000115649)		0.923664
70	hsa-miR-4435	RSRC2 (ENSG00000111011)		0.923175
71	hsa-miR-4435	PREX1 (ENSG00000124126)		0.922725
72	hsa-miR-4435	CTGLF11P,AGAP9,AGAP10,AGAP5 (ENSG00000172650)		0.922434
73	hsa-miR-4435	HCP5 (ENSG00000206337)		0.922416
74	hsa-miR-4435	DCUN1D3 (ENSG00000188215)		0.922399
75	hsa-miR-4435	PTPRB (ENSG00000127329)		0.921712

C





microRNA	Gene	miTG Score		
1 hsa-miR-4424	SMAD5 (ENSG00000113658)	0.967462		
Gene Description: MOTHERS AGAINST DECAPENTAPLEGIC HOMOLOG 5 (MOTHERS AGAINST DPP HOMOLOG 5)(SMAD5)(SMAD5) (HSMAD5)(JV5-1) [SOURCE:UNIPROTKB/SWISS-PROT;ACC:Q99717]				
PubMed Links: miRNA gene both				
KEGG Pathways: TGF-beta signaling pathway				
Gene Links:  				
ENST00000398807				
Region	Binding Type	Position	Score	Conservation
UTR3	8mer	208 - 216	0.0287178	3
UTR3	6mer	832 - 840	0.00728413	9
UTR3	6mer	3587 - 3595	0.00215591	2
UTR3	6mer	4574 - 4582	0.00327654	3
UTR3	6mer	4869 - 4877	0.00489881	4
UTR3	7mer	5206 - 5214	0.0198154	10
2 hsa-miR-4424	ZFHX4 (ENSG00000091656)	0.967142		
3 hsa-miR-4424	SPAG16 (ENSG00000144451)	0.965539		
4 hsa-miR-4424	GNA12 (ENSG00000146535)	0.962696		
5 hsa-miR-4424	PURA (ENSG00000185129)	0.958984		
6 hsa-miR-4424	USP38 (ENSG00000170185)	0.956483		
7 hsa-miR-4424	ODF2L (ENSG00000122417)	0.94845		
8 hsa-miR-4424	CAPN10 (ENSG00000142330)	0.943663		
9 hsa-miR-4424	ERBB2IP (ENSG00000112851)	0.937543		
Gene Description: PROTEIN LAP2 (ERBB2-INTERACTING PROTEIN)(ERBIN)(DENSIN-180-LIKE PROTEIN) [SOURCE:UNIPROTKB/SWISS-PROT;ACC:Q96RT1]				
PubMed Links: miRNA gene both				
KEGG Pathways: -				
Gene Links:  				
ENST00000380936				
Region	Binding Type	Position	Score	Conservation
UTR3	8mer	785 - 793	0.0226542	6
UTR3	6mer	1812 - 1820	0.0103856	11
UTR3	7mer	1829 - 1837	0.02193	11
10 hsa-miR-4424	ATL2 (ENSG00000119787)	0.932		
11 hsa-miR-4424	ENSG00000205182	0.930343		
12 hsa-miR-4424	RAB10 (ENSG00000084733)	0.928109		
13 hsa-miR-4424	ATP2B1 (ENSG00000070961)	0.92445		
14 hsa-miR-4424	WDR45 (ENSG00000196998)	0.923225		
15 hsa-miR-4424	WAPAL (ENSG00000062650)	0.919155		

Figura A1: Ejemplos de genes diana de los microRNA parcialmente homólogos a la secuencia de shRNA scramble (A) hsa-miR-1306-3p, (B) hsa-miR-4435, (C) hsa-miR-4424 Datos obtenidos en *DIANA-microT-CDS* v. 5.0 (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/micro-CDS/index.php?r=search>).

PUBLICACIONES