



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL



**ESTUDIO DE LA EFICACIA
ANTI-TUMORAL DE PRO-ENZIMAS
PANCREÁTICAS FRENTE A
CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS**

**PRESENTADA POR:
PABLO HERNÁNDEZ CAMARERO**

**DIRIGIDA POR:
Dra. MACARENA PERÁN QUESADA
Dr. JUAN ANTONIO MARCHAL CORRALES**

JAÉN, 2023

ISBN

Para optar a la mención de “Doctor Internacional”, el doctorando realizó, durante el período de formación, una estancia de tres meses (1 mayo a 31 julio de 2021) en el Laboratorio del Profesor José Eduardo Marques Bragança, Algarve Biomedical Center Research Institute (ABC-RI), Universidade do Algarve, Faro, Portugal

Se presenta una Tesis por compendio de las siguientes publicaciones:

1. Hernández-Camarero P, Jiménez G, López-Ruiz E, Barungi S, Marchal JA, Perán M. Revisiting the Dynamic Cancer Stem Cell Model: Importance of Tumour Edges. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*. 2018, 131: 35–45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.08.004>

JCR (2018): 5.012

Hematology 14/73; Q1

2. Hernández-Camarero P, López-Ruiz E, Griñán-Lisón C, García MÁ, Chocarro-Wrona C, Marchal JA, Kenyon J, Perán M. Pancreatic (pro)enzymes treatment suppresses BXPC-3 pancreatic Cancer Stem Cell subpopulation and impairs tumour engrafting. *Sci Rep*. 2019 Aug 6;9(1):11359. doi: 10.1038/s41598-019-47837-7.

JCR (2019): 3.998

Multidisciplinary Sciences 17/71; Q1

3. Hernández-Camarero P, López-Ruiz E, Marchal JA, Perán M. Cancer: a mirrored room between tumor bulk and tumor microenvironment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2021) 40:217. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02022-5>

JCR (2021) 12.658

Oncology 24/245; D1

4. Hernández-Camarero P, López-Ruiz E, Marchal JA, Perán M. Unifying Different Cancer Theories in a Unique Tumour Model: Chronic Inflammation and Deaminases as Meeting Points. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 5;23(15):8720. doi: 10.3390/ijms23158720. PMID: 35955853

JCR (2021) 6.208

Biochemistry & Molecular Biology 69/297; Q1

ÍNDICE	
ABSTRACT	10
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	20
1. CANCER: GENERALIDADES	20
2. DESARROLLO DE UN NUEVO MODELO DE PROGRESIÓN TUMORAL.....	20
3. PARALELISMO ENTRE LA ORGANIZACIÓN TUMORAL Y LA ORGANIZACIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL	38
4. INFLAMACIÓN CRÓNICA Y LA ALTERACIÓN DE LAS DEAMINASAS COMO MOTORES DE LA PROGRESIÓN TUMORAL	50
5. USO DE PROENZIMAS PANCREÁTICAS.....	65
HIPÓTESIS	70
OBJETIVOS	74
RESULTADOS	79
1. Eficacia antitumoral in vitro de PRP sobre CSCs de PDAC.....	79
2. Valoración del posible mecanismo de acción de la formulación PRP sobre las CSCs pancreáticas	83
3. Potencial antitumoral de la formulación PRP <i>in vivo</i>	101
DISCUSIÓN	111
CONCLUSIONS	128
CONCLUSIONES	130
BIBLIOGRAFÍA.....	133
PRIMER ARTÍCULO	156
SEGUNDO ARTÍCULO	156
TERCER ARTÍCULO.....	159
CUARTO ARTÍCULO	161

ABSTRACT RESUMEN

ABSTRACT

Cancer is the second most common cause of death in developed countries. Since only 10% of cancer deaths are caused by the primary tumour, the therapeutic challenge is the metastatic or secondary tumours, which are generated by the spread of cancer cells initiated by the loss of the adhesion molecules that hold the tumour within the original tissue. The lack of a universal and really effective treatment is due to the great heterogeneity of the pathology, verifiable not only between different types of tumours or between different patients with the same tumour type (inter-tumour heterogeneity), but also by the different cell subpopulations that inhabit the tumoral mass (intra-tumour heterogeneity). In fact, the subpopulation of cells with stem cell-like features, called cancer-stem cells (CSCs), found in most solid tumours, have been shown to lead to tumour initiation, progression and metastasis. Subsequently, therapies targeting CSCs are necessary in order to reduce tumour recurrence and spread.

Three main tumour development models have been described, the Stochastic model, the Hierarchic model and the Dynamic model. Nevertheless, neither of them manages to successfully explain the changing biology of the tumour and the interaction of the cellular and non-cellular components of the tumour microenvironment (TME). Here, to accurately explain tumour progression, we propose a crosstalk between chronic inflammation, deaminases dysregulation, intratumor genetic heterogeneity and cancer phenotypic plasticity. The new tumour development model proposed in this study does not contradict previously accepted tumour development versions, but unifies them in a unique model which may open up a window to interesting therapeutic approaches. In this thesis, we also reinforce the idea of the key role played by the TME in the promotion of drug resistance, the support of tumour progression, invasiveness, metastasis, and even the maintenance of a cancer stem-like phenotype. As a matter of fact, to improve the clinical management of cancer, it is crucial to understand and learn how to interpret the close interaction between TME and metastasis. In regards to this, we have reviewed TME formation, presenting it as a reflection of the tumour's own organization during the different stages of its progression. Interestingly, functionally distinct groups of

stromal cells, like cancer-associated fibroblasts (CAFs) or tumour-associated macrophages (TAMs), seem to have specific spatial distributions within the TME that change as the tumour evolves, which correlates with the fact that CSCs are located in the edges of solid tumour masses in advanced tumours. Moreover, the molecular basis of metastatic spread is also broached, with special emphasis on the site-specific pre-metastatic niche formation as another reflection of the primary tumour molecular signature.

Previous studies have shown the efficacy of Proteolytic enzymes in cancer therapy. Here, we present “PRP”, a combination of two pancreatic (pro)enzymes: Trypsinogen and Chymotrypsinogen A. We tested the effects of PRP on CSCs derived from the human pancreatic cancer cell line BxPC-3 both *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, exposure of pancreatic CSCs spheres to PRP resulted in a significant decrease of ALDH and specific pancreatic CSC markers (CD326, CD44 and CxCR4) signal tested by flow cytometry. Furthermore, CSCs markers expression was also analysed by western blot and immunofluorescence assays. PRP also inhibits primary and secondary sphere formation. Moreover, three RT2 Profiler PCR Arrays were used to study gene expression regulation after PRP treatment and resulted in: (i) epithelial-mesenchymal transition (EMT) inhibition; (ii) CSCs related genes suppression; (iii) enhanced expression of tumour suppressor genes; (iv) downregulation of migration and metastasis genes and (v) regulation of the MAP Kinase Signalling Pathway. In addition, we observed that PRP promotes the inhibition of several CSC-related pathways like WNT/ β -catenin, Hippo/YAP, Notch and TGF β . Briefly, our findings demonstrate that PRP treatment induces the up-regulation of RAC1b isoform which prevents the hyper-activation of the TGF β pathway (both the canonical axis through downregulation of phospho-SMAD2/3 and non-canonical axis through the reduction of phospho-p38). Such events may lead to the phosphorylation of YAP and subsequent inhibition of Hippo/YAP signalling, which could also explain the blockage of the canonical WNT/ β -Catenin pathway (shown by the mainly cytoplasmic location of β -Catenin) and the inhibition of the Notch signalling. Therefore, the modulation of TGF β , Hippo, WNT and Notch pathways could explain the disruption of the CSC phenotype and the EMT process found in treated cells. Finally,

we reported that PRP impaired engrafting of pancreatic CSC's tumours in nude mice and displayed an antigrowth effect toward initiated xenografts, making (pro)enzymes treatment a valuable strategy to reduce CSCs population for pancreatic cancer therapy. As cancer treatment moves towards more personalised medicine, proper therapies to specifically target and treat CSCs may prove to be vital in reducing recurrence after drug treatment failures.

RESUMEN

El cáncer es la segunda causa más común de muerte en los países desarrollados. Dado que el tumor primario causa sólo el 10% de las muertes por cáncer, el desafío a nivel terapéutico reside en el tratamiento de los tumores metastásicos o secundarios, que se generan por la diseminación de las células cancerosas que pierden las moléculas de adhesión que las mantienen dentro del tejido original. La falta de un tratamiento universal y realmente eficaz se debe a la gran heterogeneidad de la patología, comprobable no sólo entre diferentes tipos de tumores o entre diferentes pacientes con el mismo tipo de tumor (heterogeneidad inter-tumoral), sino también por las diferentes subpoblaciones celulares que habitan la masa tumoral (heterogeneidad intra-tumoral). De hecho, se ha demostrado que una subpoblación de células con fenotipo troncal, denominadas células madre cancerígenas (CSCs), lidera la iniciación, progresión y metástasis del tumor. Por ende, las terapias dirigidas a las CSC son necesarias para reducir la diseminación, la recurrencia del tumor y la mortalidad.

Actualmente, se han descrito tres modelos principales de desarrollo tumoral, el modelo estocástico, el modelo jerárquico y el modelo dinámico. Sin embargo, ninguno de ellos logra explicar con éxito la biología cambiante del tumor y la interacción de los componentes celulares y no celulares del microambiente tumoral (TME). En la presente tesis, para explicar con precisión la progresión del tumor, proponemos una integración de la inflamación crónica, la desregulación de las deaminasas, la heterogeneidad genética intra-tumoral y la plasticidad fenotípica del cáncer. El nuevo modelo de desarrollo tumoral propuesto en este estudio no contradice las versiones de desarrollo tumoral previamente aceptadas, sino que las unifica en un modelo único que puede abrir una ventana a enfoques terapéuticos interesantes. En esta tesis, también destacamos el papel clave que juega el TME en la promoción de la resistencia tumoral a fármacos, el apoyo a la progresión tumoral, a su capacidad invasiva, a la metástasis e incluso al mantenimiento de un fenotipo troncal. De hecho, para mejorar el manejo clínico del cáncer, es crucial comprender y aprender a interpretar la estrecha interacción entre el TME y la metástasis. En este sentido, hemos revisado los aspectos clave de la formación

del TME, presentándolo como un reflejo de la propia organización del tumor durante las diferentes etapas de su progresión. Curiosamente, los grupos funcionalmente distintos de células estromales, como los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) o los macrófagos asociados al tumor (TAMs), parecen tener distribuciones espaciales específicas dentro del TME que cambian a medida que evoluciona el tumor, lo que se correlaciona con el hecho de que las CSCs se localizan principalmente en los bordes de masas tumorales sólidas en tumores avanzados. Además, también se aborda la base molecular de la diseminación metastásica, con especial énfasis en la formación del nicho pre-metastásico en sitios específicos (como otro reflejo de la firma molecular del tumor primario).

Estudios previos han demostrado la eficacia de las enzimas proteolíticas como terapia contra el cáncer. En el presente trabajo, presentamos "PRP", una combinación de dos (pro)enzimas pancreáticas: tripsinógeno y quimotripsinógeno A. Se analizan los efectos de PRP en las CSCs derivadas de la línea celular de cáncer pancreático humano BxPC-3 tanto in vitro como in vivo. Curiosamente, la exposición de las esferas de CSCs pancreáticas al PRP resultó en una disminución significativa de la enzima aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) y de los marcadores específicos de CSCs pancreáticas (CD326, CD44 y CxCR4) analizados mediante citometría de flujo, Western Blotting y ensayos de inmunofluorescencia. PRP también inhibió la formación de esferas primarias y secundarias de CSCs. Además, se utilizaron tres matrices de qPCR para estudiar la regulación de la expresión génica tras del tratamiento con PRP y dieron como resultado: (i) inhibición de la transición epitelial-mesenquimal (EMT); (ii) supresión de genes relacionados con el fenotipo de CSC; (iii) expresión potenciada de genes supresores de tumores; (iv) regulación a la baja de genes de migración y metástasis y (v) regulación de la vía de señalización de la MAP quinasas. Además, observamos que el PRP promueve la inhibición de varias vías relacionadas con las CSCs como WNT/ β -catenina, Hippo/YAP, Notch y TGF β . Brevemente, nuestros hallazgos demuestran que el tratamiento con PRP induce la regulación al alza de la isoforma RAC1b, lo que evita la hiperactivación de la vía TGF β (tanto el eje canónico a través de la regulación a la baja de fosfo-SMAD2/3 como el eje no canónico a través de la reducción de fosfo-p38).

Dichos eventos podrían conducir a la fosforilación de YAP y la posterior inhibición de la señalización de Hippo/YAP, lo que también podría explicar el bloqueo de la vía canónica de WNT/ β -catenina (mostrado por la ubicación principalmente citoplasmática de β -catenina) y la inhibición de la Señalización de la vía Notch. Por lo tanto, la modulación de las vías TGF β , Hippo, WNT y Notch podría explicar el deterioro tanto del fenotipo CSC como del proceso EMT observado en las células tratadas. Finalmente, informamos que el PRP perjudicó la iniciación de tumores por parte de las CSCs pancreáticas en modelos de ratón inmunodeficientes con xenoinjertos tumorales y mostró un potente efecto bloqueador del crecimiento de xenoinjertos tumorales que sí se desarrollaron, lo que hace que el tratamiento con las (pro)enzimas pancreáticas sea una estrategia valiosa para reducir la subpoblación de CSCs en la terapia contra el cáncer de páncreas.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. CANCER: GENERALIDADES

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es, junto con las enfermedades cardiovasculares, una de las principales causas de muerte en el mundo. De hecho, los datos actualizados por la OMS en el 2023 son alarmantes, con alrededor de 10 millones de muertes anuales registradas [1]. En concreto, en esta tesis doctoral nos hemos centrado en el estudio del cáncer de páncreas. La incidencia y mortalidad de este tipo de neoplasia se ha duplicado e incluso triplicado en los últimos años [2]. Tomando como referencia la región geográfica de Estados Unidos entre 2014 y 2019, el cáncer de páncreas es estadísticamente el cuarto con mayor índice de mortalidad a pesar de su baja, aunque creciente incidencia (ocupa la posición número 10 a este respecto) [3], lo que constituye un indicativo de su elevada letalidad. En efecto, se pronosticó que el adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) podría alcanzar la segunda posición en el ranking de muertes asociadas al cáncer en el 2030 dada su creciente incidencia y letalidad [4]. No obstante, para poder mejorar el manejo clínico de esta patología, logrando un tratamiento personalizado, es imprescindible conocer la biología del cáncer y su evolución, que difiere según el paciente. Aunque se han descrito diferentes modelos de progresión tumoral, todos ellos parecen apoyarse en una simplificación excesiva de la enfermedad, lo que dificulta la translación hacia tratamientos efectivos. Por tanto, urge una mejor comprensión de las bases moleculares subyacentes del cáncer que nos permita establecer un modelo genérico y más fehaciente de progresión tumoral.

2. DESARROLLO DE UN NUEVO MODELO DE PROGRESIÓN TUMORAL

Uno de los mayores desafíos del cáncer es su enorme heterogeneidad, que obstaculiza sustancialmente la praxis clínica [5]. Como ejemplo representativo, se puede apreciar la amplia variedad de criterios de clasificación tomados en consideración por la

OMS a la hora de categorizar las diferentes neoplasias neuroendocrinas malignas. Entre dichos criterios podemos destacar el origen anatómico de la neoplasia, su grado de diferenciación (nivel de similitud entre la neoplasia y el tejido sano de origen atendiendo a características histológicas), su capacidad proliferativa, la expresión de biomarcadores específicos o la secreción de hormonas particulares [6]. Además, se ha mostrado que existe una gran variabilidad entre pacientes con el mismo tipo de neoplasia maligna (heterogeneidad inter-tumoral) e incluso entre diferentes regiones dentro de una misma masa tumoral (heterogeneidad intra-tumoral). Ejemplificando esta circunstancia, el estudio llevado a cabo por Neuperger y colaboradores, con pacientes y líneas celulares cancerígenas de adenocarcinoma pulmonar, muestra la variabilidad inter- e intra-tumoral en relación a la expresión de biomarcadores particulares [7]. De forma similar, en otra publicación centrada en el carcinoma de ovario también quedó reflejada la heterogeneidad inter- e intra-tumoral con respecto a variaciones genómicas, concretamente en la secuencia del exoma [8]. En este mismo estudio se puede apreciar que también existe cierta variabilidad (a nivel del exoma) entre los tumores primarios y las metástasis en un mismo paciente. Este grado adicional de variabilidad también ha sido observado en otros tipos de tumores como el cáncer de mama triple negativo con respecto a los perfiles de expresión genética [9], lo que tiene el potencial de provocar cambios significativos de comportamiento entre los tumores primarios y los metastásicos en relación al patrón de crecimiento, agresividad o progresión clínica. Un fenómeno parecido ha sido expuesto en otros estudios de cáncer de mama y páncreas en los que se aprecia que las células tumorales circulantes en la sangre (las responsables de la inducción de metástasis) exhiben un perfil de expresión de moléculas en su superficie diferente al de las células de los tumores primarios. Por consiguiente, anticuerpos dirigidos como tratamiento contra estas células circulantes no afectan a los tumores primarios [10]. Así pues, la mejor comprensión de los mecanismos subyacentes de la heterogeneidad tumoral parece erigirse como un factor clave en el proceso de mejorar el tratamiento de esta patología. En perspectivas de lograr semejante empresa, la diversidad intra-tumoral debe ser estudiada, haciendo un especial énfasis en la variabilidad a nivel de mutaciones y a nivel de fenotipos celulares. Considerando una

muestra representativa del primer ámbito, se ha identificado una acumulación de diferentes mutaciones en distintas regiones dentro de una misma masa tumoral de adenocarcinoma pulmonar [11]. De hecho, se han desarrollado modelos algorítmicos de predicción de la distribución espacial de mutaciones dentro de una misma aglomeración cancerígena. Una muestra de ello es el trabajo llevado a cabo, utilizando pacientes con carcinoma renal de células claras, por el grupo de Acosta para predecir la distribución de las mutaciones más frecuentes en este tipo de neoplasia maligna (mutaciones en los genes BAP1, PBRM1 y SETD2) que, además, tienen correlación con el pronóstico clínico [12]. Esta heterogeneidad intra-tumoral de alteraciones genéticas podría explicarse, al menos parcialmente, por la Teoría de Evolución Clonal (TEC) también conocida como el modelo estocástico de progresión tumoral. La TEC postula que los tumores primarios son originados por una célula sana diferenciada que desarrolla inestabilidad genómica, y por consiguiente mutaciones, convirtiéndose en una célula maligna diferenciada. Sucesivos ciclos de replicación de esta célula promueven el crecimiento del cáncer primario, así como la acumulación azarosa de diferentes mutaciones, generando la variabilidad de subclones tumorales en distintas regiones de la misma masa cancerígena. Posteriormente, las condiciones altamente selectivas a las que se ve sometido el tumor primario (hipoxia, la respuesta del sistema inmune o la aplicación de un régimen particular de tratamiento farmacológico) promueven la erradicación de los subclones más débiles y, paralelamente, la supervivencia de aquellos más agresivos y resistentes. Finalmente, serían estos últimos los que tendrían la capacidad de generar tumores metastásicos (más resistentes y agresivos) en una etapa más avanzada de progresión [13]. De hecho, incluso se han documentado estudios de progresión tumoral que asocian la distribución espacial no homogénea de mutaciones dentro de una masa tumoral con factores no aleatorios como el tipo de ventaja para la supervivencia que confieren determinadas mutaciones o las ratios de proliferación distintos entre los subclones tumorales localizados en el centro de una masa tumoral y los situados en la periferia [14]. Ciertamente, este razonamiento de progresión clonal podría explicar la heterogeneidad intra-tumoral a nivel mutacional e incluso las diferencias entre los tumores primarios y las metástasis. No obstante, esta hipótesis no

explica la existencia de células cancerígenas genéticamente homólogas con una funcionalidad distinta dentro de una misma masa neoplásica (heterogeneidad fenotípica intra-tumoral). En efecto, en la inmensa mayoría de tumores, siendo algunos ejemplos el PDAC [15], el cáncer hepatocelular [16] o el melanoma [17], pueden identificarse células cancerígenas diferenciadas y células cancerígenas pobremente diferenciadas, estas últimas definidas bajo la nomenclatura de “células madre cancerígenas” (del inglés: cancer-stem cells; CSCs). Concretamente, las CSCs se caracterizan por ser una subpoblación de células cancerosas con un fenotipo pluripotente poco diferenciado, con gran activación del proceso molecular de transición desde fenotipo epitelial hasta uno mesenquimal (del inglés: epithelial-to-mesenchymal transition; EMT), con un enorme potencial invasivo y metastásico y capaces de entrar en un estado de dormancia/quiescente no proliferativo [18]. Además, las CSCs expresan marcadores específicos, como son la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH1), el CD44 o el CD133 [19]. No obstante, la caracterización de CSCs por expresión de biomarcadores normalmente implica la medición de un conjunto de ellos de forma simultánea para alcanzar la precisión experimental necesaria. En efecto, la combinación de CD34+/CD38-/HLA-/DR-/CD71-/CD90-/CD117-/CD123+ ha sido empleada para distinguir CSCs leucémicas de células madre hematopoyéticas sanas [20]. Incluso a este nivel, la heterogeneidad tumoral también abarca a estas células ya que se pueden detectar diferentes subpoblaciones de CSCs en un mismo tipo de neoplasia maligna de acuerdo a la expresión de distintos biomarcadores. Por ejemplo, en el cáncer de mama se han descrito la coexistencia de 2 subpoblaciones principales de CSCs, CD44+/CD24- y la que expresa gran cantidad de ALDH, con diferentes grados de activación de rutas moleculares específicas [21]. Análogamente, otro trabajo sobre el glioblastoma caracterizó múltiples subgrupos de CSCs en base a diferentes parámetros como el fenotipo celular, el comportamiento funcional (respuesta a tratamiento), la secuenciación del transcriptoma y patrones de expresión de diferentes biomarcadores (CD44, CD133, SOX2, PTPRZ1 o ITGB8) [22]. De hecho, los autores observaron una correlación entre cada subgrupo y la evolución clínica de los pacientes. En concordancia con este fenómeno, otras investigaciones han determinado una correlación entre la expresión de

biomarcadores particulares por diferentes subpoblaciones de CSCs con la exhibición de características funcionales determinadas. De esta manera, se ha observado que CSCs quiescentes exhiben un perfil de expresión (CD44+/FBW7-/C-Myc-) distinto al exhibido por CSCs proliferativas (CD44+/FBW7-/C-Myc+) [23]. Como ejemplo adicional, en el cáncer de mama se ha señalado que las CSCs CD44+/ALDH1+ se asocian a un fenotipo altamente tumorigénico y quimio-resistente, mientras que las CSCs CD133+ se relacionan con un fenotipo altamente metastásico [24].

Por otra parte, el proceso EMT es un mecanismo de desdiferenciación fenotípica importante en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario o la reparación de tejidos [25]. En el contexto del cáncer, esta vía molecular ha sido objeto de gran interés debido a su estrecha relación con la progresión, agresividad, metástasis y resistencia a quimioterapia de la enfermedad [26]. Las células tumorales con fenotipo epitelial/diferenciado que entran en la ruta EMT sufren cambios morfológicos que ocasionan la pérdida de su polaridad apico-basal y de su adherencia a la membrana basal (pérdida de anclaje celular) [27]. En consonancia con este fenómeno, se ha mostrado ampliamente que las CSCs se caracterizan por adquirir una morfología redondeada apolar, la habilidad de formar estructuras esféricas, así como la capacidad de supervivencia/proliferación en suspensión [28]. Relacionado con el anclaje celular, el proceso EMT promueve la pérdida/bajada de expresión de marcadores epiteliales que actúan como moléculas de adhesión, relacionadas con las uniones intercelulares, tales como la E-Cadherina o la ocludina entre otras [29]. De hecho, la E-Cadherina merece un énfasis particular dada su participación en un tipo de unión intercelular estrecha comúnmente conocida como “tight junction” que desempeña un papel de especial relevancia en el mantenimiento y morfogénesis de las células epiteliales [30]. Paralelamente, factores de transcripción asociados con un fenotipo poco diferenciado/mesenquimal (marcadores EMT) experimentan una activación significativamente alta, siendo algunos ejemplos SNAI1 (SNAIL), SNAI2 (Slug), Twist, Zeb1 o la N-Cadherina [31]. Adicionalmente, la puesta en marcha del proceso EMT también suele estar asociada a la activación de ciertas rutas moleculares, tales como RTKs, TNF α , Notch, Hedgehog, WNT, TGF β [32]. Cabe mencionar que la vía

molecular EMT no es tan simple como un mero “puente” entre 2 únicos estados celulares fenotípicos (epitelial/mesenquimal), sino que se ha documentado la existencia de múltiples estados intermedios. Una muestra de dicho fenómeno queda reflejada en el estudio llevado a cabo por Alan y colaboradores que demostró que la inhibición de la expresión de la E-Cadherina en células madre pluripotentes no es suficiente por sí sola para desencadenar un proceso EMT completo, sino que las células alcanzan un estado intermedio a través de un EMT parcial [33]. De forma equivalente, otro trabajo sobre cáncer de pulmón ha mostrado diferentes etapas dentro del proceso EMT en lo concerniente a la organización de las fibras del citoesqueleto, así como la presencia de células cancerosas con un estado epitelial/mesenquimal intermedio [34]. Referente a la dormancia celular, las CSCs tienen la habilidad de entrar en un estado no proliferativo/quiescente que les confiere una gran resistencia a los tratamientos antitumorales convencionales de radioterapia o quimioterapia (que atacan principalmente a células altamente proliferativas). Asimismo, este evento también hace a las CSCs las responsables de la recurrencia de la enfermedad tras la aplicación de un régimen de tratamiento quimioterápico particular [35]. En efecto, el desarrollo de resistencia a la quimioterapia, característica no exclusiva de las CSCs, es uno de los principales motivos del fracaso del tratamiento, de la baja supervivencia y del avance descontrolado de la enfermedad [36]. Otra propiedad importante de las CSCs reside en su potencial de autorrenovación y su alta capacidad iniciadora (de Novo) de tumores [37].

Precisamente a causa de todas estas propiedades tan destacables se estableció otro modelo de desarrollo tumoral conocido como el modelo jerárquico. De acuerdo a este modelo, la génesis de un tumor comienza cuando se producen mutaciones en una célula madre sana de tal manera que se evaden los mecanismos de regulación celular y pasa a ser una CSC. Posteriormente, esta CSC, mediante ciclos de división asimétrica, tiene la capacidad de originar un tumor junto con todos los tipos de subpoblaciones intra-tumorales de células cancerígenas con diferentes grados de diferenciación [38]. Esta hipótesis explica la heterogeneidad intra-tumoral a nivel funcional/fenotípico, los resultados experimentales relativos a las propiedades de las CSCs e incluso los eventos

de metástasis y recurrencia de la enfermedad tras un tratamiento, pero ignora la variabilidad genética previamente descrita. Adicionalmente, también presenta la limitación de considerar el fenotipo de las CSCs como una disposición estable y duradera en el tiempo, lo que entra en conflicto con observaciones realizadas en múltiples trabajos que muestran la adquisición de fenotipo troncal por células cancerosas diferenciadas [39][40]. En virtud de estos hallazgos, se definió la teoría dinámica de progresión tumoral muy similar al modelo jerárquico, pero con la diferencia de que se afirma que el fenotipo de las células cancerosas no es estable en el tiempo, sino que es mucho más flexible que lo establecido por el modelo precedente. En efecto, este otro modelo recalca la plasticidad fenotípica de las CSCs condicionada, en gran medida, por el tipo de señalización procedente del estroma que rodea al tumor (del inglés: tumour microenvironment; TME) [41] (Figura 1).

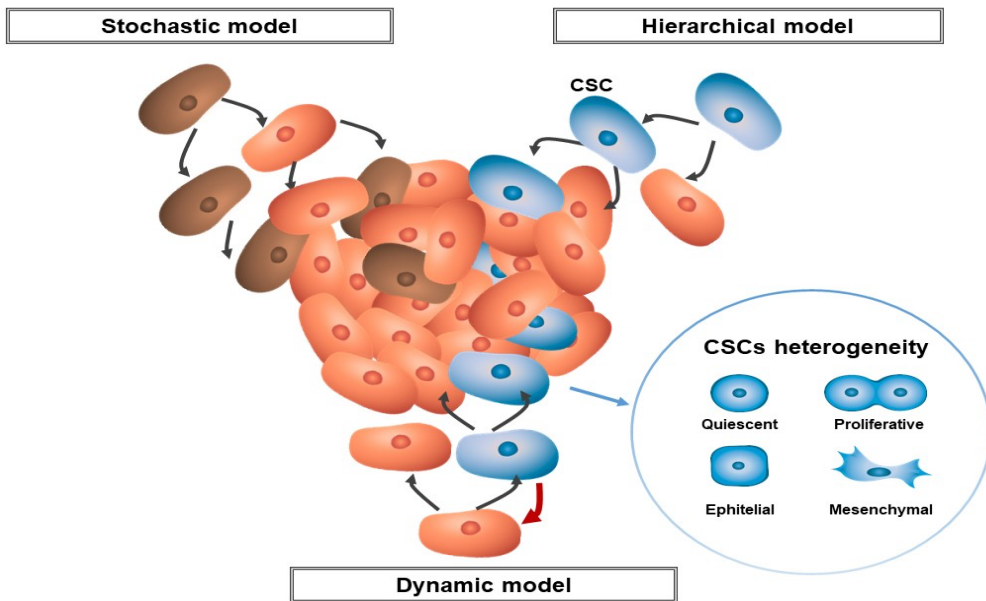


Figura 1: Representación esquemática de los 3 modelos que describen la iniciación y crecimiento tumoral. El modelo estocástico muestra que cualquier célula dentro de la masa tumoral puede haber originado el crecimiento neoplásico. La existencia de subclones tumorales genéticamente distintos dentro de una misma masa cancerígena se explica por la acumulación azarosa de una variedad de mutaciones tras cada ciclo de replicación celular (Teoría de Evolución

Clonal; TEC). La teoría jerárquica afirma que sólo una subpoblación de células tumorales con fenotipo troncal (células madre cancerígenas; CSCs) son las responsables de la génesis y desarrollo tumoral. Ciclos de replicación celular asimétrica sucesivos promueven la generación de las distintas subpoblaciones tumorales con fenotipo diferenciado dentro de una masa neoplásica. El modelo dinámico está basado en la teoría jerárquica y postula que células cancerígenas con fenotipo diferenciado pueden adquirir un fenotipo troncal y convertirse en CSCs, remarcando con ello la plasticidad fenotípica de las células tumorales, así como la heterogeneidad de las propias CSCs (Figura tomada de [42]).

El TME de los tumores sólidos está formado por 3 componentes principales: el componente celular, una matriz extracelular y factores solubles (citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento). También son destacables otras estructuras como la existencia de vasos linfáticos que permiten las metástasis de la enfermedad en los nódulos linfáticos [43], una red vascular anormal que puede derivar en alteraciones en el suministro de oxígeno [44], e incluso se ha documentado la presencia de un componente neural en el TME y una invasión tumoral implicada en el crecimiento de la neoplasia en cuestión [45]. Ciertamente, semejante complejidad estructural y funcional del TME puede explicarse, al menos en parte, por la inducción de angiogénesis y linfangiogénesis observadas durante el crecimiento tumoral [46]. Concerniente al componente celular del TME, se ha reportado la presencia de una variedad de tipos celulares, incluyendo las células madre mesenquimales [47], adipocitos, fibroblastos y células inmunes como linfocitos y macrófagos [48]. Llamativamente, este último estudio destaca una correlación entre la composición celular del TME y la fase de progresión tumoral, así como con la evolución clínica de la enfermedad. La conformación del TME en los alrededores del tumor primario permite el establecimiento de un nicho con el objetivo de facilitar y promover el crecimiento, la capacidad invasiva y el desarrollo del tumor [49]–[51]. A este respecto, los 2 tipos celulares con mayor protagonismo en los últimos años son los fibroblastos (del inglés: cancer-associated fibroblasts; CAFs) y los macrófagos (del inglés: tumour-associated macrophages; TAMs) por su estrecha implicación en la inducción del crecimiento, progresión y agresividad tumoral [52][53]. En particular, algunas neoplasias malignas, incluyendo los tumores pancreáticos, de

mama o próstata, destacan por su TME altamente fibrótico con gran cantidad de CAFs mientras que otros, tales como los tumores cerebrales, renales o de ovario, no presentan tal fibrosis, pero si una mayor proporción de TAMs [54]. Resulta de especial trascendencia la capacidad, tanto de los CAFs [55] como de los TAMs [56], para estimular el proceso EMT junto con la adquisición de un fenotipo de CSC por parte de las células cancerígenas diferenciadas puesto que dicho fenómeno queda claramente enmarcado en connivencia con el modelo dinámico expuesto con anterioridad. De acuerdo a estos datos, resultaría tentador asumir que la activación del proceso EMT en las células tumorales está inevitablemente asociado a la adquisición de un fenotipo CSC. De hecho, muchas de las rutas moleculares anteriormente relacionadas con el proceso EMT también están estrechamente vinculadas a las CSCs (TGF β , Notch, WNT o Hedgehog) [57]. No obstante, es necesario matizar que existe cierto grado de independencia entre el proceso EMT y el fenotipo CSC. De hecho, estudios de cáncer hepatocelular y cervical determinaron que la adquisición de fenotipo CSC mediante la inducción de la ruta EMT consta de 2 fases diferenciadas. En la primera fase, la IL6 procedente del TME estimula el proceso EMT, mientras que en la segunda el factor TGF β 1 promueve la adquisición de marcadores de fenotipo CSC tales como el CD44 [58], [59]. Por otra parte, se ha esclarecido que el componente celular del TME no es el único que tiene la capacidad de alterar el comportamiento/fenotipo de una masa tumoral. Por ejemplo, se ha determinado que la adherencia de las células tumorales al colágeno tipo I (componente principal de la matriz extracelular de los tumores sólidos) provoca una inducción del proceso EMT y, por tanto, tiene una influencia significativa en la agresividad tumoral [60]. De hecho, algunos tipos de neoplasias malignas como los tumores pancreáticos se caracterizan precisamente por tener una matriz extracelular/estroma altamente fibrótico con grandes cantidades de colágeno [61]. De forma similar, un estudio llevado a cabo por el grupo de Yu postuló que las condiciones de hipoxia en el cáncer pulmonar condicionan el contenido de los exosomas derivados de las células malignas. Estos exosomas en particular provocaron la polarización de los TAMs en el TME hacia un fenotipo que incitaba la progresión de la enfermedad con especial énfasis [62]. Atendiendo a estas circunstancias, no es de extrañar que las propias

células cancerígenas participen activamente en la configuración del TME. Una muestra de ello podría ser la influencia de las células cancerígenas sobre el comportamiento de células madre mesenquimales de la médula ósea, observado en una investigación de cáncer de cabeza y cuello, que desencadenó su reclutamiento para formar parte del TME [63]. Del mismo modo, otros estudios presentan pruebas del reclutamiento de TAMs mediante la expresión de factores como GM-CSF [64]. Cabe resaltar que la formación del TME no cumple el único objetivo de generar un nicho favorable para el crecimiento tumoral, sino que también tiene la función adicional de anular el potencial antitumoral del estroma sano. En esta línea, se ha documentado la capacidad de las células tumorales de “corromper” a los fibroblastos sanos (con funciones supresoras de tumores) hasta CAFs que desempeñan un papel de soporte del crecimiento neoplásico [65]. En otras palabras, el proceso de generación del TME podría entenderse como la conversión de “enemigos” en “aliados”.

Actualmente, no hay un verdadero consenso sobre cuál de los 3 modelos anteriores (estocástico, jerárquico o dinámico) representa mejor la progresión tumoral. Ciertamente, pueden destacarse algunos detalles llamativos que, a priori, no parecen cuadrar con ellos. En el caso del modelo jerárquico, las CSCs serían las que originarían el tumor primario de Novo, por lo que cabría suponer que el punto inicial del desarrollo tumoral sería una CSC sin que previamente hubiera ningún tipo de actividad maligna. No obstante, la teoría dinámica expuesta anteriormente no casaría bien con esta suposición puesto que afirma que una célula cancerosa diferenciada puede adquirir un fenotipo de CSC y, por tanto, asume el estado de CSC como una consecuencia de la actividad tumoral y no como un preludio de la misma. En este contexto, si las CSCs fueran el origen del tumor primario cabría esperar que dicho tumor exhibiera una organización jerárquica (con la presencia tanto de células tumorales diferenciadas como de CSCs) desde etapas tempranas de su evolución. Sorprendentemente, se han publicado estudios, de cáncer colorrectal, donde dicha organización jerárquica sólo se aprecia en las etapas finales de evolución del tumor primario y en las metástasis, pero no en las primeras etapas del desarrollo neoplásico [66], [67]. Otro detalle que contrasta con la teoría jerárquica es el hecho de que se ha señalado que alrededor del 90% de los cánceres

se originan en tejidos epiteliales (con células diferenciadas) [68]. Adicionalmente, parece razonable hipotetizar que la localización de las CSCs más acorde con su supuesta capacidad iniciadora de la progresión neoplásica debería ser una posición relativamente centrada en el interior de una masa cancerígena sólida, alrededor de la cual el tumor primario iría creciendo y expandiéndose. Sin embargo, numerosos estudios han matizado que las CSCs usualmente se localizan, en su mayoría, en los bordes de las masas tumorales sólidas (frente invasivo). Podemos encontrar referencias de este evento en varios tipos de cáncer, siendo algunos ejemplos representativos el cáncer de ovario [69], el carcinoma urotelial [70], el carcinoma hepatocelular [71] o el glioblastoma [72]. Es cierto que se podría aludir a la gran capacidad migratoria y metastásica de las CSCs para explicar este cambio de localización desde el centro de una masa tumoral a los bordes. No obstante, resulta llamativo que la mayoría de las CSCs, no sólo algunas de ellas, se posicionen en los bordes. De hecho, esta alusión a una posible migración de las CSCs queda aún más en entredicho al considerar un artículo de cáncer de ovario que puntualiza que las CSCs localizadas en los bordes exhiben una capacidad migratoria e invasiva incluso menor que los otros tipos de células cancerosas diferenciadas de la misma masa tumoral [69]. Por el contrario, la localización particular de las CSCs en los bordes de una masa tumoral sí que podría ser esclarecida con otro tipo de argumentación en concordancia con el modelo dinámico. Se podría señalar que los límites de una aglomeración cancerígena exhiben ciertas condiciones específicas que promueven la adquisición de un fenotipo CSC por parte de las células tumorales con fenotipo diferenciado establecidas en esta región. Una muestra de ello sería la variación de la densidad celular y, por ende, de los estímulos físicos de adhesión intercelular con respecto al centro de la masa cancerígena [72]. Análogamente, es razonable suponer que las células ubicadas en los bordes de una masa tumoral estarían físicamente más expuestas a los factores derivados del TME circundante y, en consecuencia, serían más propensas a sufrir un cambio fenotípico (por ejemplo, tras la inducción del proceso EMT).

A continuación, procede hacer hincapié en el proceso de metástasis y comentar ciertas peculiaridades en comparación con la formación de los tumores primarios. No en

vano, la metástasis es una de las principales causas de muerte relacionadas con el cáncer, aunque aún es un proceso en vías de comprensión [73]. Lo que sí se ha especificado como fenómeno común en prácticamente todas las metástasis es el acaecimiento de profundos cambios de la expresión genética de las células metastásicas, definido como el “programa básico de expresión genética de la metástasis” [74]. Dicho programa genético engloba una plétora de cambios en genes relacionados con la remodelación tisular, la inhibición de la interacción entre las células malignas y la matriz extracelular, la alteración de la homeostasis de iones o la inducción del metabolismo oxidativo. Curiosamente, cada vez más estudios confieren mayor importancia a los cambios epigenéticos, en lugar de las mutaciones en el ADN, como responsables de la adquisición de un fenotipo metastásico por parte de las células cancerígenas del tumor primario. Una muestra de ello podría ser el silenciamiento del gen GATA6 por acción del miR-27a que se ha reportado en un trabajo de cáncer pancreático [75]. En resumen, la metástasis consta de varias etapas importantes: i) el desprendimiento de células cancerígenas del tumor primario. En esta primera etapa, la adquisición de fenotipo no diferenciado/mesenquimal a través del proceso EMT juega un papel central puesto que no sólo acontecen cambios genómicos o transcriptómicos, sino que también se producen cambios relevantes en las propiedades mecánicas de las células en cuestión [76]; ii) Las células desprendidas de la masa neoplásica primaria llegan al torrente sanguíneo, se convierten en células tumorales circulantes (CTCs) que se mantienen en un estado quiescente no proliferativo durante un tiempo indefinido y forman aglomeraciones celulares con células sanguíneas como las mieloides. En dichas aglomeraciones, las CTCs pueden condicionar el comportamiento de los otros tipos celulares, lo que en última instancia favorece la capacidad metastática de las propias CTCs, así como su protección frente al sistema inmune [77]. Del mismo modo, se ha descrito que las células mesenquimales como los CAFs del estroma del cáncer primario también acompañan y forman parte de las aglomeraciones heterogéneas de CTCs sanguíneas, facilitando la diseminación de la enfermedad [78]; iii) Colonización del tejido objetivo, proliferación y formación de la metástasis. En dicha etapa, cabe destacar el papel clave de la transición desde un fenotipo mesenquimal a uno epitelial (del inglés: Mesenchymal-to-Epithelial

transition; MET), un mecanismo molecular opuesto al proceso EMT, en la extravasación y consiguiente proliferación de las CTCs [76]. Sin embargo, la colonización exitosa de un tejido por parte de las CTCs requiere de la existencia previa en dicho tejido del llamado nicho pre-metastásico (NP). Ejemplos de ello los podemos encontrar en múltiples tipos de tumores como el cáncer gástrico [79], cáncer de mama [80], cáncer de ovario [81] o tumores pancreáticos [82]. De hecho, ya desde la década de los 70 se observó que la colonización metastásica no era un proceso totalmente aleatorio, sino que parecía estar intrínsecamente dirigido y ser independiente de las condiciones del flujo sanguíneo [83]. En la formación del NP se ha identificado el papel fundamental de las vesículas extracelulares procedentes de las células cancerígenas del tumor primario. Una muestra de ello la apreciamos en el estudio dirigido por el grupo de Huang en el que se determinó, tanto *in vitro* como *in vivo*, que vesículas extracelulares derivadas de células malignas de cáncer de mama tenían la capacidad de modificar y “educar” a los osteoblastos para fomentar la formación de un NP en el hueso y, por ende, la diseminación de la enfermedad a este tejido. Específicamente, los autores detectaron la presencia de CDH11 y ITGA5 en las mencionadas vesículas extracelulares, así como su rol en la creación de un ambiente permisivo en el hueso para su futura colonización [84]. Otro caso queda representado en un trabajo que remarcó el potencial de los exosomas tumorales para influir en los fibroblastos y linfocitos T reguladores del pulmón para promover el establecimiento de un NP en este tejido [85]. Adicionalmente, se ha revelado que las células malignas del tumor primario pueden activar a los fibroblastos y pericitos (induciéndoles un fenotipo proinflamatorio) del NP a través de las citoquinas y exosomas liberados a la sangre, a posteriori promoviendo una remodelación de la matriz extracelular del futuro tejido metastásico mediante la destrucción y degradación del colágeno [86]. La alteración del comportamiento de los pericitos expuesta en el artículo anterior se encuentra en consonancia con otras publicaciones describiendo que la inflamación es, precisamente, un estímulo para que las células endoteliales vasculares del NP expresen mayor cantidad de moléculas de adhesión, como VCAM-1, ICAM-1 o E-Selectina, favoreciendo la adhesión y extravasación de las CTCs para finalmente completar la metástasis [73]. En el mismo ámbito, otras investigaciones han

puntualizado la remodelación de la red vascular circundante al NP mediante la promoción de la angiogénesis y la permeabilidad vascular [87]. En este mismo estudio, cabe destacar la participación activa no sólo de las propias células tumorales, sino también de los CAFs procedentes del TME de la neoplasia primaria en la formación del NP (Figura 2).

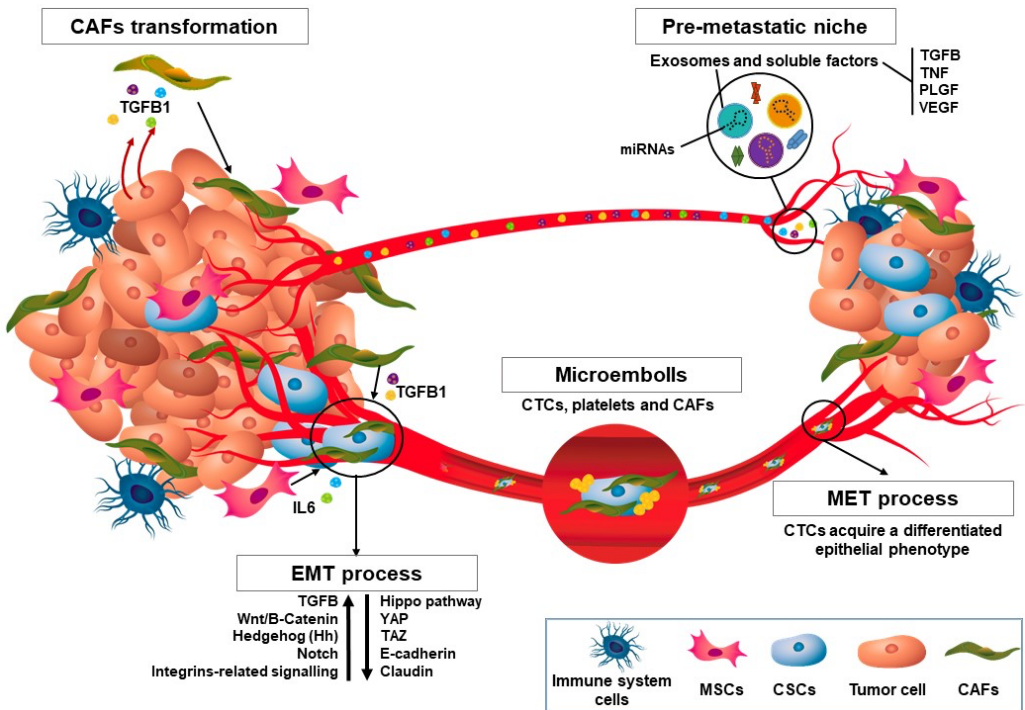


Figura 2: Representación del microambiente tumoral y el proceso metastásico. Los tumores están constituidos por una gran variedad de tipos celulares incluyendo células neoplásicas con fenotipo diferenciado, CSCs, células del sistema inmune, células madre mesenquimales (MSCs) y fibroblastos. La liberación de factores de crecimiento y citoquinas por parte de las células cancerígenas inducen la transformación de las células estromales sanas, tales como MSCs o fibroblastos, en MSCs “malignificadas” o CAFs, que tienen un fenotipo que apoya al crecimiento tumoral. Estas células estromales corrompidas secretan una amplia gama de factores solubles que inducen el proceso EMT en las células neoplásicas. Dicho proceso molecular permite a las células malignas, destacándose las CSCs, escindir del tumor primario, llegar a los vasos sanguíneos por un proceso de intravasación y viajar por un tiempo indefinido en el torrente circulatorio

(transformándose en CTCs). Finalmente, estas CTCs salen de la circulación sistémica por un proceso de extravasación y colonizan un órgano para originar el crecimiento de la metástasis. En dicho órgano debe existir un nicho apropiado para tal fin (nicho pre-metastásico; NP) que ha sido previamente establecido por los factores solubles y exosomas liberados por el tumor primario y su microambiente (Figura tomada de [42]).

Así pues, todos estos datos en conjunto podrían sugerirnos cierta similitud entre la formación del TME de la masa cancerígena primaria y la formación del NP. En efecto, se podría tomar como referencia un estudio de cáncer de próstata que corrobora las semejanzas entre el TME del tumor primario y el NP [88], como si éste último pudiera considerarse una clase de “TME a distancia”. De hecho, se ha revelado que la formación del NP comienza, al igual que la generación del TME primario, en las primeras etapas del desarrollo de la masa cancerígena primaria [89]. A pesar de estas similitudes observadas entre los tumores primarios y la biogénesis de las metástasis, también se pueden apreciar diferencias ciertamente significativas. Por ejemplo, se pueden observar divergencias, en diferentes niveles, entre los CAFs del tumor primario y los fibroblastos asociados a las metástasis. En cuanto al mecanismo de generación/corrupción, se ha discernido que los CAFs del TME primario son generados principalmente por factores solubles como ACTA, PDGF, MMP7, Sonic hedgehog (shh), YAP1 o prograssin, mientras que los fibroblastos asociados a las metástasis son corrompidos principalmente por contenido exosómico incluyendo microARNs tales como miR-494, 31, 214 o 255 [90]. En otro nivel, se ha determinado que el TME de las neoplasias primarias normalmente posee una gran heterogeneidad de CAFs en cuanto a expresión de biomarcadores (α SMA, fibronectina, FGFR1 y FAP) y distintos grados de activación de la ruta TGF β (diferentes niveles de fosforilación de SMAD2), mientras que los fibroblastos asociados a las metástasis suelen constituir una población más homogénea con alta expresión de α SMA y alta fosforilación de SMAD2 [91]. En el mismo orden de razonamiento, se ha desvelado que los CAFs del tumor primario exhiben una capacidad para modular al sistema inmune del huésped de forma distinta en comparación a los fibroblastos asociados a la metástasis [92]. Otro ejemplo es el trabajo en el que se reporta la alteración en las proporciones de distintos subgrupos de CAFs y TAMs del TME entre

el carcinoma oral de células escamosas primario y sus metástasis en nódulos linfáticos [93]. Adicionalmente, en dicha investigación se propone la preponderancia de rutas moleculares específicas en diferentes fases de progresión del cáncer (fase primaria y fase metastásica). Además, previamente se ha señalado que esta heterogeneidad incluso se extiende a las propias células cancerígenas en lo que respecta a variaciones en la expresión de biomarcadores en tumores primarios, CTCs y metástasis o en la agresividad y patrones de comportamiento. Tal y como se ha mencionado con anterioridad, este tipo de diferencias podría explicarse parcialmente con la adquisición progresiva de mutaciones favorables para la supervivencia celular durante la progresión de la neoplasia primaria (Teoría de Evolución Clonal; TEC). No obstante, se han llevado a cabo trabajos en los que la inoculación intracardiaca de células de cáncer de mama ER+/PGR+/CK5- en ratones inmunodeprimidos y sin ser tratados con ningún tipo de fármaco induce la generación de metástasis con un perfil ER-/PGR-/CK5+ resistentes a terapia hormonal [94]. En este caso particular, la TEC no alcanza a explicar la aparición de semejantes diferencias puesto que en los ratones utilizados no existiría ningún tipo de selección farmacológica de subclones tumorales más resistentes. De hecho, tampoco cabe suponer la participación de una selección por parte del sistema inmune en un ratón inmunodeficiente. Mas acorde, se podría sugerir que la neoplasia primaria podría estar generada por un tipo celular distinto al que promueve con posterioridad la formación de los tumores metastásicos. Precisamente, esta misma hipótesis ya ha sido propuesta en estudios previos [95]. Reforzando semejante postulado, existen otras investigaciones más recientes en las que se identifican diferentes subpoblaciones celulares en el tumor primario de melanoma. Entre ellas, se detectó una en particular con fenotipo mesenquimal que parecía no contribuir al crecimiento de la neoplasia primaria pero, por el contrario, exhibía gran capacidad para iniciar el establecimiento de las metástasis [96].

En virtud de todas estas discordancias con los modelos de progresión tumoral tradicionalmente aceptados, nuestro grupo publicó un estudio que aúna las 3 teorías anteriormente descritas en un nuevo y único modelo de progresión de neoplasias malignas sólidas. En dicho modelo alternativo, se propone que los tumores primarios

son generados por células sanas bien diferenciadas que desarrollan inestabilidad genómica y se convierten células cancerosas diferenciadas. Sucesivos ciclos de replicación de dichas células malignas promueven el crecimiento del tumor primario, así como la generación de la mencionada heterogeneidad intra-tumoral a nivel de mutaciones (de acuerdo al modelo estocástico). En una etapa más avanzada de la carcinogénesis, las células tumorales diferenciadas localizadas en los bordes de la masa cancerígena sólida adquieren un fenotipo de CSC mediante la inducción del proceso EMT de acuerdo al modelo dinámico y en virtud de las señales procedentes del TME circundante (los extremos de las masas tumorales sólidas están físicamente más expuestos a la señalización derivada del TME). Finalmente, estas CSCs migran, entran en el torrente circulatorio (pasando a ser CTCs) y, en última instancia, promueven el establecimiento y crecimiento de metástasis. La formación de las metástasis estaría en concordancia con el modelo jerárquico y la alta capacidad de las CSCs para iniciar el crecimiento tumoral de Novo. Dicho de otro modo, las CSCs en realidad serían el siguiente paso en la evolución de las células cancerosas diferenciadas del cáncer primario en vez de ser su punto de origen, circunstancia que sí ocurriría en el caso de los tumores metastásicos [42] (Figura 3).

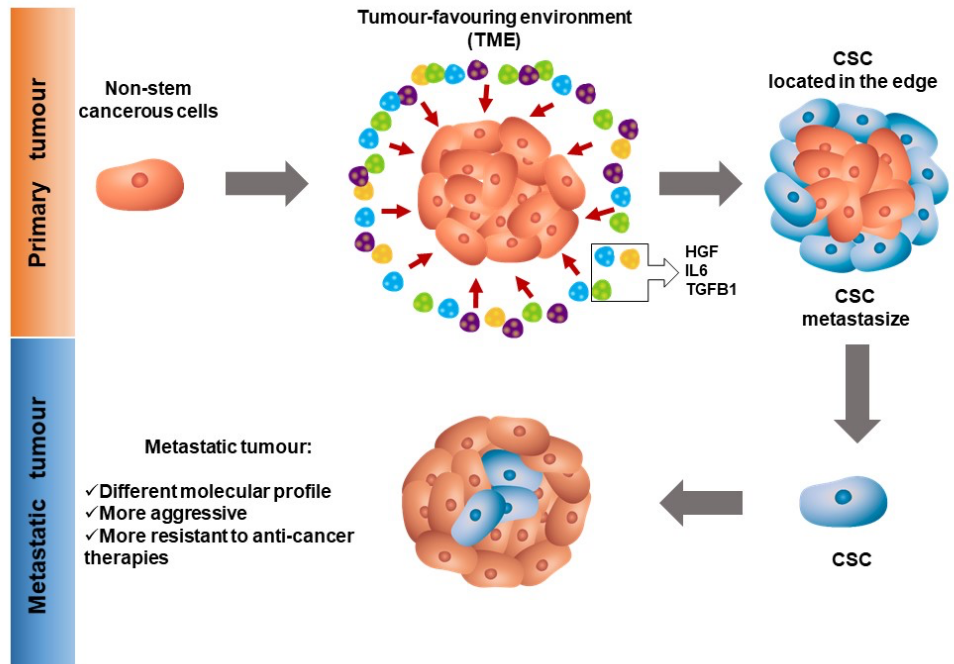


Figura 3: Nuevo modelo alternativo de progresión tumoral. Este modelo establece que el tumor primario es originado por una célula maligna diferente a las CSCs, con fenotipo no troncal (o un pequeño grupo de ellas). Mientras la neoplasia primaria crece (de forma acorde al modelo estocástico), también promueve la transformación de las células estromales circundantes para inducir así la generación del TME. La participación de múltiples factores, como citoquinas o miARNs (círculos morados), secretados por el TME desencadenan la adquisición de un fenotipo troncal por parte de las células malignas situadas en los bordes de la masa tumoral, que se convierten en CSCs en consonancia con el modelo dinámico. Estas CSCs tienen la capacidad de dejar el tumor primario, entrar en el torrente circulatorio y finalmente colonizar un órgano distante para generar la metástasis (en congruencia con lo establecido por el modelo jerárquico). Por lo tanto, el tipo celular responsable del origen de la neoplasia primaria es distinto al que se le atribuye el crecimiento de la metástasis (Figura tomada de [42]).

Es cierto que este modelo de progresión tumoral alternativo podría, a priori, contrastar con la gran capacidad de las CSCs como punto de inicio del crecimiento tumoral ampliamente comprobado en ensayos de laboratorio. Sin embargo, se ha de resaltar que la emergencia de un cáncer primario en el cuerpo no queda bien representada

en los ensayos de laboratorio en los que se inyectan a los ratones CSCs como fuente celular iniciadora de tumores. En este tipo de procedimiento, las CSCs deben colonizar y adaptarse a un ambiente tisular extraño, el del ratón; proceso que guarda homología con la generación de tumores metastásicos, pero no con el proceso de iniciación de tumores primarios. De hecho, en la formación biológica de una neoplasia primaria una célula sana acumula cierto número de mutaciones y se convierte en una célula maligna que, por otra parte, aún guarda un alto grado de similitud con la célula sana de la que procede. Por ende, dicha célula cancerígena primaria ya se encuentra razonablemente adaptada a las condiciones del tejido que la rodea, circunstancia diferente a las condiciones de laboratorio previamente descritas. En efecto, se ha comprobado que las CSCs tienen la mayor capacidad iniciadora de tumores, pero, en este contexto, sería importante especificarlo: “las CSCs tienen la mayor capacidad de iniciación de tumores metastásicos”, afirmación que encaja a medida con las propiedades migratorias, invasivas y metastásicas de las CSCs previamente indicadas. Adicionalmente, el modelo de desarrollo tumoral descrito encajaría fuertemente con la localización de las CSCs en los bordes, así como con las diferencias entre los tumores primarios y las metástasis reportadas con anterioridad puesto que la célula de origen del cáncer primario (célula con fenotipo diferenciado) sería distinta a la que originaría la metástasis (CSC).

3. PARALELISMO ENTRE LA ORGANIZACIÓN TUMORAL Y LA ORGANIZACIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

Es importante resaltar que la organización funcional y espacial particular de las células malignas en el tumor primario, establecida en nuestro modelo, también se encuentra en concordancia con la organización del TME circundante. Al igual que las células tumorales, se puede vislumbrar una heterogeneidad significativa en el componente celular del TME destacando a los CAFs y TAMs. En lo referente a los CAFs, una variedad de estudios han destacado su identificación mediante el análisis de una gama de biomarcadores como FAP α , PDGFR, vimentina, α SMA [97], FSP1, fibronectina o HHF35 [98]. Tal heterogeneidad de CAFs podría atribuirse a la plétora de subtipos tumorales distintos, así como a los diferentes precursores celulares de los CAFs.

Ciertamente, se ha expuesto que las células malignas pueden desencadenar la transformación en CAFs de diferentes tipos celulares, siendo algunos ejemplos los fibroblastos sanos residentes en el tejido en cuestión, células epiteliales, células endoteliales [99], los pericitos [100] o las células madre mesenquimales [101]. Subrayando esta idea, se pueden encontrar estudios que afirman que la naturaleza del precursor celular específico tiene la capacidad de condicionar el perfil molecular del CAF final [102]. Tomando en consideración la variedad de biomarcadores y la posibilidad de que un único CAF exprese varios de ellos simultáneamente, no es de extrañar que la clasificación de CAFs en distintas subpoblaciones, basadas en sus perfiles de expresión genética, no siempre concuerde entre diferentes estudios centrados en distintos tipos de cánceres e incluso entre diferentes pacientes con el mismo tipo de neoplasia maligna [103], [104]. Peculiarmente, estas disposiciones cabrían interpretarse como un pequeño reflejo de la enorme heterogeneidad de los tumores de acuerdo a mutaciones genéticas o a perfiles de expresión moleculares. Por otra parte, es posible discernir otro paralelismo entre la heterogeneidad de células tumorales y la variedad de subtipos de CAFs. Numerosas investigaciones en múltiples tipos de neoplasias, incluyendo el cáncer colorrectal [105], el adenocarcinoma pulmonar [106], neoplasias pancreáticas [107] o cáncer cervical [108], han evidenciado la existencia de varios subgrupos de CAFs funcionalmente distintos, destacándose los CAFs proinflamatorios (iCAF) y los CAFs con fenotipo de miofibroblastos (mCAF). Curiosamente, se ha señalado que los iCAF se asocian principalmente a la promoción de la proliferación de las células tumorales [109], mientras que los mCAF se asocian fundamentalmente a la promoción de la capacidad invasiva, metastásica y del fenotipo troncal en las células malignas [110]. En particular, Pelon y sus colaboradores fijaron α SMA como un biomarcador global característico de los mCAF. En la misma línea, la fibronectina y la calponina también han sido encuadradas como marcadores de los mCAF [111]. Por ende, podrían asociarse los iCAF con las células tumorales diferenciadas y los mCAF con las CSCs. Reforzando esta idea, se ha de notar que los miofibroblastos se encuentran estrechamente relacionados con la cicatrización de heridas [112]. Otro elemento asociativo entre los mCAF y las CSCs queda definido en la capacidad de los mCAF

para formar estructuras esféricas [110], habilidad representativa de las propias CSCs. De hecho, existen publicaciones que han formalizado una correlación entre la proporción de iCAFs/mCAFs y el pronóstico de tumores como el pancreático [113], lo que concuerda con el valor pronóstico de la ausencia/presencia de CSCs. Más aún, este último estudio también revela que la proporción de los diferentes subgrupos de CAFs se puede correlacionar con la composición de células inmunes en el TME. De forma similar, otro estudio basado en tumores pancreáticos caracterizó 2 subgrupos de fibroblastos funcionalmente diferentes en el estroma tumoral, definidos como CD105+ y CD105-. Mientras que los primeros favorecían el crecimiento tumoral, los segundos ejercían un rol antitumoral mediante la activación de la respuesta inmune adaptativa en contra de la neoplasia maligna [114].

En lo referente al sistema inmune, se ha comprobado gran heterogeneidad entre los TAMs similar a la de los CAFs y a las células cancerígenas. De hecho, se han descrito abundantes moléculas con potencial de ser encasilladas como biomarcadores de TAMs, incluyendo CD68, CD14, HLA-DR, CD204, CD206, CD209, TREM-1 [115] o MARCO [116]. Continuando el paralelismo con los CAFs, se han descubierto varios precursores celulares de los TAMs, como los monocitos circulantes en el torrente sanguíneo o los macrófagos residentes en el tejido en cuestión, y se ha clarificado que el tipo de célula parental puede condicionar el perfil molecular singular finalmente exhibido por el TAM [117]. Tomando en consideración que un único TAM puede expresar simultáneamente varios de los biomarcadores anteriormente enumerados, no es de extrañar que distintos estudios hayan establecido una gama heterogénea de subconjuntos de TAMs entre diferentes tipos de neoplasias e incluso entre diferentes pacientes con el mismo tipo de tumor [118], [119]. Por otro lado, los TAMs también pueden ser asignados principalmente a 2 subcategorías funcionalmente opuestas: TAMs con polarización M1, clásicamente activados y con actividad antitumoral y TAMs con polarización M2, alternativamente activados y con capacidad promotora de tumores [120]. Completando dicha definición, se ha indicado una estrecha asociación entre los macrófagos con fenotipo M1, la defensa contra agentes patógenos y la respuesta proinflamatoria, así como entre los macrófagos con polarización M2, la inducción de la reparación tisular y

una respuesta antiinflamatoria [121]. En concordancia con semejante categorización de TAMs, se ha relacionado la expresión de ciertos biomarcadores, tales como MHCII, CD40, CD80 o CD86, con el fenotipo M1 [122], y la expresión de otros tantos (CD163, CD204, CD206 y CD209) con la polarización M2 [115]. Cabría mencionar que la clasificación de TAMs en 2 únicos fenotipos es, ciertamente, una simplificación excesiva de la realidad biológica. En efecto, numerosos estudios han documentado la existencia de múltiples estados intermedios/mixtos entre el fenotipo M1 y M2 [123][124][125]. A pesar de ello, sería interesante remarcar que la determinación de la existencia de dichos fenotipos mixtos está basada principalmente en la detección de biomarcadores específicos, pero no en la determinación de la funcionalidad del propio macrófago que es, precisamente, el pilar de la clasificación M1/M2. Así pues, la organización en 2 polos de los TAMs se encuentra en línea con la distribución en 2 subconjuntos funcionales de los CAFs y con la presencia de células cancerosas bien diferenciadas y CSCs. En esencia, cabría relacionar a los TAMs M1 proinflamatorios con los iCAF y las células malignas diferenciadas, y a los TAMs M2 regenerativos con los mCAF y el fenotipo troncal de las CSCs.

Cabe resaltar que, tanto los CAFs como los TAMs muestran una organización espacial dentro del TME no caótica que puede corresponderse con la localización espacial de las CSCs en los bordes de la masa tumoral sólida propuesta previamente. Una muestra de ello queda reflejada en un estudio de cáncer pancreático donde el subconjunto de mCAF fue localizado en un área justo adyacente a los bordes de la masa cancerígena, mientras que el subgrupo de iCAF ocupaba una posición más alejada de los bordes [126]. En el ámbito de los TAMs, se ha descrito en un estudio de melanoma cutáneo que los TAMs CD68+CD163+ con fenotipo M2 se van acumulando progresivamente desde el centro de la masa tumoral y las zonas alejadas del TME hacia la zona circundante al frente invasivo de la masa neoplásica [127]. En otra investigación de glioblastoma, los autores observaron que el TME alejado de la masa tumoral estaba constituido principalmente por TAMs proinflamatorios mientras que el TME situado en la zona más cercana al tumor contenía TAMs antiinflamatorios como componente básico [128]. Atendiendo a estas particularidades en cuanto a la distribución espacial de las subclases de CAFs y

TAMs, podría entenderse que existen 2 zonas principales dentro del TME circundante al tumor; una zona cercana a la masa cancerígena (y a las CSCs en los bordes) con un TME básicamente antiinflamatorio conteniendo mayoritariamente mCAFs y TAMs con polarización M2, y una zona más alejada constituyendo un sub-TME de tipo proinflamatorio con gran cantidad de iCAFs y TAMs de clase M1 (Figura 4). Ciertamente, convendría clarificar que el modelo alternativo de progresión tumoral presentado anteriormente dispone la localización de las CSCs en los bordes de la masa neoplásica primaria sólo en una fase avanzada de la cronología temporal de progresión. Por tanto, cabría suponer que la organización del TME en las 2 zonas proinflamatoria/antiinflamatoria también sería apreciable en etapas avanzadas de la progresión del cáncer primario, pero no en etapas más tempranas.

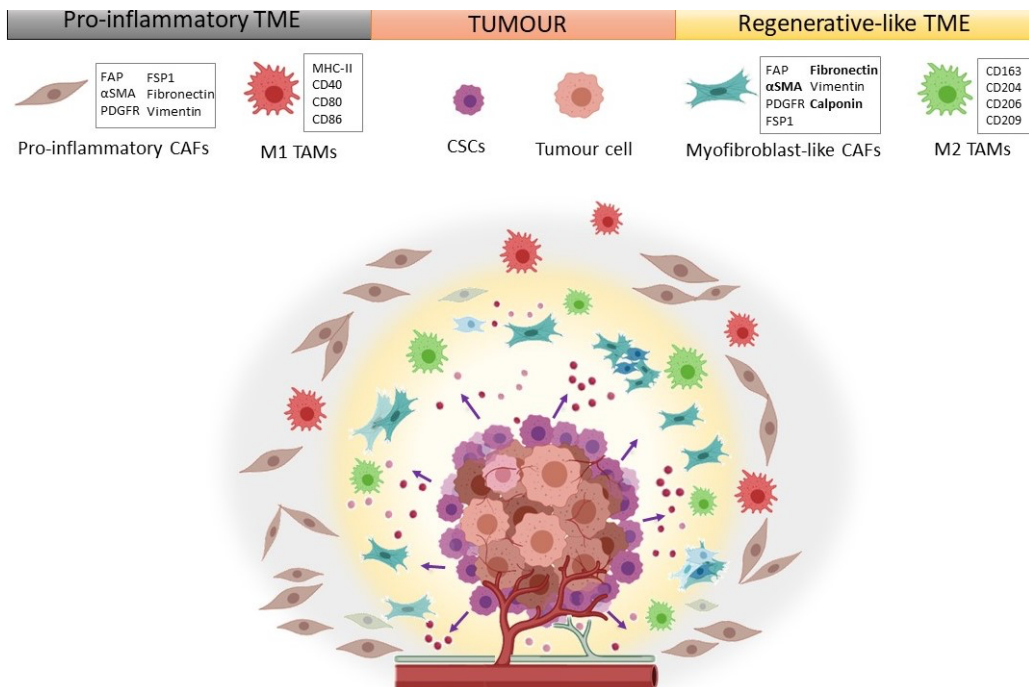


Figura 4: Representación del TME en tumores sólidos primarios distinguiendo sus diferentes regiones. El TME está compuesto por un extenso entramado vascular, por vasos linfáticos, por factores solubles, por una matriz extracelular y por células estromales. Los factores moleculares liberados por las células cancerígenas, incluyendo a las CSCs, promueven la corrupción de las células estromales sanas, pero la naturaleza de las células malignas parece

42

condicionar de forma distinta al TME. Atendiendo a este fenómeno, se pueden observar 2 regiones dentro del TME: a) Un TME de tipo antiinflamatorio/regenerativo localizado justo adyacente a las CSCs localizadas en los bordes de la masa tumoral, con gran abundancia de mCAFs y TAMs M2; b) Un TME de tipo inflamatorio en una zona más alejada de la masa tumoral, con gran cantidad de iCAFs y TAMs M1 (Figura tomada de [129]).

Anteriormente se ha sugerido que la heterogeneidad de los CAFs y TAMs respecto de sus perfiles de expresión podría ser atribuible, al menos en parte, al tipo de cáncer y, por ende, al mecanismo molecular de corrupción subyacente al razonar que la emergencia de tanto los CAFs como los TAMs es precisamente a causa de dicha actividad molecular maligna. En primer lugar, se han documentado una amplia variedad de factores secretados por las células malignas que tienen la capacidad de promover la corrupción de CAFs, siendo algunos ejemplos el PDGF, MMP7, TGF β 1, Sonic Hedgehog, prostaglandin, YAP [91], FGF [130], EGF [131] o SDF1 [132]. Paralelamente, se han definido varias rutas de señalización estrechamente relacionadas con los CAFs, tales como FAK, AKT, Activina A o la ruta YAP/TAZ [133]. En efecto, se puede vislumbrar una correlación entre el factor molecular que desencadena la transformación de los precursores celulares sanos en CAFs y los biomarcadores expresados finalmente por este tipo celular del TME. Una muestra de ello se materializa en la corrupción de fibroblastos sanos por el TGF β 1 secretado por las células cancerígenas que deriva en la formación de CAFs que expresan α SMA [134], fibronectina o calponina [111]. Apoyando la hipótesis acerca de la asociación entre los equilibrios moleculares específicos de cada tipo tumoral y los perfiles de expresión de los CAFs, se ha detallado una correlación entre diferentes tipos de melanoma cutáneos (carcinoma cutáneo de células basales, el carcinoma de células escamosas y el melanoma maligno) y subtipos específicos de CAFs en base a perfiles de expresión particulares [135]. Análogamente, se ha observado una asociación similar entre subtipos determinados de CAFs y diferentes líneas celulares pertenecientes a la misma clase de neoplasia maligna (líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama) [136]. Asumiendo semejante dependencia, también debe destacarse que los equilibrios moleculares internos de un cierto tumor pueden cambiar o “evolucionar” durante la cronología temporal de su progresión. Un ejemplo

representativo de este fenómeno se percibe en la vía de señalización TGF β , que pasa de actuar como supresora tumoral en las etapas iniciales de progresión de una neoplasia primaria a actuar como promotora tumoral en las etapas más avanzadas [137]. Así pues, este evento alcanzaría a explicar la correlación entre diferentes subclases de CAFs con patrones de expresión singulares y cánceres de mama con distinta graduación histológica [136]. Incluso a una escala más profunda, varios estudios han revelado que el status de la ruta TGF β puede considerarse como un distintivo crucial para diferenciar a los iCAF s de los mCAF s [138][139][140]. De hecho, estos mismos trabajos presentan a los mCAF s como “CAF s sensibles al TGF β ” o como CAF s en estado avanzado de corrupción. En el mismo sentido, una investigación reciente de cáncer cervical ha señalado que los mCAF s sólo son detectables en algunos pacientes con el tumor en etapa avanzada de progresión y que se les vincula con un pobre pronóstico, la progresión de la patología y la aparición de metástasis [141]. Todo ello ciertamente encaja con el hecho referido anteriormente de que α SMA, fibronectina y calponina son 3 marcadores fuertemente asociados tanto con el fenotipo funcional de mCAF s como con la corrupción de estas células por TGF β . Internándose en el quid molecular subyacente a los iCAF s y mCAF s del PDAC, Biffi y colaboradores determinaron que las células cancerígenas secretaban en primera instancia IL1 para inducir CAF s con un fenotipo inflamatorio mediante la potenciación de la ruta JAK/STAT. Sin embargo, la exposición de estos iCAF s a TGF β 1 desencadenaba, de forma preferente, el paso desde iCAF s hasta mCAF s [109]. Por lo tanto, considerando que las CSCs suelen tener más activa la vía del TGF β [142] y la sugerencia previa acerca de la aparición de las CSCs en una etapa avanzada de la progresión de los tumores sólidos primarios, podría hipotetizarse que los CAF s primero pasan por una etapa de iCAF s para finalmente alcanzar una fase de mCAF s .

Por otra parte, no todos los tipos de cáncer establecen la misma relación con el sistema inmune del individuo. Reflejando esta circunstancia, se distinguen 6 subtipos de neoplasias en base al status del sistema inmune, i) tipo cicatrización; ii) tipo IFN- γ dominante; iii) tipo inflamatorio; iv) tipo deficiente en linfocitos y v) tipo inmunológicamente parado y tipo TGF β dominante [143], probando alta heterogeneidad y complejidad. No obstante, los autores de este estudio también documentaron cierta

alineación no caótica entre los tumores y el sistema inmune en el TME. Por ejemplo, observaron una correlación entre ciertas mutaciones tumorales y el grado de infiltración de leucocitos en el TME. Apoyando tal hallazgo, otras investigaciones han reportado la asociación entre mutaciones específicas de tumores cerebrales y el perfil molecular de los TAMs en el TME [144]. De forma similar a los CAFs, se ha descrito que el comportamiento del sistema inmune también se ve alterado según se desarrolla el tumor, adquiriendo un rol más protumoral en las etapas avanzadas del desarrollo del cáncer [145]. Entrando en detalle sobre los TAMs, un trabajo de retinoblastoma ha señalado que la proporción de TAMs con polarización M1 parecía experimentar una disminución significativa en las etapas avanzadas e invasivas de la enfermedad [146]. En efecto, investigaciones previas han propuesto un modelo de desarrollo tumoral en el que en las etapas tempranas la ratio M1/M2 es alta, mientras que en etapas más avanzadas esta ratio disminuye [147][148]. Cabe destacar que el reclutamiento de TAMs y su polarización hacia fenotipo de tipo M1 es inducido por citoquinas inflamatorias secretadas por las células tumorales como el $IFN\gamma$ [149] o $TNF\alpha$ [150], e incluso por los propios fibroblastos activos como los iCAF [151]. Asimismo, se ha descrito una fuerte relación entre la activación de la ruta $TGF\beta$ y la polarización M2 de los TAMs [152][153].

Tomando todos estos datos en consideración, nuestro grupo publicó en 2021 un trabajo exponiendo un modelo de desarrollo y evolución del TME en el que se proponía una estrecha reciprocidad entre el patrón de progresión de la masa tumoral sólida descrito previamente y la organización no caótica del estroma circundante [129]. En dicho esquema, la formación de una masa neoplásica maligna promovería la generación de un TME circundante de tipo proinflamatorio en las etapas iniciales de progresión de la enfermedad. Dicho TME proinflamatorio estaría constituido principalmente por iCAF y TAMs con fenotipo M1 proinflamatorio. Con el avance de la patología, se destaca la aparición de las CSCs principalmente en los bordes de la masa tumoral, lo cual contribuiría a una alteración significativa en los equilibrios moleculares definitorios del cáncer en cuestión. Entre dichas alteraciones, cabría remarcar el aumento de la activación y secreción de $TGF\beta$, lo que impulsaría el establecimiento de un TME de tipo antiinflamatorio/regenerativo justo adyacente a los límites de la masa tumoral y a las

CSCs. El referido TME antiinflamatorio/regenerativo estaría principalmente compuesto por mCAFs y TAMs con polarización M2 (Figura 5).

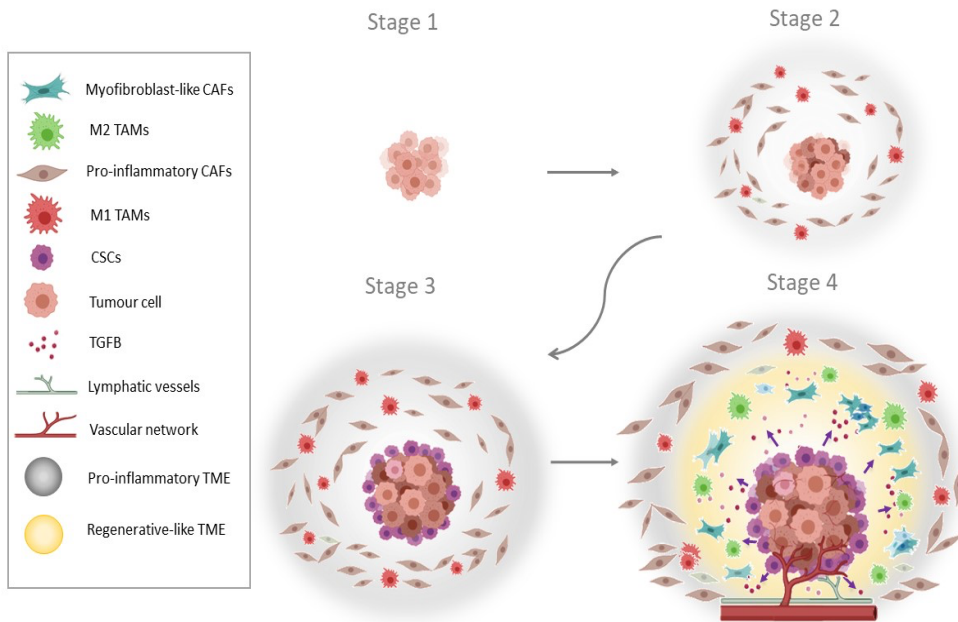


Figura 5: Etapas de evolución del TME en relación al modelo alternativo de progresión tumoral. Primera etapa: tumor pequeño y localizado (sin diseminación a otros órganos). Segunda etapa: el tumor empieza a crecer y desencadena la generación de un TME de tipo inflamatorio con la presencia de iCAFs y TAMs M1. Tercera etapa: se distingue una gran acumulación de iCAFs y TAMs M1 y empieza a observarse CSCs en los bordes de la masa de tumor sólido. Cuarta etapa: se aprecia gran cantidad de CSCs en los bordes de la masa neoplásica, lo que induce un cambio en el equilibrio molecular del tumor, así como la generación de un TME de tipo antiinflamatorio/regenerativo adyacente a las CSCs, con mCAFs (también definidos como “CAFs sensibles al TGFβ”) y TAMs M2 (polarizados por la señalización derivada del TGFβ). En esta última etapa el cáncer tiene la capacidad para expandirse a otros órganos (Figura tomada de [129]).

Exhibiendo un mayor rango de amplitud, la organización de las células cancerígenas también puede verse reflejada más allá del tumor primario, por ejemplo, en el ámbito de las plaquetas circulantes educadas por el tumor (del inglés: tumor-educated platelets; 46

TEPs) que podrían entenderse como una parte del TME en el torrente circulatorio. En este contexto, se ha puntualizado que los patrones de ARN de las TEPs tienen una fuerte analogía con el tipo de tumor primario e incluso con sus mutaciones específicas [154]. Como refuerzo extra de esta idea, se pueden detallar varios nexos de unión entre el comportamiento/propiedades del tumor primario y el crecimiento de la metástasis. En primer lugar, existen investigaciones de cáncer colorrectal que han asignado una base molecular de categoría regenerativa al crecimiento metastásico, caracterizada por la sobreexpresión de L1CAM [155]. Curiosamente, en este trabajo se destaca que tales perfiles moleculares de tipo regenerativo no eran el fundamento del origen/crecimiento del tumor primario. Asimismo, se ha indicado la validez de L1CAM como marcador molecular de las CSCs [156]. Estas aportaciones cobran especial relevancia al considerar la estrecha relación entre las CSCs y la aparición de un TME de tipo regenerativo en las etapas más avanzadas de progresión de un tumor primario, lo que podría asumirse como un paso previo a la aparición de metástasis. Por otra parte, se ha observado que el proceso de colonización del órgano diana de la metástasis por parte de las CTCs involucra la adaptación de los patrones de expresión genética de dichas células en base a un nuevo ambiente molecular y, por ende, la pérdida parcial de los equilibrios moleculares representativos del órgano de partida [157]. Sin embargo, conviene recalcar que los tumores metastásicos todavía suelen conservar ciertas características y perfiles de expresión relacionados con la localización del tumor primario, cual reflejo de sus orígenes. En efecto, se ha revelado la posibilidad de determinar la localización no detectada de un tumor primario mediante el análisis de los patrones de expresión genética del tumor metastásico (usando el algoritmo Iowa Net Site of Origin Classifier basado en perfiles de expresión particulares de distintos biomarcadores) [158]. Llamativamente, a lo largo de los años se ha observado una tendencia de ciertos tipos de tumores a generar metástasis de forma preferente en órganos particulares. Ejemplos representativos de esta circunstancia podrían ser la tendencia del cáncer de mama y próstata a metastatizar en el hueso [159], la predisposición del cáncer de páncreas para metastatizar en el hígado [89] o el caso de las metástasis pulmonares perpetradas por el carcinoma adenoide quístico salival [160]. Una posible explicación a ello podría ser la existencia de un “plan

molecular predeterminado” en las células malignas del tumor primario que las predispusiera a exhibir patrones de preferencia de la metástasis determinados. Como muestra de ello, se ha descrito CTGF-RUNX2-RANKL como un eje molecular a través del cual las células primarias MDA-MB-231 de cáncer de mama y las células PC3 de cáncer de próstata podrían generar futuras metástasis selectivas en el hueso [159]. En un nivel alternativo, el TME de la neoplasia primaria también puede ejercer un papel importante en la conducción selectiva de la metástasis. Se ha sugerido que algunos tipos celulares del TME primario, tales como los CAFs, podrían colaborar en el establecimiento en el cáncer primario de unas condiciones moleculares específicas similares a las del órgano del futuro nicho metastásico. Tal condicionamiento derivaría en la selección de subclones particulares de células tumorales con ventajas intrínsecas para la supervivencia y crecimiento en semejantes condiciones. Por lo tanto, dichos subclones celulares poseerían una tendencia para crecer y generar la metástasis en un órgano distante que tuviera unos equilibrios moleculares similares a los referidos [161]. Adicionalmente, la localización no azarosa de las metástasis podría atribuirse a otras causas más allá de determinadas alteraciones moleculares intrínsecas de las células metastásicas (CSCs o CTCs). Tal es el caso de la formación predeterminada del NP en órganos específicos y no de forma aleatoria. De acuerdo a esta suposición, se ha detallado que el pretratamiento de ratones con medio condicionado de melanoma seguido por la inoculación de células de carcinoma pulmonar de Lewis (definidas por tener la capacidad de metastatizar únicamente en el otro pulmón) ocasionó la aparición de tumores metastásicos no sólo en el pulmón, sino también en los oviductos, el bazo, el intestino y riñones (sitios de metástasis comunes del melanoma) [162]. Específicamente, se puede establecer un nexo de unión entre la localización particular del NP y el contenido de las vesículas extracelulares como los exosomas procedentes de las células malignas de la neoplasia primaria. Como ejemplo, se ha demostrado que exosomas con integrina $\alpha 6\beta 4$ (derivados de cáncer de mama y páncreas) iban dirigidos específicamente a los fibroblastos pulmonares mientras que exosomas con integrina $\alpha 6\beta 1$ eran preferentemente incorporados por células epiteliales pulmonares (produciéndose metástasis pulmonar en ambos casos). Por otra parte, el mismo estudio reveló que

exosomas con integrina $\alpha 5\beta 5$ inducían la metástasis en el hígado al ser integrados por las células de Kupffer [163]. Además de los patrones de integrinas, otras moléculas como las tetraspaninas también desempeñan un rol relevante en este aspecto. Una muestra de ello reside en los exosomas con TSPAN8-a4 selectivamente incorporados por células endoteliales frente a los exosomas con TSPAN8-a6b4 preferentemente captados por fibroblastos [164]. Como apunte notorio, a la hora de dirigir los exosomas hacia dianas particulares, cobra mayor relevancia la existencia de complejos proteicos como tetraspaninas-integrinas en la superficie de los exosomas que la presencia de ciertos factores expresados de forma individual [165].

En definitiva, se puede considerar que tanto el contenido de los exosomas como su configuración proteica en su superficie estarían íntimamente ligados al equilibrio molecular de la célula cancerígena parental en cuestión. En efecto, se han descrito diferentes marcadores moleculares de exosomas en virtud de la etapa de progresión tumoral [166], en consonancia con los cambios en los equilibrios moleculares observados durante la progresión de la neoplasia primaria. Por ende, parece razonable asumir que el crecimiento metastásico en localizaciones no azarosas, así como parte de sus características moleculares podría entenderse como un reflejo directo del perfil molecular del tumor primario (Figura 6).

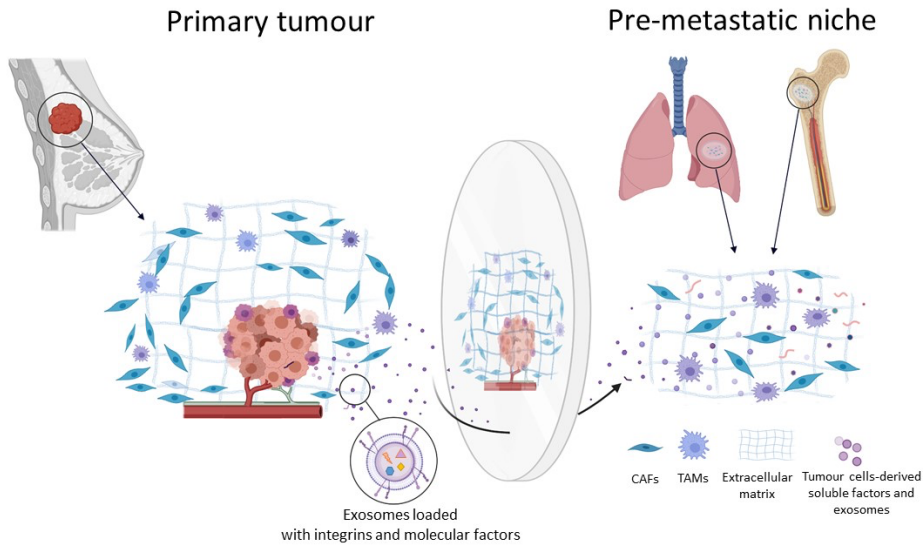


Figura 6: Formación del nicho pre-metastático en localización no azarosa. La constitución del nicho pre-metastático, conteniendo tanto CAFs como TAMs, acontece antes del crecimiento del tumor metastásico y su generación está ligada a factores solubles y exosomas liberados por el tumor primario. Los patrones específicos de integrinas en la superficie de los exosomas pueden condicionar las dianas celulares particulares de dichos exosomas. El perfil molecular del nicho pre-metastático, así como su localización en órganos específicos podría ser considerados como un reflejo del tumor primario y sus equilibrios moleculares (Figura tomada de [129]).

4. INFLAMACIÓN CRÓNICA Y LA ALTERACIÓN DE LAS DEAMINASAS COMO MOTORES DE LA PROGRESIÓN TUMORAL

Ciertamente, los intentos de unificar en un único modelo la progresión de una gran mayoría de tipos tumorales son realmente arduos teniendo en cuenta la inmensa variabilidad de la patología. No obstante, se pueden identificar varios elementos comunes a la inmensa mayoría de neoplasias malignas, siendo uno de ellos la inflamación crónica. Una amplia gama de estudios han presentado la inflamación como

un rasgo distintivo del cáncer, puntualizando su importante rol en la génesis tumoral, la progresión de la enfermedad e incluso en la aparición de metástasis [167] [168]. Otro elemento en común descrito en una gran variedad de tumores es la desregulación de ciertos factores proteicos conocidos como “deaminasas”. Estas moléculas constituyen 2 grupos principales de enzimas con capacidad de modificar algunos tipos de nucleótidos para transformarlos en otros distintos (proceso de edición de nucleótidos). El primer grupo lo conforman las deaminasas de citidina que tienen la capacidad de convertir la citosina en uracilo. Uno de los componentes de este grupo es AID (del inglés: activation-induced cytidine deaminase) que tiene la capacidad de actuar en hebras simples de ADN y que, en condiciones fisiológicas, se expresa principalmente en los linfocitos B donde cumple un papel importante en la diversificación de los anticuerpos participando en procesos clave como la “hipermutación somática” y el “intercambio de clase por recombinación” [169]. En el mismo grupo de deaminasas también se puede identificar a la familia APOBEC (del inglés: Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide-like), compuesta por 11 miembros con el potencial de actuar en hebras simples tanto de ADN como de ARN [170]. El segundo conjunto está constituido por las deaminasas de adenosina que se caracterizan por su capacidad para promover la transición desde adenina hasta inosina. En representación de dicho conjunto, la familia ADAR (del inglés: adenosine deaminase acting on RNA) comprende un grupo de 3 miembros con la habilidad de editar hebras de ARN y, por tanto, con un papel relevante como reguladores post transcripcionales. En mamíferos, se han identificado 3 factores en este grupo: ADAR1 que actúa principalmente en secuencias repetitivas y no codificantes de ARN como es el caso de los motivos ALU; ADAR2 que, esencialmente, edita secuencias de ARN no repetitivas y codificantes; ADAR3 que actúa como inhibidor de ADAR1 y 2 [171]. Además, el splicing alternativo del gen ADAR1 deriva en la generación de la isoforma ADAR1p110 de localización nuclear y la isoforma ADAR1p150 de localización básicamente citoplásmica [172]. Una variedad de investigaciones han expuesto la implicación de las deaminasas en la biología del cáncer, incluyendo a AID [173] [174], APOBECs [175] [176] y ADARs [177]. En efecto, este último dato relativo a ADARs se revela en consonancia con el hecho de que una gran mayoría de tumores

reflejan un aumento generalizado de la actividad editora (Adenina-Inosina) de ARN, fenómeno asociado con el cuadro clínico de los pacientes [177]. Llamativamente, se ha mostrado la asociación íntima entre la inflamación persistente y la inducción de la expresión de AID [178]. Mas concretamente, Zong y colaboradores comprobaron que el factor proinflamatorio $TNF\alpha$ así como la ruta de señalización proinflamatoria $NFK\beta$ estaban implicados en la regulación al alza de AID [179]. En el mismo sentido, se ha mostrado una estrecha relación entre ciertas citoquinas inflamatorias, tales como IL1, IL6, IFN o $TNF\alpha$, y la potenciación de la expresión de miembros de la familia APOBECs [180]. Como ejemplo representativo, se ha caracterizado la vinculación entre la ruta de señalización de $IFN\gamma$ y la expresión de APOBEC3B o APOBEC3C [181]. Recíprocamente, el bucle de retroalimentación positiva de IL6 promovido por APOBEC3B ha sido resaltado como un mecanismo de sustento de la inflamación crónica en el carcinoma hepatocelular mediante la activación constitutiva de la ruta JAK1/STAT3 [182]. Bajo el mismo sesgo, otros estudios han confirmado la inducción de APOBEC3B por la ruta proinflamatoria $NFK\beta$, tanto por su vía canónica como no canónica [183]. Paralelamente, también se ha reportado la potenciación de la expresión de APOBEC3A desencadenada por factores proinflamatorios, incluyendo a $IFN\alpha$, $IFN\gamma$ o LPs [184][185]. Trascendiendo más allá de las propias células tumorales, la actividad de APOBEC3A también puede desempeñar un rol de importancia en las células del estroma tumoral. Concretamente, se ha documentado que APOBEC3A condiciona la polarización de los monocitos/macrófagos, incluyendo a los TAMs, hacia un fenotipo M1 de tipo proinflamatorio por medio de su capacidad editora de ARN [185]. Por lo tanto, la proposición de un papel significativo de la familia APOBECs en la constitución del TME de tipo proinflamatorio es tentadora. Con respecto a ADARs, cabría destacar la inducción de la edición Adenina-Inosina de ARN, promovida a través de la vía proinflamatoria JAK/STAT3, observada en CSCs de leucemia [186]. Ciertamente, procede especificar que la isoforma nuclear ADAR1p110 exhibe una expresión constitutiva y estable en el tiempo mientras que la expresión de la isoforma citoplásmica ADAR1p150 puede verse incitada por factores proinflamatorios como el interferón [187]. Específicamente, cabe destacar que ADAR1 parece actuar como un regulador

negativo de la inflamación. Como ejemplo, se ha reportado que, en células de cáncer gástrico, ADAR1 promovía la regulación al alza de miR-302a y, con ello, se inducía la inhibición del eje IRF9/STAT1 junto con el bloqueo de la ruta proinflamatoria del interferón [188]. En este mismo sentido, se ha visto que ADAR1, además de bloquear la señalización dependiente del interferón, también hace lo propio con la vía proinflamatoria desencadenada por el factor TNF α [189]. Tomando en consideración estos datos, la regulación negativa de la inflamación por parte de ADAR1 podría asumirse como un bucle de retroalimentación negativa con el fin de controlar la inflamación persistente y evitar con ello una potenciación crónica a posteriori de la expresión de ADAR1. Curiosamente, se ha mostrado la importancia de un aumento de la expresión de la isoforma ADAR1p150, pero no de la isoforma ADAR1p110, en la progresión, agresividad y crecimiento de varios tipos tumorales como la leucemia mieloide aguda [190], el cáncer de mama triple negativo [191] o el melanoma [192]. Así pues, este evento podría sugerir que la inflamación crónica característica del cáncer superaría el mencionado control negativo sobre la misma ejercido por ADAR1 y que sería la isoforma ADAR1p150 en particular la que tomaría protagonismo en el contexto de la inflamación. En equivalencia a lo dispuesto en el campo de las APOBECs, se pueden apreciar paralelismos que sugieren que la actividad de ADAR1 también podría tener relevancia en el establecimiento del TME alrededor de la masa tumoral. Como muestra de dicha circunstancia, hay estudios que muestran la expresión de ADAR1 en los CAFs, así como su asociación con la abundancia de este tipo celular en el cáncer colorrectal y con la expresión de biomarcadores específicos, siendo un ejemplo representativo el BAP α [193]. En efecto, los autores de este artículo demostraron que el cultivo de fibroblastos sanos con medio condicionado procedente de células de tumor colorrectal derivaba en la sobreexpresión de ADAR1 y en el aumento de la capacidad invasiva de este tipo de célula estromal por medio de la edición nucleotídica del transcrito de AZIN1. En concordancia con su potencial antiinflamatorio, se ha observado que su sobreexpresión en macrófagos impulsa la polarización de los mismos hacia un fenotipo M2 de tipo antiinflamatorio a través del eje ADAR1/miR-21/FOXO1/IL10 [194]. Así pues, resultaría razonable suponer que ADAR1 posiblemente desempeñe un

rol importante en la generación de M2 TAMs y del TME de tipo regenerativo/antiinflamatorio. En definitiva, todos estos datos revelan que la expresión/actividad de las 3 familias principales de deaminasas, AID, APOBECs y ADARs (resaltando a la isoforma citoplásmica ADAR1p150), se encuentra potenciada por la inflamación. Sin embargo, cabría destacar una diferencia significativa entre las APOBECs y ADARs: mientras que las APOBECs están impulsadas por la inflamación y su actividad deriva en el sustento adicional de dicha respuesta inflamatoria (retroalimentación positiva), la expresión de ADARs está también inducida por rutas inflamatorias pero la actividad ejercida por esta familia de enzimas conduciría a una inhibición de la inflamación (ciclo de retroalimentación negativo) (Figura 7).

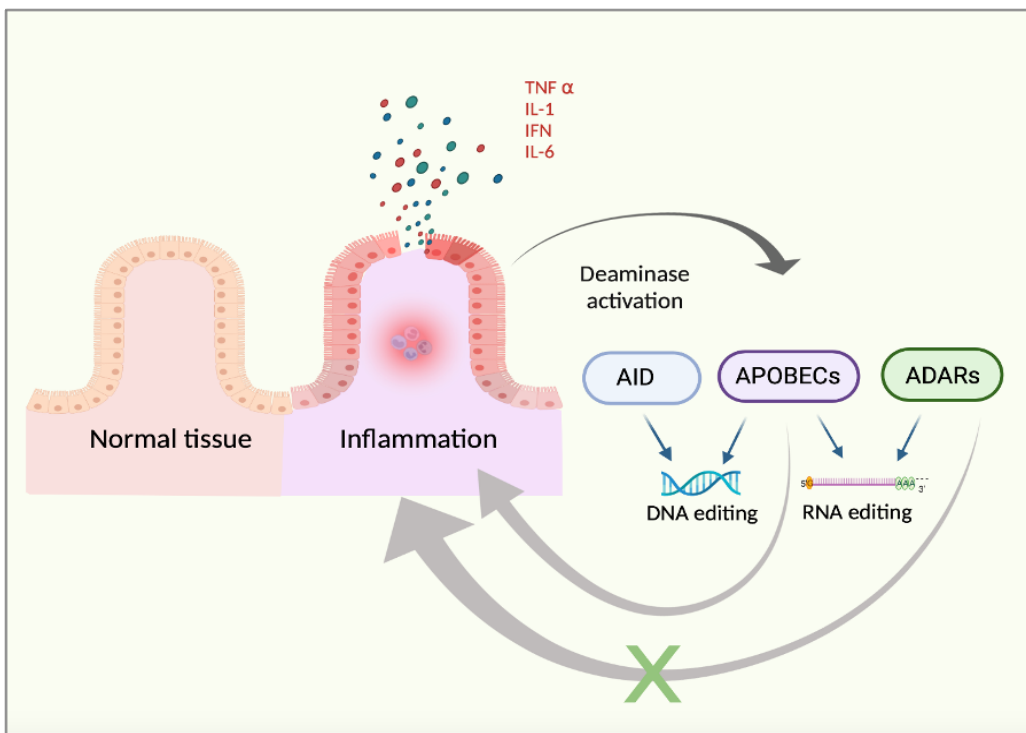


Figura 7: Relación entre inflamación crónica y desregulación de las deaminasas. El tejido inflamado libera gran cantidad de citoquinas inflamatorias, tales como TNF α , IFN, IL1 o IL6. Este fenómeno desencadena la activación de rutas de señalización proinflamatorias, siendo la vía NFK β una muestra representativa. Semejante respuesta proinflamatoria promovería la potenciación de la actividad editora de nucleótidos, tanto en moléculas de ADN como de ARN,

de las diferentes familias de deaminasas (AID, APOBECs y ADARs). Se establece un mecanismo de retroalimentación positivo por el que la actividad de las APOBECs potencia la inflamación crónica, mientras que la actuación de las ADARs sería más propensa a inhibir/controlar la inflamación mediante la constitución de un ciclo de retroalimentación negativo (Figura tomada de [195]).

Procede dedicar especial atención a la implicación de ADARs en los cambios de fenotipo que experimentan las células en ciertas condiciones. A este respecto, se ha señalado el papel significativo de ADAR1 en la plasticidad fenotípica requerida para completar la creación de células madre pluripotentes inducidas a partir de la reprogramación de células somáticas [196]. Acotando el enfoque hacia el rol de ADARs en las CSCs, Crews y colaboradores caracterizaron la existencia de eventos de edición nucleotídica de ARN específicos de las CSCs de leucemia, pero no de las células malignas con fenotipo más diferenciado [197], lo cual sugiere una interesante relación entre ADAR y la plasticidad fenotípica de las CSCs. De hecho, un estudio reciente ha demostrado la implicación de la edición nucleotídica de ARN dependiente de ADAR1, concretamente de la isoforma ADAR1p150 potenciada por la inflamación, y la evolución de células madre pre-leucémicas hasta CSCs de leucemia [190]. Acorde a esta línea de razonamiento, se pueden reconocer otros indicios como es el caso del vínculo entre ADAR1 y el proceso EMT. Estudios en carcinoma oral de células escamosas muestran el papel de ADAR1, tanto de la isoforma ADAR1p110 como de la ADAR1p150, en la progresión del proceso EMT desencadenado tras un tratamiento con TGF β [198]. De hecho, los autores de este trabajo hallaron una conexión entre la sobreexpresión de ADAR1 y la capacidad invasiva de las células malignas, su migración y proliferación. También se describe una correlación positiva entre la sobreexpresión de ADAR1 y una etapa avanzada de desarrollo tumoral con presencia de metástasis en nódulos linfáticos y un mal pronóstico clínico. De forma similar, se ha visto que una alta expresión de ADAR1 en células cancerígenas de PDAC potencia la proliferación celular, la migración, la capacidad invasiva y el proceso EMT, mediante el eje circNEIL3/miR-432/ADAR1. De esta manera, se observa una correlación entre la sobreexpresión de ADAR1 y ciertas características clínicas como el desarrollo de metástasis y la etapa de evolución de la

patología [199]. Otro estudio en carcinoma de tiroides muestra que la potenciación de la actividad editora de nucleótidos en ARN dependiente de ADAR1 (destacando la isoforma ADAR1p150) fomentaba la proliferación celular, su migración, su potencial invasivo, el proceso EMT y la transición de la enfermedad a una etapa más agresiva con un fenotipo celular menos diferenciado [200]. En particular, se ha mostrado la relevancia de la edición del miR-200b en el referido papel oncogénico de ADAR1, sugiriendo con ello el gran potencial de la edición de ARN en la alteración del transcriptoma celular y en la modulación del comportamiento de la enfermedad del cáncer. De hecho, se ha descrito que la edición nucleotídica Adenina-Inosina de moléculas de ARN tiene la capacidad de inducir alteraciones en la estructura de transcritos, en su estabilidad, en su localización subcelular, en su secuencia codificante, en la afinidad de unión de ciertos factores de ARN con función reguladora e incluso en los procesos de splicing [201]. Por otra parte, se ha expuesto que el potencial regulador de las deaminasas de ARN se extiende más allá de su mera actividad editora. Un buen ejemplo de ello sería la regulación negativa de la expresión de ITGB3 en melanoma (a nivel transcripcional y postranscripcional) llevada a cabo por ADAR1 a través de un mecanismo independiente de su función editora [202]. Regresando al contexto de la edición nucleotídica de ARN, un estudio reciente ha descrito multitud de eventos de edición Adenina-Inosina que acontecen en el proceso de diferenciación de células madre pluripotentes inducidas en cardiomiocitos [203]. Los autores indicaron que una pequeña, pero estadísticamente significativa, proporción de dichos cambios tenía lugar en las secuencias codificantes de transcritos, lo cual conducía a la aparición de cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas finales con la consiguiente alteración funcional. En adición a lo anteriormente expuesto, se ha visto que los eventos de edición Adenina-Inosina de ARN localizados en la región reguladora 3'UTR de transcritos suceden con frecuencia en muchos tipos de tumores y que ello puede modificar las secuencias del transcrito que son reconocidas por miARNs, derivando pues, en una alteración de los equilibrios reguladores transcrito/miARN (los miARNs tienen la habilidad de neutralizar a aquellos transcritos genéticos que reconocen). Una muestra de este fenómeno sería la edición del transcrito DFFA que lo hace reconocible por el miR-140-3p, traducándose en un cambio

fenotípico de células de cáncer de mama [204]. Un acontecimiento similar puede ser observado cuando la actividad editora de ADARs actúa en los propios miARNs, concretamente en sus secuencias reguladoras responsables del reconocimiento de transcritos específicos [205]. Así mismo, puede apreciarse otra vía extra de regulación por parte de ADAR1 si se considera su interferencia en el proceso de biogénesis de los miARNs. En efecto, se ha descrito que ADAR1 posee la habilidad de interactuar físicamente con los precursores del miR-21 y promover así una reducción de su expresión y, con ello, inducir un cambio radical en la polarización fenotípica de macrófagos [194]. Además, ADAR1 también puede alterar el procesamiento de moléculas de ARN no codificantes (como los miARNs) mediante un procedimiento diferente como es el caso de la interacción con el factor DICER implicado en el procesamiento de los miARNs [206]. Así pues, esta circunstancia junto con la desregulación de ADARs en el tumor podría explicar la presencia de diferentes patrones de miARNs en células sanas de colon, en células diferenciadas de carcinoma colorrectal, en CSCs de cáncer colorrectal e incluso en pacientes con distintas fases clínicas de la patología incluyendo la etapa metastásica [207]. Aparte de los miARNs, existen otros mecanismos capaces de regular la expresión de un transcrito específico, siendo los procesos de splicing alternativo un buen ejemplo que se traduce en la generación de diferentes isoformas de un mismo factor molecular. De hecho, se ha documentado que las secuencias nucleotídicas relacionadas con la regulación del mecanismo de splicing (contenidas en los propios precursores inmaduros de los transcritos) frecuentemente sufren eventos de edición Adenina-Inosina [208]. Por otra parte, ADAR1 también tiene el potencial de influir indirectamente en los procesos de splicing alternativo por medio de la edición nucleotídica de los transcritos de los factores proteicos involucrados directamente en dichos procesos. Una muestra de ello es que la edición del transcrito de CDK13 (un factor regulador del proceso de splicing), mediada por ADAR1, derivaba en la modificación de los patrones de splicing en células de cáncer de tiroides y promovía la supervivencia celular, la proliferación y la capacidad invasiva [209]. Bajo una perspectiva reguladora más amplia, el análisis del contenido exosómico ha sido caracterizada como una herramienta con potencial diagnóstico en el cáncer [210]. Tal

circunstancia sugiere la presencia de diferente contenido exosómico, incluyendo moléculas de ARN tales como transcritos genéticos o miARNs, en virtud de la etapa de progresión tumoral, de la agresividad de la enfermedad, de su capacidad metastásica o de su resistencia a una terapia determinada. Análogamente, se ha mostrado que el contenido en miARNs de las vesículas extracelulares (incluyendo exosomas) procedente de células del TME, como los CAFs, difería del contenido de las vesículas extracelulares procedentes de los fibroblastos sanos [211]. Así mismo, se ha determinado la existencia de motivos de secuencia particulares contenidos en los propios miARNs, nombrados como “motivos de localización superficial”, responsables del empaquetamiento de un miARN en cuestión dentro de las vesículas extracelulares producidas por la célula [212]. Cabe destacar que la presencia de secuencias exclusivas de 25 nucleótidos, catalogadas en terminología inglesa como “zip code-like sequences”, localizadas en la región 3’UTR de los transcritos de genes se encuentran asociadas con la introducción de dichos transcritos en exosomas [213]. Ante tal disposición, sería razonable asumir que una desregulación de ADARs durante la progresión tumoral podría también afectar a dichas secuencias de empaquetamiento exosómico derivándose en una perturbación de la comunicación intercelular y, con ello, contribuyendo a añadir un grado más de complejidad a la profunda alteración del transcriptoma celular (Figura 8).

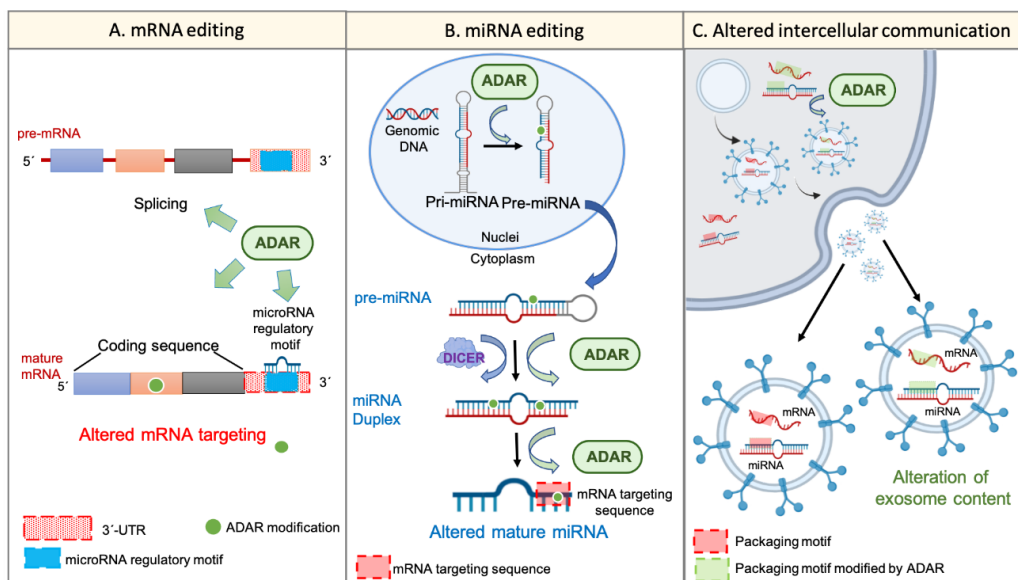


Figura 8: Las ADARs inducen una profunda alteración del transcriptoma celular. El panel A muestra la edición de transcritos de genes (mARN) mediada por ADARs. ADARs pueden alterar el proceso de maduración de los precursores inmaduros de los transcritos (pre-mARN) mediante la interferencia con el proceso de splicing. Además, ADARs pueden editar nucleótidos en diferentes regiones del transcrito maduro. Como ejemplo, ADARs pueden modificar los “motivos reguladores de miARN” situados en la región 3’UTR del mARN y, por ende, ello tiene el potencial de alterar el reconocimiento de un mARN por miARNs particulares. Adicionalmente, ADARs son capaces de actuar en la región codificante del mARN maduro y, con ello, alterar las características de la proteína final. El panel B representa la modificación de miARNs por la actividad editora de nucleótidos en moléculas de ARN. ADARs pueden alterar la biogénesis de miARNs de múltiples maneras; mediante la edición directa de los precursores moleculares inmaduros o a través de la interacción física con factores reguladores del proceso en cuestión, como es el caso de DICER. Por otra parte, ADARs pueden actuar en el miARN maduro y alterar las “secuencias de reconocimiento de mARN” y, de esta manera, interferir en el potencial de un cierto miARN para reconocer y regular a transcritos genéticos específicos. El panel C muestra el potencial de la edición nucleotídica para alterar el contenido de los exosomas y regular así la comunicación intercelular. La actividad editora derivada de ADARs tiene la capacidad de modificar ciertas secuencias localizadas en los propios transcritos genéticos y miARNs, tales como las “secuencias zip code” o los “motivos de localización superficial” respectivamente (referidos en la imagen como “motivos de empaquetamiento”). La edición nucleotídica de estas secuencias específicas puede condicionar el empaquetamiento de mARNs y/o miARNs particulares dentro de vesículas extracelulares como exosomas y, con ello, puede alterar la comunicación intercelular, así como la coordinación en el comportamiento de una población celular determinada (Figura tomada de [195]).

Notablemente, el descontrol de la actividad de las deaminasas podría integrarse en el modelo de desarrollo tumoral previamente referido. En primer lugar, puede apreciarse un nexo entre la actividad potenciada de las deaminasas de ADN y la acumulación progresiva de mutaciones durante el crecimiento del tumor primario junto con la generación de la heterogeneidad genética intra-tumoral, establecido por el modelo estocástico. De hecho, se ha propuesto la existencia de diferentes patrones mutacionales distintivos de APOBECs en numerosos tipos tumorales [214]. Análogamente, se ha

observado espectros mutacionales específicos de AID en algunos subtipos de linfomas [215]. Por lo tanto, no es de extrañar que se haya asociado a las deaminasas de ADN con la aparición de subclones de células malignas genéticamente distintos en un mismo tumor, como es el caso de APOBEC3B y el cáncer de mama [216] o el caso de AID en el linfoma de células B [217]. Otros estudios han propuesto modelos de crecimiento tumoral sustentados en cambios en las pautas mutacionales, atribuidas a las deaminasas, producidos durante la cronología de progresión de la enfermedad [147]. Más aún, tanto la hiperactivación de AID como de APOBECs han sido relacionadas con la génesis tumoral [217] [218], lo cual sugiere el papel crucial de la edición nucleotídica de ADN no sólo en la progresión de la enfermedad, sino también como punto de inicio de la misma. En lo referente a la variabilidad intra-tumoral a nivel fenotípico/funcional (establecida por el modelo jerárquico y dinámico), parece congruente aceptar que las modificaciones epigenéticas, incluyendo la edición nucleotídica de ARN, juegan un papel central al considerar la vinculación entre ADARs y la adquisición del fenotipo CSC. En el contexto de la epigenética, se ha indicado que AID puede actuar también como un desmetilador de ADN [219]. Un estudio focalizado en el carcinoma renal reveló que la actividad de AID como demetilador, por encima de su potencial como inductor de mutaciones, se relaciona con la proliferación, invasión, migración y metástasis de las células malignas, así como con la promoción del proceso EMT [220]. Resultados similares fueron mostrados por Li y colaboradores en un trabajo en el que AID potenciaba la proliferación celular, la migración y la capacidad invasiva del cáncer de vejiga mediante la desmetilación del ADN [221]. Reforzando esta hipótesis, estudios previos han señalado que el proceso de metástasis (presumiblemente llevado a cabo por las CSCs) podría basarse principalmente en cambios epigenéticos más que en la adquisición de mutaciones determinadas [222]. Curiosamente, se ha establecido la importancia de la acción combinada de la edición nucleotídica tanto de ADN como de ARN en la progresión de los tumores, siendo la leucemia mieloide aguda una muestra representativa de este fenómeno [190]. Concretamente, los autores de esta investigación señalaron que la mutagénesis atribuida a la acción de miembros de la familia APOBECs adquiriría el rol de “prerrequisito” necesario antes de que la acción editora de ADAR1

podiera culminar con las alteraciones fenotípicas previamente sugeridas (las células malignas con estas mutaciones clave reaccionarían de forma diferente a las señales moleculares externas). En otras palabras, se sugiere una mayor relevancia de la actividad editora de ARN vinculada a ADARs en las etapas avanzadas del crecimiento tumoral más que en las etapas iniciales, a posteriori tras la adquisición de alteraciones genéticas clave. En consonancia con ello, la edición de los transcritos CSF3R, MSH2, NUMA1 y KDM2 dependiente de ADARs ha sido evidenciada sólo en las lesiones metastásicas (etapa avanzada) de cáncer pulmonar pero no en las neoplasias primarias del mismo tipo tumoral [223]. Como añadidura, otros estudios han destacado la importancia del potencial combinado de las alteraciones genéticas y de factores ambientales en la biología del cáncer. Por ejemplo, se ha probado que la mutación del gen KRAS por sí misma no es suficiente para desencadenar el PDAC, sino que se requiere de modificaciones epigenéticas adicionales (como cambios en patrones de metilación) atribuidas a un ambiente de daño tisular/proinflamatorio [224]. En un estudio [195] publicado recientemente por nuestro grupo se integra la inflamación, el descontrol de las deaminasas y el modelo alternativo de progresión tumoral, proponiéndose la siguiente secuencia de acontecimientos. En primer lugar, un trasfondo de inflamación no controlada/persistente promueve la desregulación de las deaminasas de ADN (AID y APOBECs) y, con ello, la acumulación de mutaciones/alteraciones genéticas. Simultáneamente, la emergencia de ciertas modificaciones epigenéticas, tales como cambios en las pautas de metilación atribuidos a AID, contribuirían junto con las mutaciones a la génesis tumoral. Desde las primeras etapas del crecimiento, el tumor primario induciría la generación de un TME de tipo proinflamatorio (con iCAFs y TAMs M1) acorde con la retroalimentación positiva de la inflamación vinculada con APOBECs. En dicho contexto de inflamación sostenida, se apreciaría el crecimiento del tumor primario acorde al modelo estocástico, destacándose la generación de la heterogeneidad genética intra-tumoral (atribuida a la actividad constante de las deaminasas de ADN AID y APOBECs). En esta etapa, procede destacar la acumulación de las mutaciones cruciales que anteriormente han sido catalogadas como “prerrequisito” anterior a la culminación de cambios fenotípicos en las células. En una etapa más

avanzada, tomaría protagonismo un tipo concreto de alteración epigenética: la edición nucleotídica de moléculas de ARN mediada por ADARs. Dicho fenómeno estaría presente desde las primeras etapas de desarrollo tumoral, pero sería en esta etapa más avanzada cuando adquiriría especial relevancia tras el cumplimiento del prerrequisito mutacional. La desregulación de ADARs estaría apoyada por la inflamación sostenida en el tiempo y todo ello promovería que las células cancerosas diferenciadas de los bordes de la neoplasia pasaran a ser CSCs en consonancia con el modelo dinámico. La aparición de las CSCs coexistiría con la generación del TME antiinflamatorio/regenerativo adyacente a los bordes de la masa tumoral, concordando también con la retroalimentación negativa de la inflamación propiciada por ADARs. Para finalizar, las CSCs inducirían la aparición de tumores metastásicos de acuerdo al modelo jerárquico. Puesto que esta última fase también implicaría cambios fenotípicos significativos (diferenciación de las CSCs), sería admisible hipotetizar la importancia de un cambio destacable en la actividad de ADARs ligada al crecimiento metastásico (Figura 9).

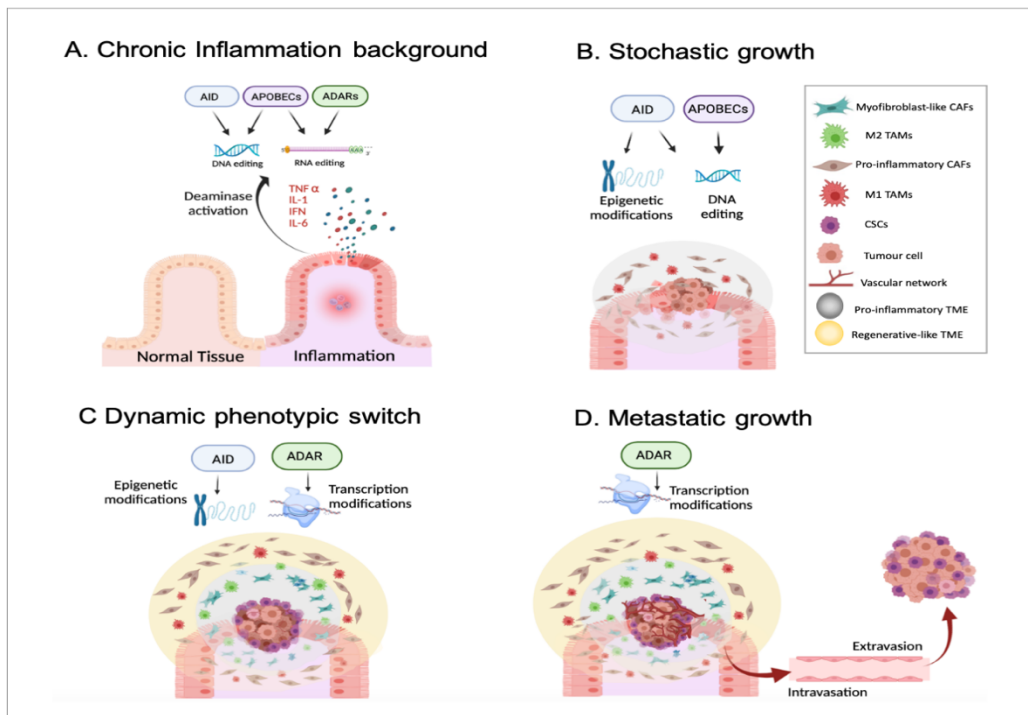


Figura 9: Combinación de la inflamación y las deaminasas en el modelo alternativo de progresión tumoral. En el panel A se muestra un trasfondo de inflamación crónica que puede derivarse en la alteración de la actividad de las deaminasas tanto de ADN como de ARN (AID, APOBECs y ADARs). En el panel B se aprecia la aparición y crecimiento estocástico del tumor primario en sus primeras etapas. Se resalta la colaboración de modificaciones tanto epigenéticas (como cambios en pautas de metilación genómica) como genéticas en la génesis tumoral, mediada por las deaminasas de ADN. Además, la edición nucleotídica constitutiva del ADN, sostenida por la inflamación, induce la variabilidad intra-tumoral a nivel genético/mutacional (en consonancia con el modelo estocástico). Adicionalmente, se promueve la generación de un TME proinflamatorio con iCAFs y TAMs M1 gracias, al menos en parte, a la retroalimentación positiva de la inflamación perpetrada por APOBECs. En el panel C se observa una etapa más avanzada del desarrollo tumoral en la que las CSCs aparecen en los bordes de la masa neoplásica. Se destaca la participación de las modificaciones epigenéticas, como la edición nucleotídica de ARN, en el cambio fenotípico acontecido en las células malignas diferenciadas de los bordes de la masa tumoral que adquieren un fenotipo troncal (de acuerdo al modelo dinámico). Por otra parte, la emergencia de la población de CSCs induce la generación de un TME de tipo antiinflamatorio/regenerativo con mCAFs y TAMs M2 justo adyacente a los bordes tumorales donde se localizan las CSCs. En tal evento, las ADARs probablemente desempeñan un papel importante en congruencia con su control negativo de la inflamación. En el panel D se expone la etapa final del desarrollo tumoral en la que las CSCs migran, alcanzan el torrente sanguíneo por un proceso de intravasación y finalmente colonizan un órgano distante. En dicho órgano, las CSCs generarían un tumor metastásico en consonancia con el modelo jerárquico. Puesto que en tal proceso las CSCs deben generar todas las subpoblaciones de una nueva masa tumoral, las CSCs deben sufrir nuevos cambios fenotípicos (proceso de diferenciación). Por ende, sería razonable hipotetizar un rol relevante para ADARs en esta última etapa (Figura tomada de [195]).

En este punto, sería relevante notar que la edición nucleotídica de transcritos tendría una naturaleza transitoria en el tiempo al considerar la corta vida media de las moléculas basadas en ARN [225]. Por ende, este hecho refuerza la importancia de la inflamación crónica, más que una respuesta inflamatoria aguda/puntual, desencadenada y mantenida desde las etapas tempranas del desarrollo tumoral para así permitir la inducción de cambios fenotípicos significativos y duraderos a posteriori mediados por ADARs. Por otro lado, también cabría hacer un inciso aclaratorio dado que podría resultar insólito el

hecho de que el propio tumor generara desde las primeras etapas un TME proinflamatorio con TAMs M1 con capacidad antitumoral. No obstante, se ha descrito que las células cancerosas pueden desarrollar mecanismos para evitar ser identificadas por los macrófagos y así evadir al sistema inmune, siendo la sobreexpresión de CD47 un ejemplo representativo de este fenómeno [226]. En otras palabras, las células tumorales tienen la habilidad de evadir a los TAMs M1 además de, indirectamente, beneficiarse del ambiente inflamatorio. Por otra parte, los TAMs M2 apoyarían la progresión tumoral de una forma independiente al contexto de inflamación. A este respecto, es correcto señalar que no todos los tipos tumorales se asocian necesariamente a una inflamación crónica. No obstante, incluso en ausencia de inflamación el modelo de progresión expuesto sería válido si consideramos que la desregulación de las deaminasas (eje conductor del modelo) también puede estar ocasionada por otro tipo de circunstancias. Como ejemplo, la desregulación de APOBEC3C mediada por mutación del gen o por mecanismos epigenéticos como la participación de ARN no codificantes ha sido relacionada con la progresión del cáncer de mama [227].

Una vez expuesto el nuevo modelo de desarrollo tumoral, procedemos a centrarnos en el cáncer de páncreas, objetivo concreto de la presente tesis doctoral. Enmarcando la heterogeneidad anteriormente mencionada, los tumores pancreáticos reúnen a un conjunto de neoplasias tradicionalmente clasificadas en varios subtipos de acuerdo a criterios histológicos e inmunohistoquímicos (expresión de biomarcadores). En base a estos criterios y atendiendo a la similitud con las 3 categorías de diferenciación celular en el páncreas sano (fenotipo ductal, acinar o neuroendocrino), se pueden identificar el PDAC, el carcinoma de células acinares, el tumor neuroendocrino, la neoplasia pseudopapilar (con características inespecíficas), el pancreatoblastoma (mezcla entre el tipo acinar y el neuroendocrino) y el carcinoma acinar mixto (subtipo poco frecuente) [228]. No obstante, la tipificación de las neoplasias pancreáticas en subgrupos adicionales (que condicionan significativamente la estrategia terapéutica) puede alcanzar una complejidad incluso superior si se considera el análisis de marcadores genéticos, de la estructura genómica, del transcriptoma, de patrones morfológicos de crecimiento, de la proteómica, del equilibrio metabólico o del status del sistema inmune [229]. Incluso

con esta amplia gama de datos analíticos, la heterogeneidad del cáncer todavía genera complicaciones en el diagnóstico clínico de tumores pancreáticos. Por ello, existen estudios que proponen herramientas alternativas que complementen a los criterios tradicionales de diagnóstico, por ejemplo, el análisis de los patrones de metilación genómicos [228]. Concretamente, el PDAC es el subtipo más frecuente (aproximadamente el 80% de todos los tumores pancreáticos) y más agresivo con un índice de supervivencia a 5 años de menos del 10% a causa de la frecuente recurrencia tras la aplicación de tratamientos y por el desarrollo de metástasis en etapas tempranas [230][3]. De hecho, se ha documentado que el PDAC abarca todas las facetas de la diversidad tumoral tales como la heterogeneidad inter-tumoral o la variabilidad intra-tumoral, ambas en múltiples niveles como el histológico (coexistencia incluso en una misma masa tumoral de distintos patrones histológicos como el ductal convencional o el carcinoma papilar cístico) o el molecular (diferente carga mutacional, anormalidades genómicas, perfiles transcripcionales o patrones de reprogramación epigenética) [231], lo que indudablemente contribuye a las dificultades clínicas y al mal pronóstico del PDAC. Adicionalmente, los autores de este estudio incluso observaron que el TME también tenía componentes distintivos en cada paciente, por ejemplo, en lo concerniente a su proporción de células inmunes como los linfocitos T helpers.

5. USO DE PROENZIMAS PANCREÁTICAS

Apremia la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas alternativas que mejoren la eficacia clínica de los tratamientos actuales contra el PDAC, máxime teniendo en cuenta los efectos secundarios severos derivados de los tratamientos anticancerosos convencionales de quimioterapia y/o radioterapia. En esta línea, el embriólogo británico John Beard propuso al inicio del siglo XX el conocido como “modelo trofoblástico del cáncer”, que posteriormente sería retomado principalmente por Kelley (a mediados del siglo XX) y por González e Isaac (a finales del siglo XX y principios del XXI). John Beard se basó en sus estudios del desarrollo embrionario para sugerir que las enzimas pancreáticas, como la tripsina, estaban estrechamente implicadas en la

regulación/control del trofoblasto (que exhibía un comportamiento similar al de las células malignas) y que, por ende, podrían ser usadas para tratar el cáncer [232]. En las últimas décadas, se han realizado numerosos estudios, tanto en el nivel *in vitro* como *in vivo* utilizando ensayos con ratones e incluso a nivel clínico con pacientes oncológicos, que demuestran la capacidad antitumoral de las enzimas pancreáticas (revisado en [233]). Concretamente, cabe resaltar el trabajo realizado por nuestro grupo en el que se valoraron los efectos antitumorales *in vitro* de una combinación de (pro)enzimas pancreáticas (tripsinógeno, quimotripsinógeno y amilasa), en vez de las enzimas propiamente activas, sobre las líneas celulares Caco-2, Panc-1 y OE33 de cáncer de colon, páncreas y esófago, respectivamente. Los resultados mostraron que el tratamiento inducía la repolarización y diferenciación de las Caco-2 hacia un fenotipo parecido a los enterocitos sanos (aparición de estructuras como microvellosidades y uniones intercelulares adherentes características de estas células) y la expresión de hormonas típicas pancreáticas como insulina y glucagón en las Panc-1. Por otra parte, el tratamiento con las (pro)enzimas pancreáticas indujo una disminución en la expresión de marcadores específicos del proceso EMT, así como una regulación al alza de marcadores epiteliales tales como la E-Cadherina (sugiriendo un potencial anti-metastásico) [234]. Asimismo, nuestro grupo evaluó en un estudio posterior los efectos anti-proliferativos de la combinación de Tripsinógeno y Quimotripsinógeno A en diferentes proporciones sobre 24 líneas celulares humanas de distintos carcinomas y se determinó que la ratio óptima correspondía a una proporción 1:6 de Tripsinógeno y Quimotripsinógeno A, respectivamente, esta formulación fue nombrada como PRP. También se demostraron la capacidad anti-angiogénica y anti-invasiva del PRP en cáncer de páncreas y de ovario, así como la seguridad clínica y capacidad antitumoral de la administración rectal de las (pro)enzimas pancreáticas a pacientes oncológicos [235]. Cabe resaltar que las observaciones realizadas en las mencionadas investigaciones parecen apuntar a que el tratamiento con (pro)enzimas pancreáticas, y en particular con PRP, no representa una estrategia terapéutica dañina para las células sanas y que no se comporta como un agente citotóxico típico.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Se ha demostrado que el uso de las (pro)enzimas pancreáticas, Tripsinógeno y Quimotripsinógeno A, como agente anti-tumoral disminuye la proliferación de las células tumorales y las transforma hacia un fenotipo menos maligno, promoviendo la adhesión y diferenciación celular. Por otro lado, el tratamiento con dichas enzimas promueve la inhibición de la transición epitelial/mesenquimal, y precisamente éste fenómeno es reconocido como una prueba indiscutible de la agresividad tumoral que promueve invasión y metástasis e incluso la resistencia a los medicamentos. Las CSCs responsables de la iniciación y crecimiento sostenido del tumor, resistencia a la terapia, progresión, recaída y metástasis, presentan un fenotipo no diferenciado estando además íntimamente relacionadas con el proceso EMT.

Por todo esto, el tratamiento combinado de Tripsinógeno y Quimotripsinógeno A (PRP), podría tener una alta repercusión en la población de CSCs, i) disminuyendo su número; ii) induciendo su diferenciación; iii) inhibiendo el proceso EMT y iv) afectando la expresión de genes relacionados con la adherencia celular y la metástasis. PRP podría revertir la desregulación de las vías TGF β , Hippo, Notch y Wnt/ β -catenina, que las CSCs exhiben potenciadas.

El uso de pro-enzimas pancreáticas como coadyuvantes a tratamientos convencionales podría reducir la diseminación metastásica y la recidiva tumoral, por lo que se presenta como una terapia con potencial aplicación clínica.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene como **objetivo principal** el establecimiento de un protocolo preclínico de valoración de eficacia antitumoral de una formulación terapéutica compuesta por dos (pro)enzimas pancreáticas (Tripsinógeno y Quimotripsinógeno A) en una relación sinérgica (proporción 1:6) denominada PRP. Para ello, se realizarán estudios sobre CSCs de tumor pancreático *in vitro* y en xenotrasplantes derivados de CSCs aisladas previamente de la línea celular BxPC-3 de PDAC humano.

Objetivos secundarios:

1. Evaluar e interpretar estudios previos sobre las bases moleculares del cáncer para tratar de comprender mejor esta patología y desarrollar un modelo de progresión alternativo que nos permita valorar con mayor precisión los resultados que se obtengan tras la aplicación de PRP.
2. Evaluar la eficacia antitumoral *in vitro* de PRP sobre subpoblaciones enriquecidas de CSCs procedentes de la línea BxPC-3 de PDAC humano. Se estudiarán las alteraciones en características celulares básicas como la viabilidad celular, la capacidad proliferativa, y en propiedades específicas de las CSCs como la expresión de biomarcadores vinculados al fenotipo CSC o la capacidad formadora de esferas.
3. Realizar un análisis *in vitro*, de expresión genética y proteica para conocer el posible mecanismo molecular de acción de PRP sobre rutas de señalización representativas de las CSCs.
4. Evaluar el potencial antitumoral *in vivo* de PRP como inhibidor de la iniciación y crecimiento tumoral empleando modelos heterotópicos xenotrasplantados de ratón con subpoblaciones enriquecidas de CSCs.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Eficacia antitumoral in vitro de PRP sobre CSCs de PDAC.

El tratamiento con PRP reduce la población de CSCs pancreáticas

Para comenzar, nos centramos en evaluar la acción selectiva de PRP en contra de una subpoblación enriquecida de CSCs derivadas de la línea BxPC-3 de PDAC humano. En primer lugar, se determinó la IC50 de PRP usando el ensayo MTT (Figura 10A). Los resultados revelaron que la IC50 correspondió a unas concentraciones de 420 $\mu\text{g/mL}$ de quimotripsinógeno combinada con 70 $\mu\text{g/mL}$ de tripsinógeno (aproximadamente). Dichas concentraciones fueron las que se utilizaron en todos los experimentos posteriores. Tomando ALDH1 como marcador molecular representativo de las CSCs, se procedió a la detección de las células positivas para ALDH1 por medio del ensayo ALDEFLUOR, empleando la técnica de citometría de flujo (Figura 10B). Dicha imagen demuestra que el tratamiento con PRP disminuyó la población de células ALDH1+ (desde un 47.2% hasta un 17.5%), Además, la figura 10B también muestra que el tratamiento con PRP redujo el porcentaje de células positivas para otros marcadores de CSCs pancreáticas, tales como CD44 (desde un 75.1% hasta un 9.5%), CD326 (desde un 51.2% hasta un 5.5%) y CXCR4 (desde un 63.1% hasta un 42.4%). Para confirmar tales observaciones, se procedió al análisis de los niveles de expresión de CD44, CD326 y CXCR4 con otras técnicas como la inmunofluorescencia (Figura 10C) y western Blotting (Figura 10D y Figura Suplementaria S1). Ambos ensayos corroboraron los resultados previos obtenidos mediante citometría de flujo: el tratamiento con PRP reduce la expresión de los marcadores de CSCs pancreáticas mencionados (como se aprecia en la figura con la bajada de la señal roja de fluorescencia y la disminución de la cantidad de proteína detectada por Western Blotting).

El tratamiento con PRP inhibe la capacidad formadora de esferas de las CSCs pancreáticas

En virtud de la alteración de biomarcadores relacionados con el fenotipo troncal de las CSCs pancreáticas ocasionada por el tratamiento, el siguiente paso versó en comprobar los efectos de PRP en propiedades fenotípicas atribuibles a las CSCs, como es el caso de su capacidad para formar estructuras multicelulares esféricas en suspensión. En este sentido, el PRP se añadió al medio de cultivo de las células cancerígenas en el día 0 (cultivo específico para fomentar la formación de esferas y uso de pocillos de cultivo con baja adherencia). Los efectos derivados del tratamiento con PRP se compararon con aquellos asociados a un tratamiento estándar con gemcitabina (primera línea de tratamiento quimioterápico contra el PDAC) y con controles no tratados. La Figura 10E muestra imágenes de los cultivos celulares en los días 2 y 3. En el día 2 resulta evidente que el suplemento con PRP reduce el número y tamaño de las esferas formadas por las CSCs pancreáticas en comparación con la condición control. También se aprecian cambios morfológicos en dichas estructuras esféricas: mientras que las controles no tratados con PRP exhiben una morfología regular, las tratadas con PRP presentan una estructura esférica bastante irregular y deformada. En el día 3, las células tratadas con PRP perdieron la capacidad para formar esferas y presentaron una apariencia de células disgregadas. El tratamiento con PRP de las esferas primarias condujo a una inhibición de la proliferación celular similar al tratamiento con gemcitabina y con diferencias significativas respecto del grupo control no tratado. La combinación de PRP y gemcitabina en una misma dosis desveló una disminución más eficaz (estadísticamente significativa) de la formación de esferas primarias de CSCs en comparación con el PRP aislado ($p < 0.01$) o con la gemcitabina aislada ($p < 0.01$) (Figura 10F). Adicionalmente, el tratamiento con PRP inhibió la formación de esferas secundarias, de forma similar a la gemcitabina, en comparación al grupo control no tratado ($p < 0.01$) (Figura 10E). También se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en la capacidad para inhibir la formación de esferas secundarias de la combinación de PRP y gemcitabina con respecto al resto de condiciones previamente referidas ($p < 0.01$). De hecho, la combinación de PRP y gemcitabina se mostró como la

condición experimental con la mayor capacidad para inhibir la formación de esferas secundarias ($p < 0.01$) (Figura 10F). Así pues, estos resultados apoyan la línea de observaciones acerca de las propiedades antitumorales de PRP sobre las CSCs pancreáticas e incluso sugieren un posible uso de PRP como agente adyuvante de la gemcitabina.

En su conjunto, estos hallazgos se muestran congruentes indicando que el tratamiento con PRP inhibe el fenotipo troncal de las CSCs pancreáticas *in vitro*, así como características fenotípicas clave de este tipo celular tales como su capacidad para formar estructuras tridimensionales esféricas.

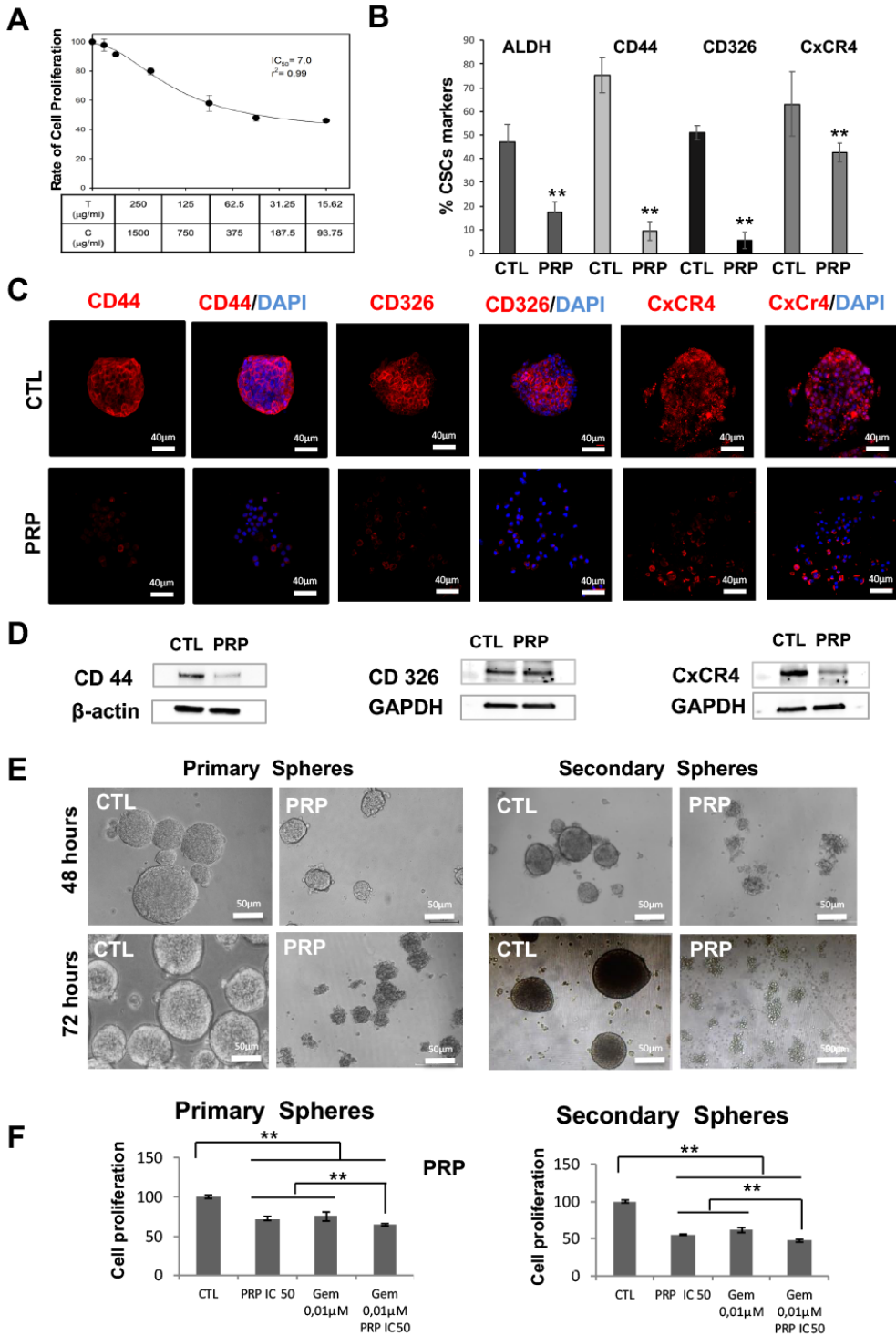


Figura 10: Análisis in vitro de la malignidad de las CSCs procedentes de la línea BxPC-3

tratadas con PRP. (A) Actividad antiproliferativa de PRP sobre las CSCs mediante la determinación de la IC50. (B) Disminución de la actividad de ALDH1 y de los niveles de expresión de marcadores de CSCs pancreáticas como CD44, CD326 y CXCR4 en las células tratadas con PRP en comparación a controles sin tratar. (C) Imágenes de microscopía confocal de la expresión de CD44, CD326 y CXCR4 en las células tratadas con PRP en comparación a controles sin tratar. Los referidos marcadores se observan en color rojo mientras que el núcleo celular se marcó con DAPI (color azul). La barra de escalas representa un tamaño de 40 μm . (D) Análisis por Western Blotting de la expresión proteica de CD44, CD326 y CXCR4 en las CSCs tratadas con PRP vs las CSCs controles sin tratar. La β -actina y el GAPDH se usaron como controles internos. (E) Imágenes representativas de las esferas primarias y secundarias de CSCs tratadas con PRP (imágenes tomadas a las 48 y 72 horas tras el tratamiento). La barra de escala representa un tamaño de 50 μm . (F) Ensayo de proliferación in vitro de las CSCs tratadas con PRP y con gemcitabina. Las esferas primarias y secundarias fueron incubadas sólo con PRP, sólo con gemcitabina (tratamiento con 0,01 μM) y con una combinación de ambos durante 72 horas. El tratamiento con PRP, con gemcitabina y combinación de ambos redujo la formación de esferas por parte de las CSCs de forma estadísticamente significativa. En el test estadístico se usó un valor $**p < 0.01$ vs las muestras no tratadas. Figura tomada de [236].

2. Valoración del posible mecanismo de acción de la formulación PRP sobre las CSCs pancreáticas

El tratamiento de las CSCs pancreáticas con PRP induce amplios cambios de expresión génica en una amplia variedad de genes

A continuación, nos centramos en intentar dilucidar un mecanismo de acción de las (pro)enzimas pancreáticas que pudiera explicar su potencial anti-CSC anteriormente expuesto. Para ello, se realizó el análisis por PCR, antes y después de aplicar el tratamiento, mediante 3 microarrays de genes vinculados con la regulación de 3 aspectos clave de las CSCs: el proceso EMT, el fenotipo troncal poco diferenciado y las rutas de señalización de quinasas. En primer lugar, se comenzó con el análisis de la expresión de los genes comprendidos en los 2 primeros microarrays relativos al proceso EMT y al fenotipo troncal. A continuación, se procedió con el desglose de los resultados al respecto. En la Figura 11A se puede apreciar los cambios de expresión de varios genes

frecuentemente regulados al alza durante el proceso EMT. En dicha imagen se puede comprobar que el tratamiento con PRP promueve la regulación a la baja de la expresión de 13 de estos genes, destacándose la bajada de reconocidos factores de transcripción/marcadores de la vía EMT como SNAIL (SNAI1; -1.9 folds) y SLUG (SNAI2; -1.89 folds). Adicionalmente, se advierte la notable disminución de la expresión de SERPINE1 (-4.6 folds), lo que cobra importancia al considerar su relación con la migración, la capacidad invasiva, la inducción del EMT y la progresión tumoral [237]. Un resultado similar se refleja en la regulación de las integrinas ITGA5 (-2.5 folds) y ITGAV (-1.02 folds), que han sido vinculadas con la inducción del proceso EMT en el PDAC [238]. En pro de aportar consistencia a tales hallazgos, la Figura 11B muestra genes comúnmente regulados a la baja durante el proceso EMT que, tras el tratamiento, exhibieron un aumento de expresión. Entre ellos, merece especial atención el claro aumento de expresión del marcador de fenotipo epitelial E_Cadherina (4.3 folds). Otro hecho destacable reside en la regulación al alza de KLF17 alcanzando un valor de 5.9 folds, puesto que ha sido identificado como un potente regulador negativo del proceso EMT y de la metástasis [239]. En consonancia, también se puede observar que la formulación PRP desencadenó una regulación al alza de otros genes inhibidos durante el proceso EMT, tales como MST1R (1.6 folds), TFPI2 (4.4 folds) y NUDT13 (2.3 folds), lo que sugiere un bloqueo del proceso EMT tras el tratamiento.

Tomando en consideración que el proceso EMT constituye un mecanismo molecular de desdiferenciación, se procedió al análisis de la expresión de genes relacionados con la diferenciación celular. En efecto, la Figura 11C muestra cómo el tratamiento con PRP indujo la regulación al alza de 7 genes implicados en la diferenciación celular, de los cuales procede remarcar la sobreexpresión del factor de crecimiento epitelial (EGF) (8.9 folds) dada su participación en la diferenciación de las células β pancreáticas [240]. Como dato complementario, la Figura 11D muestra los resultados del análisis de los cambios de expresión de genes directamente asociados con la adquisición/mantenimiento del fenotipo troncal de las CSCs. En congruencia con los resultados anteriores en el ámbito de la diferenciación celular, en la Figura 11D se puede notar la regulación a la baja de genes como OCT4 (-2 folds), KLF4 (-2 folds), CD24 (-

1.4 folds), CD34 (-1.2 folds), CD38 (-12.8 folds), CD45 (-6.7 folds). No obstante, también se ha de mencionar la regulación al alza de CD133 (3.9 folds) y el drástico aumento de expresión de Nanog (23 folds). No obstante, en conjunto estos resultados sugieren una inhibición significativa del proceso EMT tras el tratamiento con la formulación de (pro)enzimas pancreáticas y el fomento de un fenotipo más diferenciado.

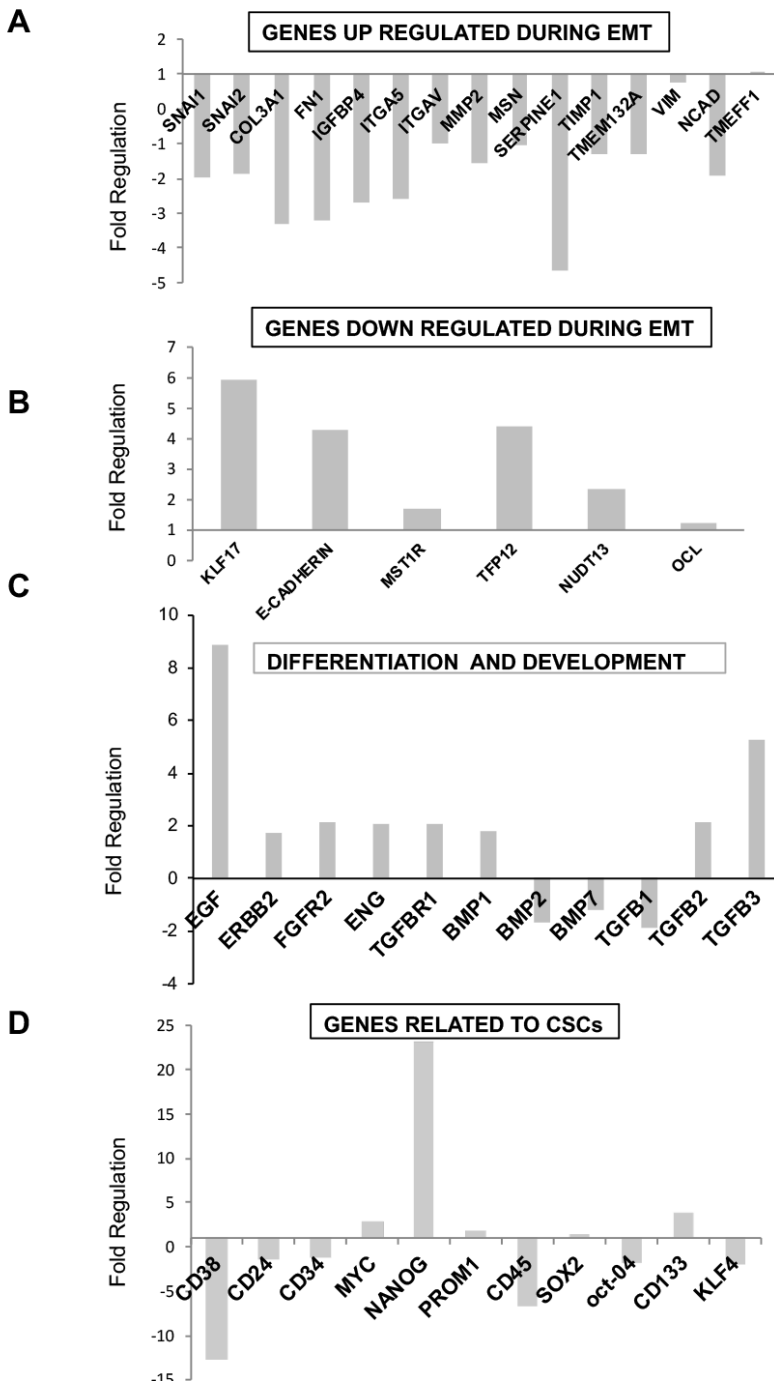


Figura 11. Perfiles de expresión génica de las CSCs, procedentes de la línea BxPC-3, tratadas con PRP mediante el uso de los microarrays de genes asociados al proceso EMT y al fenotipo CSC. Las CSCs se trataron 2 veces con PRP (T/Q 0.07/0.42 mg/mL) en el día 2 tras la siembra y 86

en el día 4. En el día 5, se aisló la totalidad del ARN celular. Se establecieron 3 conjuntos de ARN celular extraídos de 3 muestras independientes de CSCs y se combinaron en un único pool de ARN para después proceder a la síntesis de la primera hebra de ADN complementario. (A) Expresión de genes comúnmente potenciados durante el proceso EMT. (B) Expresión de genes comúnmente inhibidos durante el proceso EMT. (C) Expresión de genes relacionados con la diferenciación y desarrollo celular. (D) Expresión de genes relacionados con el fenotipo troncal de las CSCs. Todos los niveles de expresión de genes se normalizaron en base a los niveles de las células control no tratadas. Figura tomada de [236].

Por otra parte, la Figura 12A muestra la regulación a la baja de la expresión de 8 genes (PLAUR, -3.017 folds; BMP7, -1.269 folds; DKK1, -1.745 folds; ITGB1, -1.306 folds; PLAT, -1.617 folds; FN1, -3.223 folds; PDGFRB, -3.109 folds; y SPP1, -10.144 folds) relacionados con la metástasis y la invasión celular. Por el contrario, la Figura 12B representa la subida de la expresión de 7 genes vinculados con la adhesión celular. Entre ellos, cabe destacar la subida de expresión de la E-Cadherina (4.3 folds) y de la β -Catenina (4 folds), en consonancia con nuestros estudios previos [234]. La trascendencia de tal circunstancia se explica en virtud de la participación conjunta de estas proteínas en el establecimiento de uniones intercelulares estrechas (del inglés “tight junctions” y otro tipo conocido como uniones adherentes) características de las células epiteliales [241]. Además, procede mencionar el aumento de la expresión de 11 genes catalogados como supresores de tumores (recogidos en la Figura 12C). En dicha imagen toma protagonismo la remarcable sobreexpresión de los factores de transcripción FOXP1 (6.04 folds), TWIST2 (5.2 folds), la proteína extracelular SPARC (3.6 folds) y el gen SIRT1 (2 folds).

En otro contexto, la Figura 12D desvela cambios de expresión de genes que codifican citoquinas tras la aplicación del tratamiento con PRP. En dicha imagen se puede apreciar la bajada de expresión de varios genes que codifican citoquinas, tales como IKBKB (-3.536 folds), PCAM1 (-1.764 folds), IL1RN (-2.222 folds), IL8 (-4.557 folds) o SPP1 (-10.144 folds). En particular, la regulación a la baja de IL8 y SPP1 merece ser resaltada atendiendo a la relación establecida entre la sobreexpresión de IL8 y el PDAC

metastásico [242], o a la estrecha vinculación entre el aumento de expresión de SPP1 y la adquisición de un fenotipo troncal por las CSCs de PDAC [243].

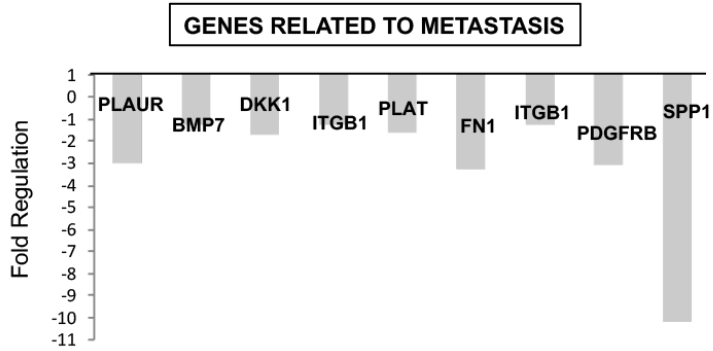
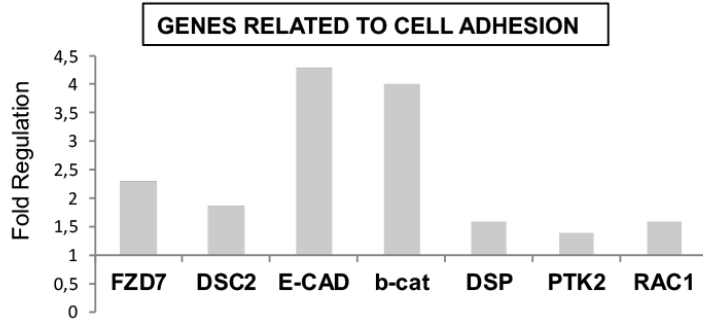
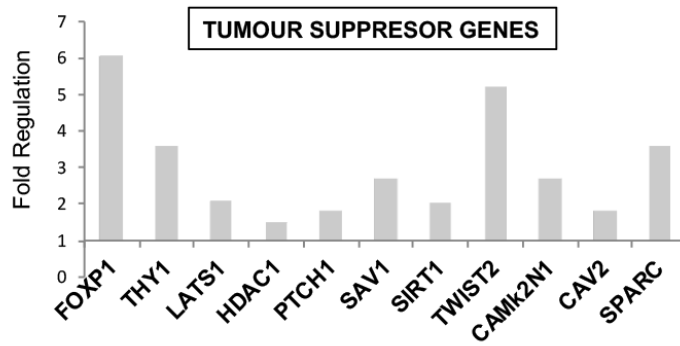
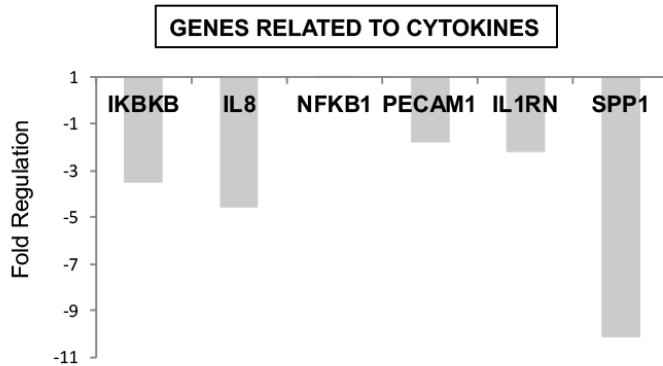
A**B****C****D**

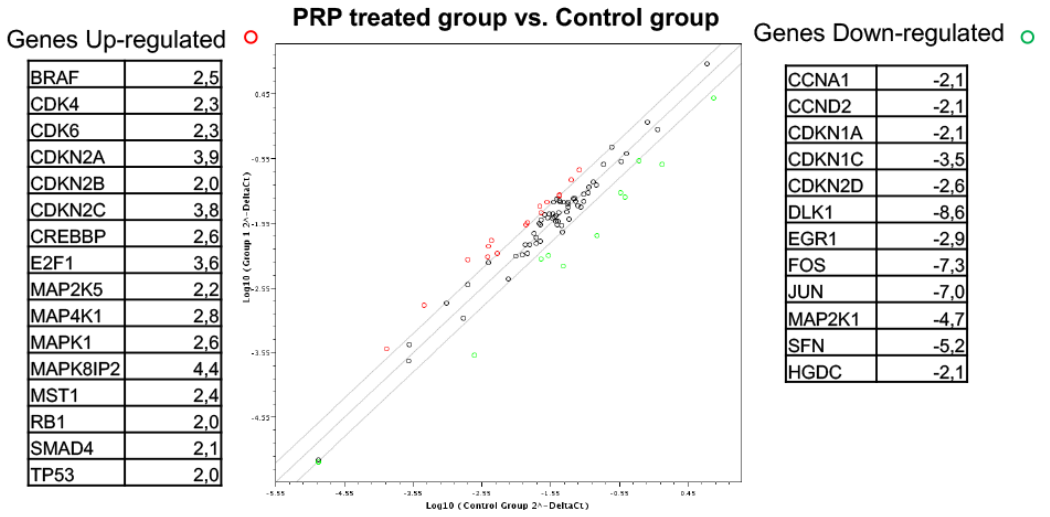
Figura 12: Perfiles de expresión génica de las CSCs, procedentes de la línea BxPC-3, tratadas con PRP mediante el uso de los microarrays de genes asociados al proceso EMT y al fenotipo CSC. Las CSCs se trataron 2 veces con PRP (T/Q 0.07/0.42 mg/mL) en el día 2 tras la siembra y en el día 4. En el día 5, se aisló la totalidad del ARN celular. Se establecieron 3 conjuntos de ARN celular extraídos de 3 muestras independientes de CSCs y se combinaron en un único *pool* de ARN para después proceder a la síntesis de la primera hebra de ADN complementario. (A) Expresión de genes relacionados con la metástasis. (B) Expresión de genes relacionados con la adhesión celular. (C) Niveles de expresión de genes con actividad supresora de tumores. (D) Expresión de genes que codifican citoquinas. Los niveles de expresión de todos los genes se normalizaron en base a los valores controles del grupo sin tratar. Figura tomada de [236].

Para completar el análisis de cambios de expresión genética tras la exposición al PRP, se utilizó el “Human MAP Kinase Signaling Pathway RT2 Profiler PCR Array” que analiza 84 genes relacionados con las rutas de señalización MAPK. Tal y como se notifica en la Figura 13A, varios genes asociados con las rutas de señalización JNK y ERK vieron disminuida su expresión como consecuencia de la acción de las (pro)enzimas pancreáticas. Ejemplos representativos de ello podrían ser los factores de transcripción oncogénicos c-JUN (-7 *folds*), FOS (-7.3 *folds*) y MEK1 (MAP2K1; -4.7 *folds*). Semejantes hallazgos cobran especial relevancia al considerar la hiperactivación de vías MAPK, como ERK y JNK, como un fenómeno usual vinculado a la progresión y agresividad de la patología en múltiples tipos de tumores, entre ellos el PDAC [244][245]. Paralelamente, la misma figura refleja que el tratamiento provocó el aumento de expresión de genes inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKN2A, 3.9 *folds*; CDKN2B, 2 *folds*; y CDKN2C, 3.8 *folds*), implicados en la inhibición del ciclo celular y, por tanto, en la contención de la proliferación [246]. Complementando tales beneficios derivados del tratamiento, la regulación al alza de CDKN2A adquiere mayor trascendente atendiendo al elevado riesgo de desarrollar cáncer de páncreas por pacientes con CDKN2A (p16) mutado [247]. Reforzando los resultados expuestos con anterioridad, también se aprecia una bajada drástica de la expresión de DLK1 (-8.5 *folds*), un gen frecuentemente sobreexpresado en numerosos tipos de neoplasias,

incluyendo el cáncer pancreático, y fuertemente relacionado con la ruta Notch y el fenotipo troncal poco diferenciado de las CSCs [248]. Además, el tratamiento con PRP condujo a una bajada de expresión de YWHAZ hasta un valor de -5.2 *fold*s; evento significativo en virtud de la vinculación del gen YWHAZ con el proceso EMT, la migración, la agresividad y la proliferación del PDAC [249]. Notablemente, el aumento de expresión de otros genes como SMAD4 (2.1 *fold*s) y TP53 (2 *fold*s) merece ser resaltado al considerar sus funciones cruciales como supresores de tumores en el PDAC [250]. Como añadidura, la figura suplementaria S2 recoge los cambios de expresión propiciados por el tratamiento con PRP en el resto de genes incluidos en los microarrays relativos al proceso EMT y al fenotipo CSC.

Ciertamente, una matización importante que se puede extraer de semejante plétora de datos de expresión génica tras el análisis de los 3 microarrays podría ser la alteración de la expresión de genes asociados con la ruta TGF β . La Figura 13B representa un análisis “in-silico” de las relaciones funcionales entre los factores codificados por algunos de los genes regulados a la baja por el tratamiento con PRP, tales como c-JUN, JNK, p38 o ERK. Curiosamente, todos estos genes están involucrados en la ruta no canónica, independiente de SMAD, del TGF β [251]. Así pues, estos resultados nos sugirieron una posible participación de la ruta TGF β como eje conductor de los efectos terapéuticos de PRP.

A



B

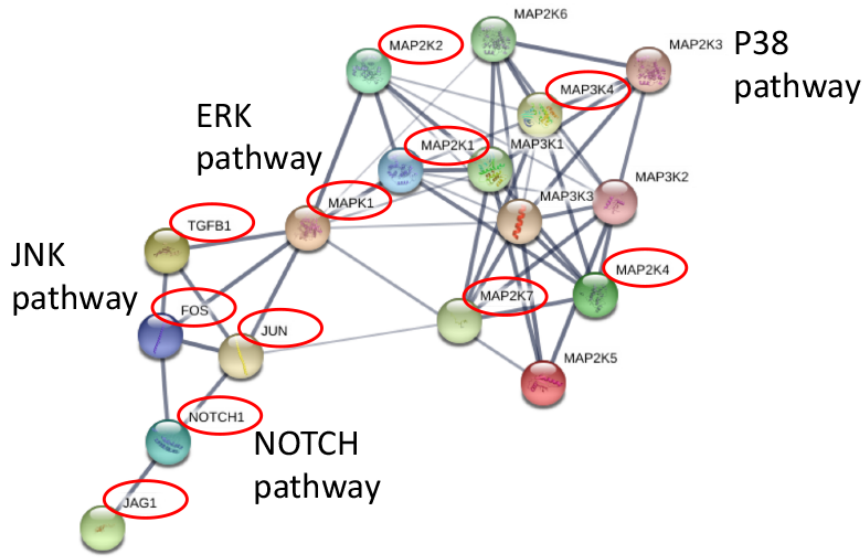


Figura 13: Perfiles de expresión génica de las CSCs, procedentes de la línea BxPC-3, tratadas con PRP mediante el uso del microarray de genes asociados con las rutas de quinasas (MAPK). Las CSCs se trataron 2 veces con PRP (T/Q 0.07/0.42 mg/mL) en el día 2 tras la siembra y en el día 4. En el día 5, se aisló la totalidad del ARN celular. Se establecieron 3 conjuntos de ARN celular extraídos de 3 muestras independientes de CSCs y se combinaron en un único pool de ARN para después proceder a la síntesis de la primera hebra de ADN complementario. (A) Esquema de alteraciones significativas de la expresión de algunos genes, con 16 genes regulados al alza y 12 genes regulados a la baja tras el tratamiento en comparación a los niveles de expresión de las CSCs control sin tratar. (B) Análisis funcional in-silico de las proteínas vinculadas con la vía JNK (del inglés “*c-jun N-terminal kinase*”). Las líneas verdes representan las asociaciones proteína-proteína mientras que el grosor de las líneas es directamente proporcional a la consistencia del soporte de datos que permite establecer tales interacciones funcionales (la fuente de los datos utilizados procede sólo de estudios experimentales y bases de datos). Los círculos rojos destacan aquellos factores cuyos niveles de expresión disminuyeron tras el tratamiento. Figura tomada de [236].

El tratamiento con PRP induce una inhibición de la activación de la ruta TGFβ en las CSCs, tanto de su vía canónica como de la no canónica

Con el objetivo de explorar más en detalle la ruta del TGFβ, se procedió al análisis de expresión de otros genes adicionales relacionados con esta vía molecular como RAC1, RAC1b (rama no canónica) y SMAD7 (componente de la rama canónica). La Figura 14A muestra que el tratamiento con PRP condujo al aumento de expresión de RAC1+RAC1b (2.1 *folds*) y de la isoforma RAC1b en particular (3.4 *folds*) con $p < 0.01$, lo que sugiere que el tratamiento provoca un cambio en el splicing alternativo del gen de RAC1 y favorece la expresión de la isoforma RAC1b sobre RAC1 (disminuye la ratio RAC1/RAC1b). En otro sentido, también se observa una bajada significativa de la expresión de SMAD7 (un 25% del valor control, aproximadamente).

Seguidamente, se llevó a cabo un análisis de expresión de varios miARNs representativos del PDAC y vinculados con la ruta TGFβ. Por un lado, se observó que la exposición de las CSCs pancreáticas al PRP propició la regulación a la baja de miARNs oncogénicos (Figura 14B), tales como miR-21-5p y miR182-3p ($p < 0.01$).

Dichos resultados adquieren incluso más relevancia atendiendo a la vinculación de miR-21 con la capacidad de la vía TGF β para promover el proceso EMT y la agresividad del cáncer [252], o a la sobreexpresión de miR-182 desencadenada por el eje TGF β /SMAD [253]. Por el contrario, la misma figura muestra que el supresor tumoral miR-7 experimentó una subida de expresión tras el tratamiento ($p < 0.05$). La trascendencia de este fenómeno podría explicarse dada la participación del miR-7 en la orientación de la ruta TGF β hacia una función supresora de tumores inhibiendo el proceso EMT [254].

Con el fin de obtener datos más robustos acerca del status de la ruta TGF β en las CSCs pancreáticas tratadas con las (pro)enzimas, se procedió al análisis del estado funcional de las proteínas SMAD2/3 (en representación del ramal canónico de la mencionada ruta). Para ello, se detectó la cantidad proteica de SMAD2/3 y de SMAD2/3 fosforilados/activadas (p-SMAD2/3), en distintos intervalos de tiempo, tanto en las CSCs sin tratar (controles), en las CSCs tratadas con PRP, en las CSCs estimuladas con el ligando TGF β 1 y en las CSCs tratadas con PRP y posteriormente estimuladas con TGF β 1 (Figuras 14C, D, Figuras Suplementarias S3, 4). En dichas figuras se puede apreciar que el tratamiento con PRP redujo la proporción de p-SMAD2/3 en comparación con SMAD2/3 total con respecto a los niveles en las células control no tratadas. De forma esperable, la estimulación con TGF β 1 de las células control desencadenó un aumento de p-SMAD2/3, experimentando su cénit a las 2 horas tras el estímulo. Por el contrario, la misma estimulación con TGF β 1 de las CSCs tratadas previamente con PRP no indujo un aumento significativo de la cantidad de p-SMAD2/3 en ninguno de los intervalos de tiempo tomados en consideración (Figuras 14C, D). Por lo tanto, estos resultados permiten asumir que la formulación PRP promueve una inhibición de la fosforilación de SMAD2/3.

A continuación, nuestro estudio se dirigió a evaluar los efectos del PRP en el ramal independiente de SMAD (no canónico) de la vía TGF β . Se analizó la cantidad de p38 y de p38 fosforilado/activado (p-p38) en las células control y tras la exposición a PRP (Figura 14E, Figura Suplementaria S5). La figura 14E revela que la cantidad de p-p38 tras el tratamiento con las (pro)enzimas pancreáticas es significativamente menor en comparación a la cantidad exhibida por las CSCs controles sin tratar. En su conjunto,

estos datos indican que el tratamiento con PRP inhibe la ruta TGF β , tanto su vía canónica dependiente de SMAD como su vía no canónica, independiente de SMAD y dirigida por la fosforilación de p38. Como apunte importante, cabe aclarar que el tratamiento con PRP no promueve un bloqueo total de la ruta TGF β , sino una inhibición parcial.

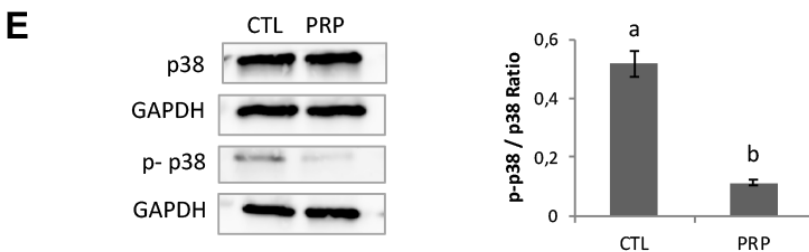
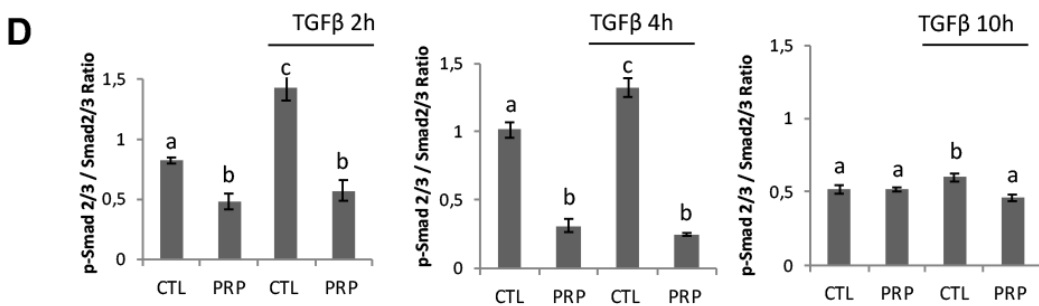
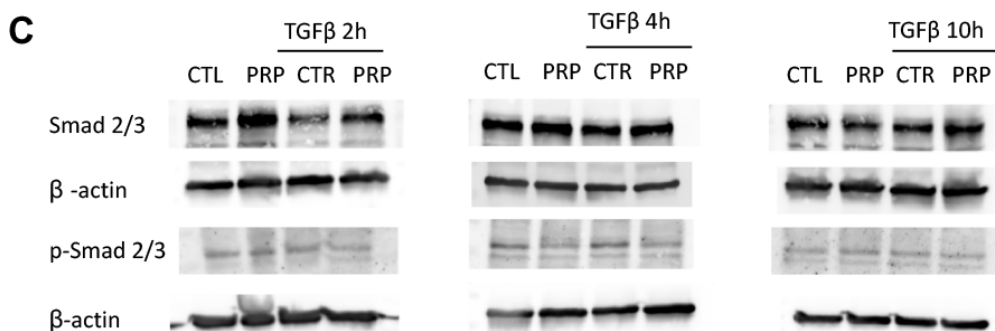
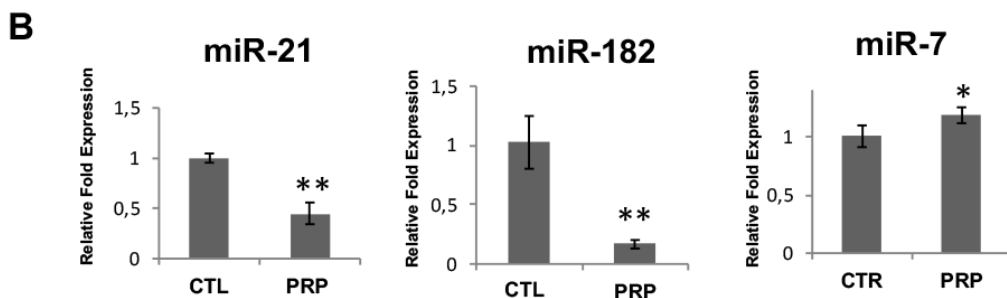
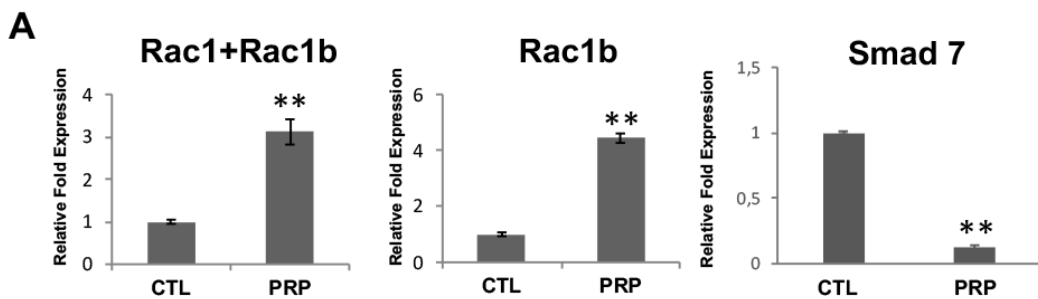


Figura 14: El tratamiento de las CSCs pancreáticas con la formulación PRP promueve una inhibición de las vías tanto dependiente como independiente de SMAD de la ruta de señalización de TGF β . (A) Análisis por RT-qPCR de RAC1b; RAC1 + RAC1b y SMAD7 tras el tratamiento con PRP. Todos los valores de expresión se normalizaron a aquellos correspondientes a los de los controles no tratados. (B) Análisis por RT-qPCR de miR-21-5p, miR-182-3p y miR-7. La normalización de los valores se realizó mediante el uso del conjunto control de *primer* UniSp6 RNA Spike-in. (C) Las CSCs control sin tratar y las CSCs tratadas con PRP se incubaron con TGF β 1 (5 ng/mL) durante 2, 4 y 10 horas. Se utilizó la técnica de Western Blotting para analizar la expresión de SMAD2/3 total junto con la expresión de SMAD2/3 fosforilado (p-SMAD2/3) en cada uno de los intervalos de tiempo indicados. (D) Se cuantificó la cantidad relativa de p-SMAD2/3 y SMAD2/3 total, normalizada con respecto a la β -Actina, utilizando el software Image-J NIH. Los resultados se muestran como la ratio p-SMAD2/3 vs SMAD2/3 total. (E) Análisis por Western Blotting de la expresión de p38 fosforilado (p-p38) y p38 total en las CSCs tratadas con PRP en comparación a las CSCs controles sin tratar. Se cuantificó la cantidad relativa de p-p38 y p38 total, normalizada en base a los valores de GAPDH, utilizando el software Image-J NIH. Los resultados se muestran como la ratio p-p38/p38 total. Se realizaron diferentes lecturas para conseguir resultados estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Figura tomada de [236].

PRP induce cambios en la localización proteica subcelular de la E-Cadherina y la β -Catenina

Para verificar los datos de expresión génica observados en el análisis de los microarrays, referentes a la E-Cadherina y la β -Catenina, se procedió a la detección de dichas moléculas por inmunofluorescencia. Los resultados expuestos en la Figura 15A muestran que las CSCs control poseen una localización subcelular de la β -Catenina en la membrana celular, así como un marcaje débil y difuso en el citoplasma y el núcleo, mientras que las CSCs tratadas con PRP mantuvieron la distribución de la β -Catenina principalmente en la membrana y el citoplasma, pero exhibieron ausencia de traslocación nuclear de dicha proteína. En la Figura 15B se aprecia que el tratamiento reduce, aparentemente, la expresión proteica global de la E-Cadherina, lo que contrastaría con su aumento de expresión a nivel transcripcional expuesto con anterioridad. No obstante,

se aprecia que la E-Cadherina sigue estando concentrada en la membrana plasmática de las células tratadas (donde actuaría como molécula de adhesión característica de las células epiteliales). Además, se debe considerar que la disgregación de las estructuras esféricas de las CSCs por acción de la formulación de (pro)enzimas pancreáticas conduce a una menor aglomeración celular y, por ende, a una menor concentración global de E-Cadherina (sin que necesariamente implique un nivel menor de expresión de la misma por cada célula individual). De hecho, las imágenes parecen mostrar una tendencia de la E-Cadherina a localizarse principalmente en la membrana plasmática de las CSCs tratadas, sin traslocación nuclear como parece apreciarse en algunas CSCs controles sin tratar.

Por tanto, se puede asumir que el tratamiento con la formulación de (pro)enzimas pancreáticas promueve la concentración de la E-Cadherina y β -Catenina en la membrana plasmática, para ser partícipes de uniones intercelulares, y no en el núcleo celular donde podrían funcionar como factores de transcripción.

La formulación PRP inhibe la activación de la ruta oncogénica Hippo en las CSCs pancreáticas

El siguiente paso versó en comprobar si la ruta de señalización oncogénica y mecano-transductora Hippo (estrechamente relacionada con las estructuras de adhesión celular) también se veía afectada por el tratamiento y si dicha alteración se enmarcaba en consonancia con las propiedades antitumorales de PRP descritas con anterioridad. Para tal fin, se determinó la cantidad proteica total del factor YAP y de su estado fosforilado/inactivo (p-YAP) tras el tratamiento con PRP. La Figura 15C refleja que la expresión proteica de YAP (detectada por inmunofluorescencia) experimenta una bajada inducida por las (pro)enzimas pancreáticas y un cambio de su localización subcelular fuera del núcleo. Posteriormente, se reafirmó tal resultado mediante el análisis de la cantidad de YAP y p-YAP por western Blotting (Figura 15D y Figura Suplementaria S6). Notablemente, se aprecia una correlación negativa entre las proporciones de YAP y p-YAP, con un marcado incremento de la cantidad de p-YAP en comparación a la

cantidad de YAP total tras el tratamiento con PRP (en consonancia con la ausencia de localización nuclear mostrada en la imagen anterior).

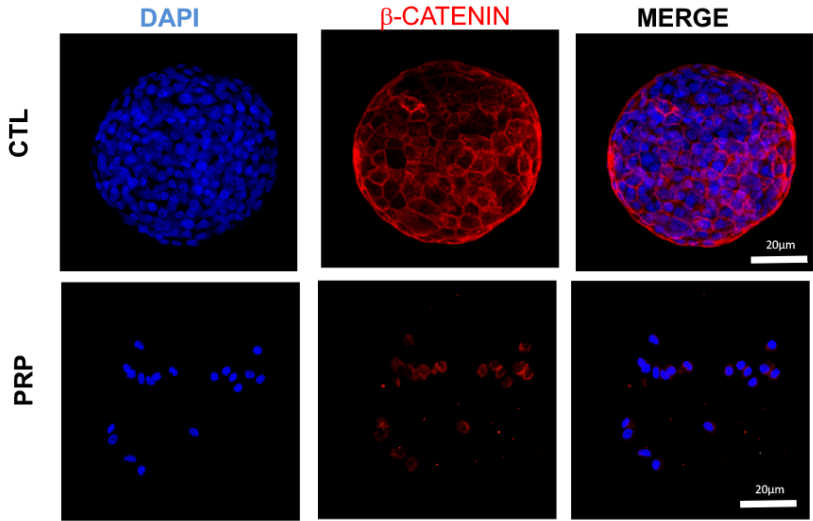
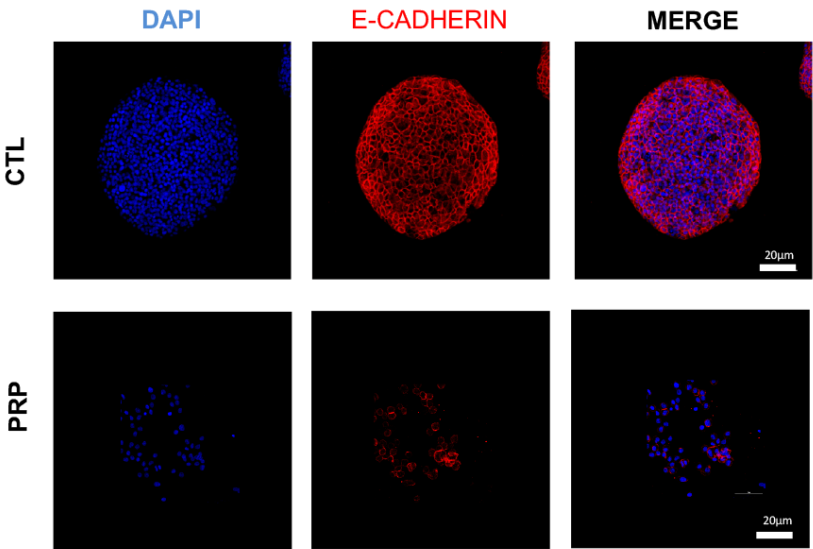
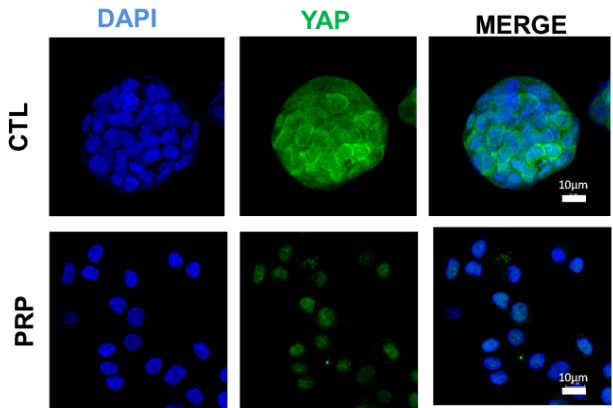
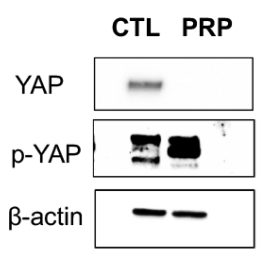
A**B****C****D**

Figura 15: Análisis de proteínas de adhesión y componentes de la ruta molecular Hippo en las CSCs tratadas con PRP vs CSCs control sin tratar utilizando microscopía confocal y Western Blotting. (A) Las CSCs tratadas presentan una localización de la β -Catenina principalmente en la membrana plasmática y el citoplasma, pero sin traslocación nuclear. (B) El tratamiento con la formulación PRP mantiene la localización de la E-Cadherina en la membrana plasmática mientras parece estar ausente en el núcleo celular. La expresión de ambas moléculas en la superficie celular se detectó en rojo mientras que el núcleo celular se tiñó con DAPI (azul). La barra de escala representa un tamaño de 20 μm . (C) La aplicación de PRP promueve la disminución de la expresión proteica de YAP en las CSCs pancreáticas. La expresión de YAP se muestra en verde y el núcleo celular se tiñó con DAPI (azul). La barra de escala representa un tamaño de 10 μm . (D) Análisis por Western Blotting de la expresión de la proteína YAP total y de YAP fosforilada (p-YAP) en las CSCs tratadas vs controles sin tratar. Se aprecia un aumento significativo de la cantidad de p-YAP con respecto a YAP total en las CSCs tratadas. Figura tomada de [236].

Por ende, estos resultados indican una inhibición de la ruta oncogénica Hippo tras el tratamiento al impedir la localización nuclear y actividad transcripcional del factor YAP.

3. Potencial antitumoral de la formulación PRP *in vivo*

La formulación de (pro)enzimas pancreáticas inhibe la capacidad iniciadora de tumores de las CSCs y el crecimiento tumoral en ratones inmunocomprometidos

La siguiente etapa se centró en comprobar si los efectos antitumorales de PRP, observados *in vitro*, podían ser emulados *in vivo*. Para ello, se estableció un modelo de xenoinjertos tumorales en ratones inmunodeprimidos generados a partir de las CSCs pancreáticas procedentes de la línea BxPC-3. Se dispusieron 3 grupos distintos de ratones: controles inoculados con las CSCs sin ningún tipo de tratamiento; ratones inoculados con CSCs que fueron pretratadas con PRP antes de la inyección en los animales; y un grupo inoculado con CSCs pretratadas con PRP al que se le continuó administrando el tratamiento con PRP tras la inducción del crecimiento tumoral (Figura 16A). En concordancia con trabajos previos [255], cada grupo quedó conformado por un total de 10 animales con el objetivo de obtener datos estadísticamente consistentes. No

obstante, este tipo de estudios *in vivo* presentan el gran obstáculo relativo a la pérdida de especímenes, que acontece inevitablemente durante el trascurso del estudio, por muerte prematura desencadenada por las condiciones invasivas de tratamiento. En nuestro modelo, se perdieron 6 animales, 2 de ellos pertenecientes al grupo de pretratamiento y otros 4 incluidos en el grupo de pretratamiento + tratamiento (a causa de la anestesia y de eventos ulcerosos tras la práctica de las punciones), antes de la finalización del tiempo protocolario de análisis. Por ende, estas muertes no se debieron a efectos adversos asociados con el PRP, sino a problemas técnicos con la manipulación animal y puesta en práctica del estudio. Así pues, los resultados que se muestran aquí han sido normalizados en base al número final (N) de animales en cada grupo experimental. Los resultados revelaron que 9 de los 10 ratones del grupo control desarrollaron tumores palpables mientras que sólo 3 de los 8 ratones del grupo de pretratamiento y 3 de los 6 del grupo de pretratamiento + tratamiento desarrollaron las correspondientes neoplasias malignas (Figura 16B, C). Por tanto, la incidencia tumoral (%) del grupo control no tratado fue del 90%, la del grupo de pretratamiento fue del 41% y la del grupo de pretratamiento + tratamiento fue del 50% (Figura 16D). Estas observaciones reflejan un claro potencial para mitigar la capacidad iniciadora de tumores de las CSCs pancreáticas por parte del tratamiento con PRP. Adicionalmente, se evaluó el crecimiento tumoral en las diferentes categorías experimentales mediante la medición del volumen de la masa cancerígena cada 2 días durante un total de 34 días (Figura 16E). Esta imagen muestra que tanto el pretratamiento como el pretratamiento + tratamiento sostenido con PRP promovieron una inhibición significativa en el crecimiento neoplásico en comparación con los tumores controles sin tratar. De forma esperable, se observa una inhibición en el crecimiento tumoral más pronunciada en el conjunto de animales sometidos a pretratamiento + tratamiento sostenido en el tiempo en comparación con el grupo de pretratamiento simple.

Se determinó el índice tumorigénico (TIN) que relaciona la incidencia tumoral con el tamaño/peso de la masa cancerígena, el cual puede usarse como una medida de la agresividad de la patología. La Figura 16F revela diferencias significativas en el índice TIN entre los grupos de ratones control, pretratamiento y pretratamiento + tratamiento

(los grupos de tratamiento exhiben un índice TIN menor que el grupo control), lo cual apoya la suposición acerca del potencial antitumoral del tratamiento con PRP.

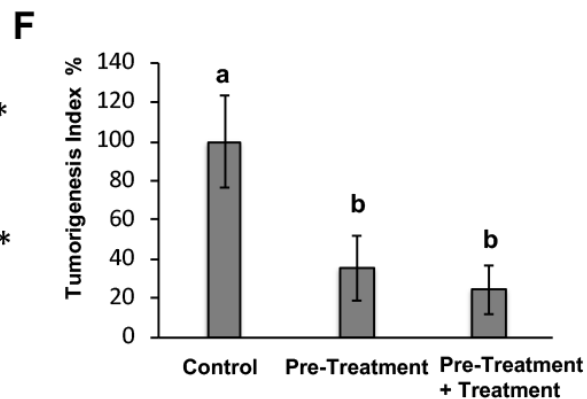
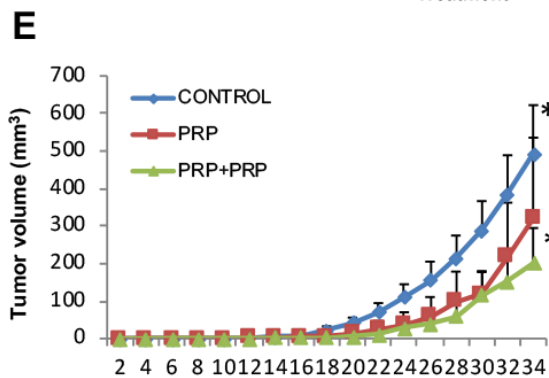
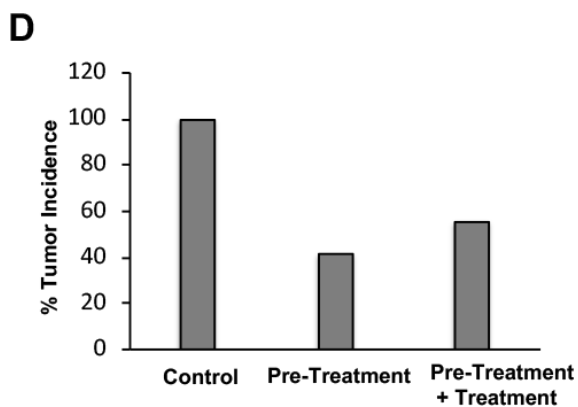
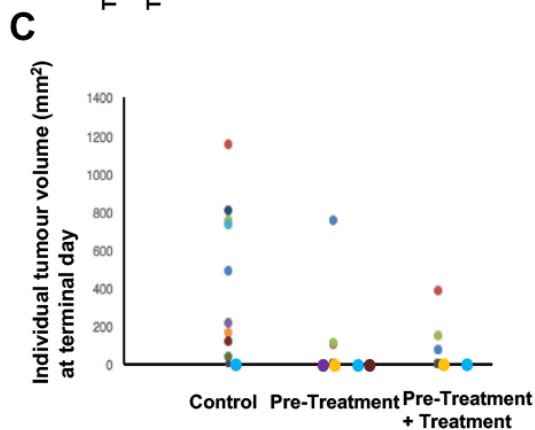
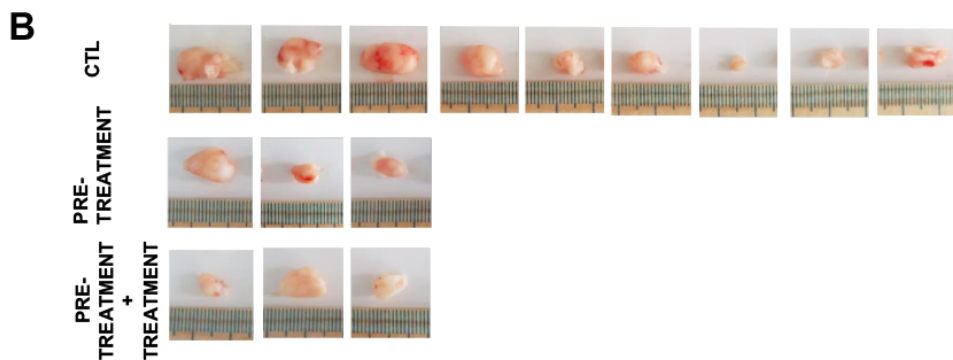
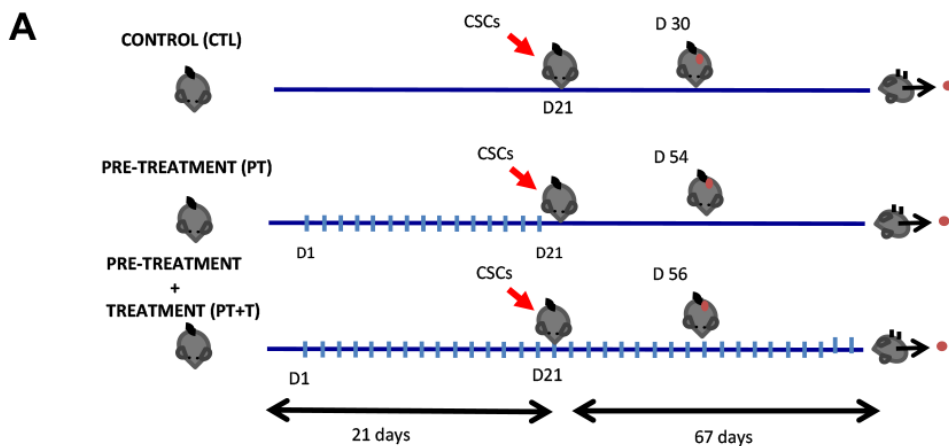


Figura 16: La formulación PRP reduce el crecimiento tumoral de las CSCs pancreáticas in vivo. (A) Esquema del diseño del estudio in vivo con el objetivo de determinar la capacidad antitumoral de PRP contra tumores inducidos por las CSCs pancreáticas. Las barras perpendiculares representan la inyección de las dosis de PRP. La inoculación de las CSCs pancreáticas en los flancos de ratones inmunodeprimidos están representada por una flecha roja. (B) Fotografías de los tumores subcutáneos, obtenidos al final del protocolo experimental, procedentes de los ratones pertenecientes tanto al grupo control sin tratar como al grupo de tratamiento. (C) Peso (mg) de cada tumor (representados con círculos de diferentes colores) al final del protocolo experimental. Los ratones que no desarrollaron tumores se representan por círculos en el eje X. (D) Incidencia tumoral. Los porcentajes se calcularon comparando el número de ratones que desarrollan tumores en cada grupo con el número total de ratones en ese mismo grupo. (E) Evolución del tamaño tumoral de cada masa cancerosa durante el procedimiento. MEM \pm SE. * $p < 0.05$ vs. grupo control. (F) Índice de tumorigénico (TIN). Este valor relaciona la incidencia tumoral con el peso tumoral. Se muestra el valor medio de $Tin \pm SE$ correspondiente a la finalización del procedimiento experimental. Se valoró estadísticamente la significancia de las diferencias en los índices TIN ($p < 0.05$). Figura tomada de [236].

El tratamiento con PRP promueve cambios histológicos en el tejido tumoral

Se realizó un análisis histológico de secciones tumorales extraídas de las masas cancerígenas (Figuras 19A y B). Se observó que los tumores expuestos al tratamiento con PRP presentaron diferentes características histológicas en comparación con los tumores control del mismo tamaño, tales como extensas áreas necróticas. Cabe destacar con especial énfasis la importante disminución del tejido fibrótico asociado a la masa neoplásica. Concretamente, la figura 17A representa una tinción con hematoxilina y eosina que reveló una reducción del marcaje de proteínas estromales en las secciones tisulares procedentes de los tumores sometidos a alguno de los 2 regímenes de tratamiento previamente especificados. Reforzando estos hallazgos, se apreció que los tumores expuestos a PRP contenían una menor cantidad de fibras de proteínas estromales en comparación con los controles. De hecho, la tinción de Masson con tricromo de los tumores del grupo control (Figura 17B, CTL) mostró que las CSCs pancreáticas inducían

la formación de grandes islas tumorales inmersas en un estroma rico en colágeno (representado en color verde) con gran densidad de tejido conectivo.

El tratamiento con PRP inhibe el fenotipo troncal de las CSCs in vivo

Por otra parte, se analizó por inmunofluorescencia la expresión del marcador CD44 de CSCs en las secciones tumorales procedentes de los diferentes grupos de ratones (Figura 17C). En dicha imagen se aprecia que las secciones tumorales procedentes de las masas cancerígenas del grupo control presentaron un fuerte marcaje de CD44, mientras que las pertenecientes a las masas neoplásicas de los grupos de ratones tratados con PRP mostraron un marcaje débil.

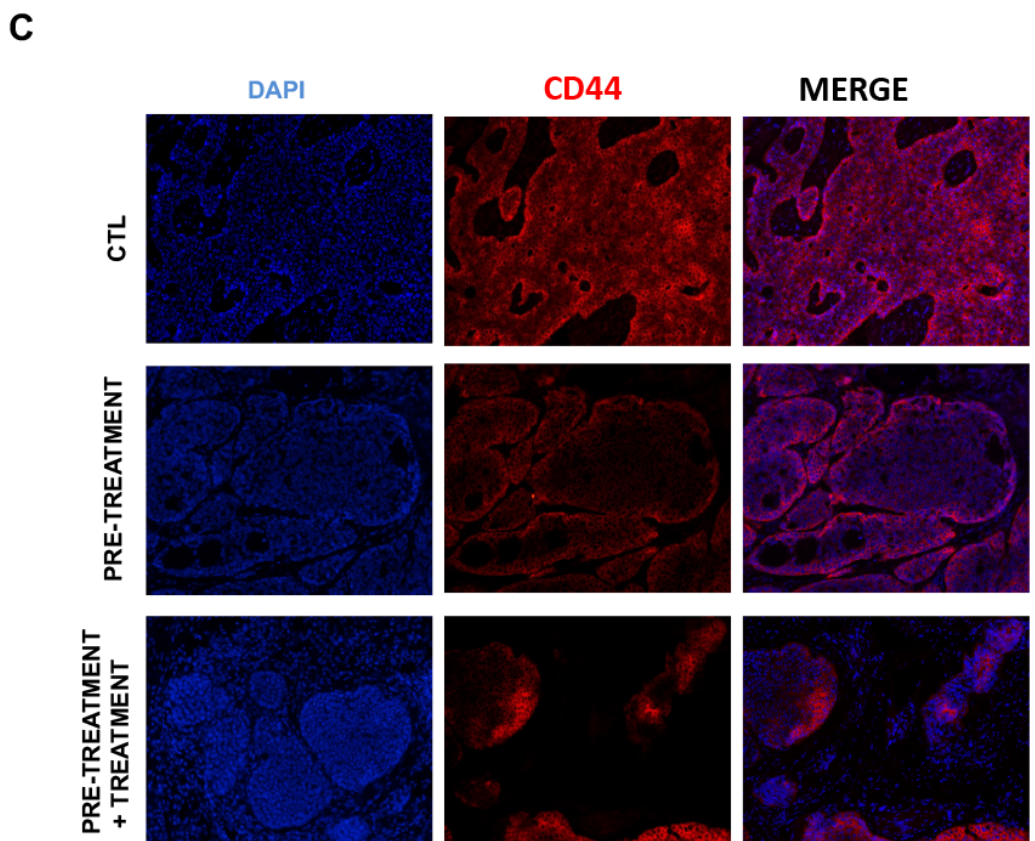
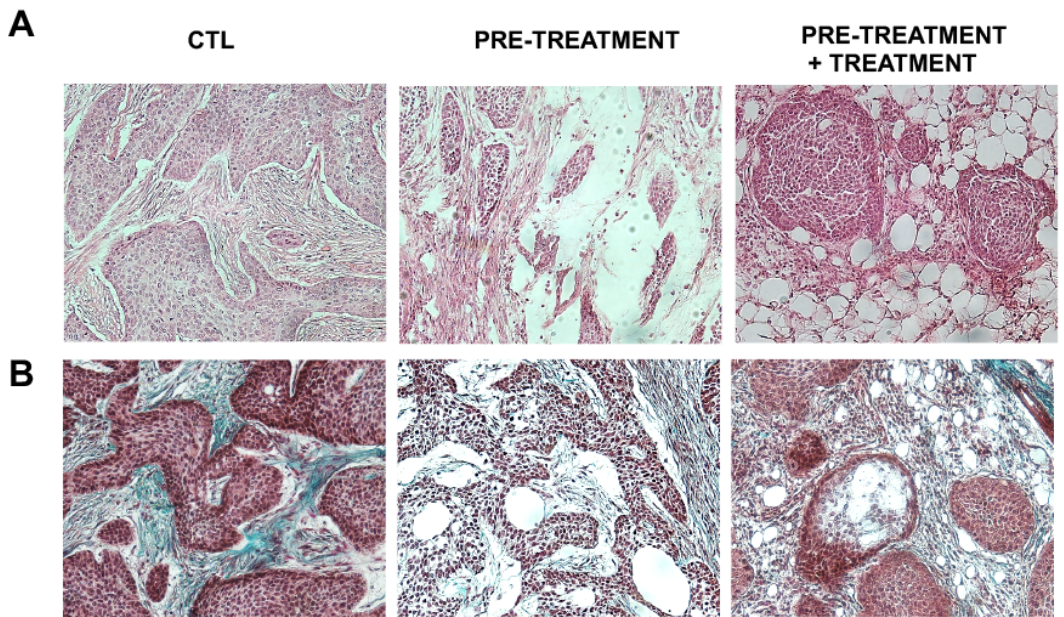


Figura 17: Efectos de PRP en el tejido tumoral, el depósito de la matriz extracelular y en la expresión del marcador CD44. Se exponen imágenes representativas de secciones tumorales teñidas con hematoxilina/eosina (H&E) (A) y con Tricrómico de Masson (MS) (B). Los tumores procedentes de los ratones tratados con PRP presentan una menor cantidad de tejido fibrótico (la tinción con H&E se representa en rosa mientras que el marcaje con MS se visualiza en verde) en comparación con los tumores del grupo control sin tratar. (C) Marcaje con inmunofluorescencia de secciones tumorales para detectar la expresión de CD44 (rojo). Se muestra una magnificación de 10×. Figura tomada de [236].

Como conclusión, los resultados desvelan que los efectos antitumorales de las (pro)enzimas pancreáticas sobre las CSCs de cáncer de páncreas (inhibición del fenotipo CSC, reducción de su capacidad iniciadora de tumores y del crecimiento neoplásico) también son extrapolables al nivel de estudios *in vivo* utilizando modelos de xenoinjertos tumorales en ratones inmunodeprimidos.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio reflejan un interesante potencial de la formulación de (pro)enzimas pancreáticas, PRP, como agente antitumoral contra CSCs derivadas de la línea celular BxPC-3 de PDAC. El potencial antitumoral de los zimógenos inactivos, en lugar de las enzimas pancreáticas propiamente activas, ha sido reportado en varios estudios previos [234] [235], destacándose la ausencia de efectos secundarios adversos tras la administración de PRP a pacientes humanos. Este fenómeno podría atribuirse a una posible activación selectiva de las (pro)enzimas en el tejido tumoral mientras que en los tejidos sanos resultarían inocuas. A este respecto, la Tripsina activa es capaz de activar al Quimotripsinógeno [233], por lo que parece razonable centrarse en la activación de la Tripsina como desencadenante primordial del efecto terapéutico de PRP. Tomando en consideración el ambiente ácido característico de los tumores sólidos [256] junto con la capacidad de autoactivación del Tripsinógeno exclusivamente a PH básicos [257], podría hipotetizarse la presencia de alguna molécula expresada por las células cancerígenas capaz de inducir la activación de la Tripsina más que atribuirlo a las condiciones ambientales. En este sentido, se ha descrito la capacidad de la catepsina B (proteasa lisosomal) para ejercer dicha acción [258] [259]. De hecho, se ha mostrado una mayor expresión de la catepsina B en las CSCs de cáncer de páncreas en comparación con las células cancerosas parentales con fenotipo no troncal, una mayor expresión de la enzima en el tejido tumoral sólido en comparación con el tejido sano, así como una correlación positiva entre un incremento en su expresión y las etapas más avanzadas de la enfermedad [260]. Además, los autores de este artículo mostraron que la catepsina B no sólo se expresaba en gran cantidad en el citoplasma de las células malignas, sino que también era detectable en la superficie celular y secretada en el medio extracelular. Así pues, estos datos apoyan la hipótesis previamente mencionada sobre la activación cuasi selectiva de las (pro)enzimas pancreáticas en el tejido tumoral y apuntan a una posible mayor capacidad antitumoral (derivada de una mayor eficiencia de activación) del tratamiento contra las CSCs.

En este ámbito, los resultados demostraron que el tratamiento con PRP disminuye el porcentaje de células positivas para varios marcadores característicos de las CSCs pancreáticas como ALDH, CD326, CD44 y CXCR4 [261]. Del mismo modo, el tratamiento con la formulación PRP inhibió la formación de esferas primarias y secundarias en condiciones de cultivo específicas para inducir el mantenimiento del fenotipo de CSCs. Tal evento merece ser destacado puesto que la formación de esferas celulares es un rasgo distintivo básico de las CSCs [262]. Ciertamente, también se observó con posterioridad que el tratamiento con PRP indujo cambios de expresión de otros biomarcadores de CSCs pancreáticas, como una ligera bajada de CD24 y un aumento notable de CD133. Si se considerasen los cambios de expresión de los genes de forma aislada, los resultados obtenidos podrían entrar en una dicotomía contradictoria ante la subida de expresión de CD133 frente a la bajada de los restantes marcadores mencionados previamente. No obstante, cabe destacar que el fenotipo troncal de las CSCs es muy complejo y exhibe su propia heterogeneidad en cuanto a distintas subpoblaciones con patrones peculiares de expresión de biomarcadores e incluso con grados de troncalidad distintos [263]. Por tanto, sería más acertado considerar los cambios de expresión de marcadores (tanto a nivel transcripcional como proteico) en su conjunto y ello parece reflejar una consistente inhibición del fenotipo troncal tras el tratamiento avalada por la disminución de la capacidad formadora de estructuras esféricas.

Profundizando en nuestras investigaciones, el análisis de 3 microarrays de genes evidenció que el tratamiento con las (pro)enzimas pancreáticas propicia amplios cambios de expresión genética de numerosos factores estrechamente relacionados con las CSCs. En primer lugar, se reveló que la formulación PRP tiene la capacidad de desencadenar una consistente inhibición del proceso EMT en las CSCs tratadas, así como inducir un fenotipo más diferenciado (todo ello evidenciado por las alteraciones en la expresión de múltiples genes, destacándose la regulación a la baja de marcadores mesenquimales como SNAIL o SLUG, la subida de expresión de genes relacionados con la diferenciación celular y la subida del marcador de fenotipo epitelial E-Cadherina). Este evento concuerda con estudios previos que demostraron el potencial de las (pro)enzimas

pancreáticas para propiciar una “re-diferenciación” de células malignas de cáncer pancreático y colorrectal [234], asemejándose más a las células sanas de las que proceden. Asimismo, ello también se posiciona en línea con la inhibición del fenotipo troncal/pluripotente de las CSCs expuesto previamente. En este punto cabe hacer un inciso para comentar la drástica subida de la expresión del gen Nanog tras el tratamiento. Este hecho parece emerger como una fuerte contradicción, ya que Nanog está directamente relacionado con el fenotipo troncal poco diferenciado de las CSCs, la agresividad de la enfermedad y la metástasis [264]. Sin embargo, cabe hacer hincapié en la importancia de la colaboración de Nanog con otras moléculas como CD44 y OCT4 para impulsar la adquisición de características troncales por parte de las CSCs [265]. De hecho, los autores de este estudio especificaron la necesidad de colaboración entre Nanog y OCT4 para fomentar la sobreexpresión de SOX2 en este contexto. Atendiendo a la bajada de expresión de CD44, OCT4 (factor ampliamente reconocido como marcador de las CSCs [266]) y a la no alteración de los niveles de mRNA de SOX2 tras el tratamiento con PRP (Figura 11D), resulta tentador sugerir que el drástico aumento de expresión de Nanog parece no ejercer un papel como factor tumorigénico. Apoyando tal suposición, se ha indicado que Nanog puede actuar como inhibidor de la ruta WNT al promover la fosforilación/inactivación de la β -catenina [267]. En el ámbito del cáncer, semejante fenómeno sería de especial relevancia al considerar el papel clave de la mencionada vía molecular en el mantenimiento de las CSCs pancreáticas y de su resistencia a agentes quimioterápicos como el cisplatino [268]. Congruentemente, la actividad antitumoral de la formulación PRP también queda patente con la atenuación de los niveles de expresión de numerosos genes relacionados con la metástasis y con la potenciación de otros tantos relacionados con la adhesión celular o categorizados como supresores de tumores. En este último conjunto, procede enfatizar algunos factores como FOXP1 dada su función dual documentada en el cáncer. En particular, se ha observado que los factores de transcripción de la familia FOXP pueden actuar no sólo como supresores de tumores, sino también como oncogenes en base al tipo de tumor que se considere, al tipo de factor molecular con el que interaccionen e incluso en base a parámetros extrínsecos al propio tumor como el status del sistema inmune [269].

Ciertamente, cabe valorar cada factor molecular en el contexto apropiado. Un caso más concreto se puede apreciar en torno al aumento de expresión de SIRT1 en las CSCs tratadas. Por una parte, se ha confirmado el papel de este factor molecular en la potenciación de la agresividad y del fenotipo troncal en las CSCs al interactuar con el complejo proteico CRL4B [270] pero, por otra parte, también se ha indicado que SIRT1 puede funcionar como supresor tumoral al inhibir la ruta oncogénica WNT/ β -Catenina [271]. Otro ejemplo similar lo encontramos con la subida de los niveles de expresión de SPARC. En el PDAC, se ha descrito que dicha proteína extracelular puede desempeñar una función dual tanto como oncogén promoviendo el crecimiento neoplásico o como supresor tumoral inhibiendo la proliferación de las células malignas y promoviendo su apoptosis [272]. Curiosamente, los autores de este estudio matizaron que la función de SPARC parecía estar profundamente condicionada por la presencia/ausencia de fibronectina y que, en particular, los niveles bajos de este segundo factor propiciaban el comportamiento de SPARC como supresor tumoral. Semejante suceso cobra especial relevancia atendiendo a la bajada de expresión de la fibronectina (FN1) inducida por PRP (Figura 12A), lo que le otorgaría un valor positivo a la subida de expresión de SPARC. En este campo, también merece especial atención la subida de expresión de SMAD4 y TP53 tras el tratamiento dado que son 2 de los genes supresores de tumores frecuentemente inhibidos en una gran mayoría de PDACs [250]. En conjunto, estos datos refuerzan el papel de PRP como agente antitumoral con un gran potencial para modular los equilibrios moleculares que rigen el comportamiento de las CSCs en el PDAC.

En un mayor grado de complejidad, el tratamiento con la formulación PRP parece promover cambios significativos en varias rutas moleculares con un papel importante en el cáncer y las CSCs. En primer lugar, los resultados muestran que el tratamiento incita la regulación a la baja de varios genes clave de la ruta Notch, como es el caso de Notch1 o Jag1 [273], lo cual merece una especial consideración en virtud de la estrecha relación de la vía Notch y la adquisición de un fenotipo troncal poco diferenciado por parte de las células malignas de cáncer de páncreas [274]. Reforzando la aparente inhibición de dicha ruta molecular, se destaca la bajada de expresión, tras la aplicación de PRP, tanto de SNAIL como de SLUG dado que son genes estimulados, junto con el proceso EMT,

por la vía Notch [275]. Por otra parte, los resultados mostraron que varios genes importantes de las rutas oncogénicas JNK y ERK experimentaron una bajada de expresión tras la aplicación de PRP. En concreto, se apreció una fuerte disminución de los niveles de expresión de c-JUN y c-FOS que, además de ser genes clave en las mencionadas vías moleculares, tienen la capacidad de interactuar físicamente entre sí y Participar conjuntamente (comúnmente formando parte de un complejo proteico denominado AP1) en la inducción, progresión y metástasis en varios tipos de tumores como el cáncer gástrico [276], pulmonar [277], cervical [278] o el osteosarcoma [279]. Adicionalmente, el gen MEK1 también experimentó una notable bajada de expresión, fenómeno relevante no sólo por la implicación de MEK en la vía ERK de proliferación, sino por la participación del eje MEK/ERK en la adquisición de un fenotipo CSC con expresión de ALDH [280]. De hecho, se han realizado numerosos estudios para comprobar la eficacia antitumoral de inhibidores de MEK, como es el caso de un ensayo clínico de fase II evaluando el potencial del compuesto PD0325901 en cáncer de pulmón, colon, mama y páncreas [281]. Mas aún, la aparente inhibición de dicha ruta molecular fuertemente involucrada en la proliferación y crecimiento tumoral, propiciada por PRP, es consistente con el aumento de expresión de genes inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKN2A, CDKN2B y CDKN2C). En particular, la subida de expresión de CDKN2A merece un énfasis especial puesto que se ha determinado que es uno de los 4 genes más frecuentemente mutados en el PDAC junto con KRAS, TP53 y SMAD4 [282]. Sin embargo, el status/alteración de una vía molecular determinada también debería ser valorado en un contexto apropiado dada la interconexión entre rutas moleculares. Como prueba de ello, se ha enfatizado la necesidad de bloquear de forma simultánea la vía PI3K/AKT/mTOR junto con la ruta MAPK/MEK/ERK como estrategia antitumoral efectiva puesto que el bloqueo de cualquiera de ellas de forma individual suele provocar la hiperactivación de la otra a través de un mecanismo de compensación que otorga resistencia a las terapias inhibitoras [283].

Respecto a la ruta TGF β , una amplia variedad de estudios han establecido una conexión entre dicha vía molecular y la progresión de numerosos tipos de tumores incluyendo el cáncer de páncreas [284], el carcinoma hepatocelular [285], cáncer colorrectal [286],

cáncer de próstata [287] o cáncer de ovario [288]. De hecho, cabe destacar el rol fundamental de la vía TGF β en el mantenimiento, crecimiento, capacidad iniciadora de tumores y potencial metastásico de las CSCs del cáncer de páncreas [37]. Curiosamente, los resultados de la presente tesis revelaron que la formulación PRP promueve una alteración significativa de la expresión de varios genes estrechamente vinculados con esta ruta molecular. La interpretación de dichos cambios de expresión debe realizarse con cautela puesto que se ha documentado que la funcionalidad de la vía TGF β puede experimentar profundas transformaciones durante la cronología de progresión de la enfermedad, actuando como una vía supresora de tumores en las primeras etapas y convirtiéndose en una ruta oncogénica en las fases más avanzadas [137]. Concretamente, pueden destacarse varias anomalías que acontecen en dicha ruta de señalización, responsables de semejante alteración funcional, como es el caso de la pérdida de algunos de sus componentes tales como SMAD4 [289], TGF β R2 [290], TGF β R3 [291] o la isoforma RAC1b [292]. Por el contrario, la función de dicha vía molecular como promotora tumoral también se caracteriza por la sobreexpresión de TGF β 1 [292] y la hiperactivación (por fosforilación) de SMAD2/3 aún en ausencia de SMAD4 [293]. De forma similar, SMAD7 ha sido identificado como un inhibidor de la ruta TGF β en las primeras etapas del crecimiento neoplásico, pero como un potenciador de la capacidad invasiva de las células malignas en las fases más avanzadas [294]. De hecho, este mismo estudio muestra que una amplia variedad de tipos de cáncer exhiben una sobreexpresión de SMAD7, que se correlaciona positivamente con la agresividad del tumor. Llamativamente, nuestros resultados mostraron que el tratamiento de las CSCs pancreáticas con PRP desencadenó la regulación al alza de la expresión de SMAD4, TGF β 2, TGF β 3, de la isoforma RAC1b sobre RAC1, así como una atenuación de la expresión de TGF β 1, SMAD7 y de la fosforilación de SMAD2/3 (incluso bajo la estimulación directa con TGF β 1). De forma similar, el tratamiento con la formulación PRP también mostró una inhibición de la vía TGF β /MAPK no canónica (independiente de SMAD), atendiendo a la disminución de los niveles de fosforilación de p38, lo que se enmarca en congruencia con el resto de resultados obtenidos en virtud de la relación de dicha vía no canónica con la ruta ERK, el proceso EMT y la agresividad de las células

malignas [295]. Por otra parte, el incremento de la ratio RAC1b/RAC1 inducido por las (pro)enzimas pancreáticas adquiere una relevancia adicional al considerar que la isoforma RAC1b posee la capacidad de moderar la hiperactivación de la ruta TGF β , tanto su ramal canónico dependiente de SMAD [296] como su ramal no canónico independiente de SMAD y dependiente de p-38 [297], evitando con ello muchas de las repercusiones protumorales de esta vía molecular. De hecho, estudios previos han establecido la ratio RAC1b/RAC1 como un marcador modelo para distinguir entre células pancreáticas malignas con un fenotipo de clase mesenquimal y agresivo (ratio bajo) o uno más epitelial y menos invasivo (ratio alto) [298]. En este sentido, los autores de este mismo artículo apuntaron que la activación de la vía molecular TGF β /SMAD contribuye a la inhibición de la expresión de RAC1b, lo cual cuadra con nuestros resultados que muestran un bloqueo de dicha ruta molecular y un aumento de la ratio RAC1b/RAC1 por acción de PRP. Así pues, todos estos datos en su conjunto sugieren que el tratamiento con PRP tiene el potencial para modular profundamente el status de la vía TGF β en las CSCs pancreáticas, impidiendo su hiperactivación característica de múltiples neoplasias malignas, promoviendo su rol como ruta supresora de tumores más que como vía oncogénica y provocando la orientación de las CSCs hacia un fenotipo más epitelial (menos maligno). Apoyando esta idea, cabe enfatizar la subida de expresión del factor KLF17 tras la aplicación del tratamiento, dado que se ha revelado la capacidad de dicho factor molecular para modular la ruta TGF β /SMAD hacia un rol promotor de la diferenciación celular y no inductor de un fenotipo troncal ni del proceso EMT [299]. En la misma línea, la aplicación de PRP desencadena cambios de expresión en varios miRNAs que guardan relación con el status de la ruta TGF β y con la progresión tumoral. En particular, la bajada de expresión miR-21-5p tras el tratamiento se encuadra en consonancia con las propiedades antitumorales de PRP en virtud de su asociación con la progresión y la metástasis del PDAC [300]. De hecho, la bajada de miR-21 podría atribuirse, al menos parcialmente, con la inhibición de c-FOS y c-JUN puesto que el complejo proteico AP-1, expresado en gran cantidad en las CSCs, ha sido caracterizado por potenciar la expresión del referido miR-21 [301]. Además, la regulación a la baja de miR-21 tras la aplicación de PRP podría contribuir a la subida de expresión de SMAD4

abordada con anterioridad, puesto que se ha documentado que SMAD4 es uno de los genes diana inhibidos por miR-21 [302]. Por el contrario, la subida de expresión de miR-7 destaca por el papel de esta molécula como supresor tumoral en muchos tipos de tumores incluyendo al PDAC [303]. En particular, la subida de expresión de miR-7 podría relacionarse con la bajada de expresión de KLF4 (Figura 11D) inducida por PRP ya que se ha mostrado que dicho factor es una de las dianas moleculares cuya degradación es inducida por miR-7 que, con ello, podría promover una inhibición del fenotipo troncal en las CSCs [304].

En otro contexto, el tratamiento con PRP aumentó los niveles de expresión de mRNA de varios componentes importantes de la ruta molecular Hippo, incluyendo las quinasas MST1/2 y LATS1/2 o la proteína de andamiaje SAV1 [305]. Mas aún, los resultados revelaron un aumento de la fosforilación y localización principalmente citoplásmica del factor de transcripción YAP clave de esta ruta molecular, lo que refleja una inhibición de la actividad transcripcional de la vía Hippo/YAP puesto que tal fosforilación (promovida por el complejo quinasa LATS1/2) desencadena la localización citoplásmica de YAP e impide su entrada al núcleo y la activación transcripcional de sus genes diana [306]. Este hecho parece avalar el potencial de PRP como agente antitumoral puesto que la activación y localización nuclear de YAP ha sido descrita como un marcador de activación de la vía oncogénica HIPPO relacionada con la metástasis y el mal pronóstico de pacientes con PDAC [307]. Por otra parte, merece especial atención la gran cantidad de expresión de E-Cadherina en las CSCs control sin tratar, dado que esto podría resultar un tanto contradictorio atendiendo al fenotipo poco diferenciado atribuido a las CSCs. No obstante, este evento se encuentra acorde con otros estudios previos que determinaron que la línea celular BxPC-3 se caracteriza por tener una considerable expresión basal de E-Cadherina. Este fenómeno se explica por el desarrollo de un proceso EMT parcial que conduce a un fenotipo epitelial/mesenquimal híbrido [308]. Además, la aplicación de PRP parece conducir a una aparente disminución de la expresión proteica global de la E-Cadherina que parece concentrar su localización en la membrana plasmática celular. A priori, la reducción de la cantidad proteica global de E-Cadherina podría parecer contradictoria con su aumento de expresión a nivel

transcripcional (referido previamente). Sin embargo, se debería tener en cuenta que la formulación PRP tiende a destruir y disgregar las estructuras esféricas formadas por las CSCs por lo que la cantidad celular en cada aglomeración sería significativamente menor que en los controles y ello podría explicar los niveles menores de fluorescencia. Además, cabe valorar la localización subcelular de dicha proteína tanto o más que sus meros niveles de expresión. Llamativamente, se ha indicado que el proceso EMT perpetrado por las células tumorales se caracteriza no sólo por una bajada de expresión de la E-Cadherina, sino por una pérdida de su localización en la membrana plasmática y un aumento de su localización nuclear que se asocia con la pérdida del fenotipo epitelial [309]. Reforzando la trascendencia de tal perspectiva, se ha indicado que la localización subcelular de la E-Cadherina desempeña precisamente un papel regulador importante en la línea BxPC-3 entorno al proceso EMT [308]. Por lo tanto, podría hipotetizarse que la formulación PRP promueve la acción de la E-Cadherina no como un factor de transcripción nuclear, sino como una molécula de adhesión celular. En efecto, su interacción física con la β -catenina situada principalmente en la membrana plasmática tras la aplicación de PRP, podría vincularse con la inducción de la fosforilación de YAP [310]. Teniendo en cuenta que la ruta Hippo de mecano-transducción está estrechamente implicada en la homeostasis/crecimiento celular en base a las condiciones extracelulares (características de la matriz extracelular, grado de adhesión intercelular, tipo de señales mecánicas de tensión/presión...) [311], los resultados sugieren que PRP podría modular el comportamiento de las CSCs tratadas para que se coordinaran mejor con la homeostasis existente en el tejido sano con el objetivo de paliar la proliferación y el crecimiento tumoral descontrolado.

Bajo la perspectiva de las interrelaciones entre vías moleculares, el aumento de la fosforilación de YAP también podría atribuirse a la reducción de la fosforilación/activación de las vías de p38, JNK y ERK promovida por PRP. Congruentemente, se ha revelado que la activación de estas vías moleculares puede ser responsable del fomento de la actividad transcripcional de YAP al bloquear su fosforilación y retención en el citoplasma [312][313]. Por otra parte, YAP fosforilado tiene la habilidad de promover la fosforilación de la β -Catenina y su consiguiente

retención y posterior degradación en el citoplasma por lo que, en última instancia, contribuye a la inhibición de la ruta oncogénica WNT impidiendo que la β -Catenina pueda actuar como un factor de transcripción [314]. Remarcablemente, estos datos encajan muy bien con nuestros resultados relativos a la detección de la β -Catenina por inmunofluorescencia, cuya relevancia se ve acentuada dada la implicación de la ruta WNT/ β -Catenina en la inducción del proceso EMT y la agresividad del PDAC en concreto [315]. Estos indicios sugieren una inhibición de la vía WNT/ β -Catenina en las CSCs tratadas, suposición que se encuentra fortalecida por la regulación a la baja de ciertos ligandos iniciadores de esta ruta molecular, tales como WNT1 o WNT11, y por el aumento de expresión de genes supresores como SOX10 [316] o SIRT1 [271], desencadenada por el tratamiento con PRP. Así pues, los datos obtenidos parecen indicar que la base molecular responsable de, al menos buena parte, los efectos antitumorales derivados de la formulación PRP podría ser la profunda modulación de la vía TGF β que desencadenaría las alteraciones en la ruta Hippo y WNT/ β -Catenina. Además, la aparente inhibición de la ruta molecular Notch, junto con la bajada de expresión de sus componentes clave Notch1 y JAG1, podría ser atribuida también al bloqueo de las vías TGF β /SMAD [317] e Hippo/YAP [318][319].

A continuación, se realizó el estudio con ratones utilizando xenoinjertos tumorales para analizar los efectos de PRP in vivo. En primer lugar, las CSCs pretratadas con PRP exhibieron una menor capacidad para iniciar el crecimiento tumoral en los ratones. Este evento es especialmente relevante ya que la alta capacidad iniciadora de tumores de Novo es una propiedad básica y exclusiva de la población de CSCs y no de otras subpoblaciones de células malignas con fenotipo más diferenciado [320]. De hecho, este fenómeno también podría entenderse como una reducción de la capacidad metastásica de las CSCs pretratadas puesto que la capacidad iniciadora de tumores es igualmente necesaria para promover el crecimiento tumoral en un tejido distinto a donde se origina el cáncer primario. Resulta tentador hipotetizar que tal circunstancia podría deberse no sólo a una reducción de la agresividad de las propias CSCs, sino también a una disminución de la habilidad de las CSCs para generar el nicho adecuado para el desarrollo tumoral, por ejemplo, mediante la alteración de su potencial secretor de

factores de crecimiento y/o angiogénicos. En efecto, la propiedad anti-angiogénica de PRP ha sido demostrada en estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo [234]. Asimismo, los amplios cambios desencadenados por las (pro)enzimas pancreáticas en la expresión de citoquinas también se encuentran en consonancia con una posible alteración de la comunicación entre las células malignas y las células del estroma sano. En particular, la bajada de expresión de IL-8 observada *in vitro* podría tener importantes implicaciones en este contexto dada la relación entre la alta secreción de esta citoquina inflamatoria en el PDAC y la generación de un TME inhibitor de la respuesta inmune antitumoral [321]. Por otra parte, la drástica disminución de la expresión de SPP1 resulta relevante en este ámbito puesto que se ha determinado que la alta secreción de esta citoquina se encuentra relacionada con la promoción de la angiogénesis y el nicho inflamatorio característico de los tumores sólidos [322][323]. En la misma línea, se ha descrito que la terapia con enzimas pancreáticas posee un potencial inmunomodulador y antiinflamatorio [233]. Además, los tumores que sí se desarrollaron en este grupo de pretratamiento experimentaron una reducción de su crecimiento respecto al grupo control sin tratar, lo que sugiere una extrapolación al nivel *in vivo* de los efectos antitumorales apreciados previamente *in vitro* (efecto directo de PRP sobre las CSCs). Congruentemente, se comprobó que el tratamiento continuado con PRP de los ratones que desarrollaron crecimiento tumoral (grupo de pretratamiento + tratamiento) derivó en una merma aún más significativa del tamaño de los tumores en comparación con el grupo control y el grupo de pretratamiento. Por otra parte, el análisis histológico de los tumores expuestos a PRP reveló una reducción significativa del estroma fibrótico asociado al tumor, lo que es de especial trascendencia teniendo en cuenta que el PDAC se caracteriza precisamente por exhibir un tejido estromal circundante altamente fibrótico que promueve la progresión de la patología y la aparición de metástasis [324]. Este fenómeno podría explicarse debido a la modulación de la ruta TGF β propiciada por PRP, así como por una probable e importante reducción en la expresión del ligando TGF β 1 por parte de las CSCs también en el nivel *in vivo*, dado el rol crucial de dicho ligando en la corrupción y activación de los CAFs en el TME [325]. Tal suposición estaría apoyada por los hallazgos observados con anterioridad *in vitro* y por estudios previos que demostraron

que la administración oral de enzimas pancreáticas a pacientes conduce a una disminución de la concentración de TGF β 1 en sangre [326]. Otra posible circunstancia que podría contribuir a este evento sería la actuación de PRP sobre las propias células del TME, destacándose los CAFs, promoviéndoles la adquisición de un fenotipo menos fibrótico/protumoral. De hecho, la posibilidad de que PRP tenga la habilidad de alterar (directa y/o indirectamente) el fenotipo de los CAFs y, en tal caso, la naturaleza de tales alteraciones está siendo actualmente analizado en nuestro laboratorio. En cualquier caso, parece claro que PRP induce cambios en el TME circundante al tumor, lo que cobra mayor relevancia teniendo en cuenta el rol del TME en la generación/mantenimiento de la población de CSCs en una masa tumoral sólida (referido con anterioridad en la explicación del modelo Dinámico de progresión tumoral). Tal suposición, junto con un efecto directo de PRP sobre las propias CSCs, podría explicar la reducción de expresión del marcador de CSCs CD44 detectada en los ensayos in vivo, Este fenómeno se encuentra en concordancia con la línea de observaciones presentadas hasta el momento y merece ser resaltado dada su vinculación con la reducción de la proliferación, capacidad invasiva y resistencia a la gemcitabina de las células malignas de cáncer de páncreas [327] [328].

Todos estos resultados se encuentran recogidos en un estudio publicado por nuestro grupo [236] en el que, a modo de resumen, el potencial antitumoral de la formulación PRP ejercido directamente sobre las CSCs pancreáticas tanto in vitro como in vivo podría atribuirse, al menos en parte, a la alteración de la ruta molecular TGF β . Los cambios en las CSCs pancreáticas inducidos por PRP parecen fomentar la actuación de dicha ruta molecular como una vía antitumoral más que como una vía protumoral, desencadenando la inhibición de rutas oncogénicas comúnmente potenciadas en las CSCs tales como Hippo/YAP, WNT/ β -Catenina y la vía Notch. Tales hallazgos resultan de especial trascendencia teniendo en cuenta que la inhibición/modulación farmacológica de las rutas de señalización TGF β /SMAD, WNT/ β -catenina, Notch [329] o Hippo/YAP [330] ha sido abordado como estrategia terapéutica para eliminar la subpoblación de CSCs y así combatir el cáncer. No obstante, cabe mencionar que la erradicación drástica de las CSCs solamente constituiría una solución temporal ya que

nuevas células sin fenotipo troncal de la masa cancerosa quedarían expuestas en los bordes de la misma a las señales moleculares procedentes del TME circundante. Por ende, dichas células malignas adquirirían un fenotipo troncal y formarían una nueva subpoblación de CSCs (de acuerdo al modelo Dinámico). Como alternativa, el tratamiento con PRP no mata de forma drástica la población de CSCs, sino que la modula y la hace menos agresiva (evitando con ello la erradicación de una subpoblación de CSCs dada que desencadene la aparición de otra nueva). Tomando en consideración los resultados descritos en el presente trabajo junto con el modelo alternativo de progresión tumoral presentado previamente, se podría afirmar que la formulación PRP revierte, al menos parcialmente, el fenotipo troncal de las CSCs hasta una etapa anterior en la cronología de evolución/progresión de las células malignas (etapa no troncal, con una menor agresividad). Esta suposición no sólo se ve apoyada por todos los resultados expuestos, sino por el potencial antiinflamatorio de las (pro)enzimas pancreáticas documentado en estudios previos [233]. Tal propiedad atribuible al compuesto PRP otorga fundamento a la mencionada suposición puesto que la inflamación crónica vinculada a la enfermedad del cáncer es uno de los ejes centrales que desencadenan la progresión de la patología atendiendo al referido modelo alternativo de progresión tumoral. En este contexto, sería interesante diseñar nuevos estudios para valorar el posible efecto del compuesto PRP en la expresión y actividad de las deaminasas, destacando las de la familia ADAR, en virtud de su relación con la evolución de las células malignas no troncales hasta CSCs. De forma similar, podrían llevarse a cabo otras investigaciones para verificar si el tratamiento con PRP tiene la capacidad de alterar la comunicación bidireccional entre las células tumorales y las células del estroma circundante, incluyendo el fenotipo de los CAFs o los TAMs (concretamente el fenotipo de tipo regenerativo estrechamente vinculado con la aparición/actividad de las CSCs). Por último, también sería interesante analizar si el compuesto terapéutico PRP posee la capacidad de alterar otras propiedades características del cáncer y las CSCs como es el caso de su habilidad para adquirir un fenotipo quimiorresistente.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

1. The crosstalk between chronic inflammation, deaminases deregulation, intra-tumour genetic heterogeneity and cancer phenotypic plasticity is integrated in a new tumour progression model. This model unifies previously accepted cancer models and may help to develop more effective therapeutic approaches.
2. The molecular signature and distribution of stromal cells within the tumour microenvironment are a reflection of the different stages of tumour development. Cancer-associated fibroblasts promote stemness between tumour cells. Thus, therapeutic strategies targeting the tumour microenvironment are as important as directly targeting the cancer stem cells subpopulations and tumour spread.
3. PRP treatment has a significant impact on the cancer stem cells subpopulation by the downregulation of genes and miRNAs related to stemness. Cancer stem cells treated with PRP lose their tumour-initiating potential and are more susceptible to conventional therapies.
4. The PRP formulation is not a cytotoxic agent. Instead, PRP induces profound transcriptional changes in treated cells, for instance the downregulation of genes related to the EMT process and metastasis or the upregulation of important tumour-suppressor factors.
5. The PRP formulation modulates relevant cancer stem cells-related molecular pathways such as TGF β /SMAD, WNT/ β -Catenin, MAPK, Hippo/YAP and Notch.
6. PRP inhibits tumour initiation and growth in nude mice. Further, PRP formulation *in vivo* affects the tumour microenvironment by reducing its fibrotic nature. This effect could be linked to the ability of PRP treatment

to impair the communication between cancerous cells and the surrounding stroma through the alteration of the expression of a wide variety of cytokines.

7. The PRP formulation has a great potential to be translated to the clinical arena, being suitable to be used as a more personalized therapy directed against cancer stem cells and the tumour microenvironment in order to avoid cancer recurrence and metastasis.

CONCLUSIONES

1. La interacción entre la inflamación crónica, la disregulación de deaminasas, la heterogeneidad genética intra-tumoral y la plasticidad fenotípica del cáncer son integrados en un nuevo modelo de progresión tumoral. Este modelo unifica modelos de cáncer previamente aceptados y puede ayudar a desarrollar enfoques terapéuticos más efectivos.
2. La distribución y firma molecular de las células del estroma dentro del microambiente tumoral es un reflejo de las diferentes etapas del desarrollo del tumor. Los fibroblastos asociados con el cáncer promueven la stemnes entre las células tumorales. Por lo tanto, las estrategias terapéuticas dirigidas a la TME son tan importantes como las dirigidas directamente a las subpoblaciones de células madre cancerígenas.
3. El tratamiento con PRP tiene un impacto significativo en la subpoblación de CSC mediante la regulación a la baja de genes y miARN relacionados con el fenotipo stem. Por lo tanto, después del tratamiento, las CSC pierden su potencial iniciador de tumores y son más susceptibles a las terapias convencionales.
4. La formulación de PRP no es un agente citotóxico. En cambio, el PRP induce cambios transcripcionales profundos en las células tratadas, por ejemplo, la regulación a la baja de genes relacionados con el proceso EMT, la metástasis y la regulación al alza de importantes factores supresores de tumores.
5. La formulación de PRP modula vías moleculares relevantes relacionadas con CSC, como TGF β /SMAD, WNT/ β -catenina, MAPK, Hippo/YAP y Notch.
6. PRP inhibe la iniciación y el crecimiento de tumores en ratones desnudos. Además, la formulación de PRP in vivo afecta al TME al reducir su

naturaleza fibrótica. Este efecto podría estar relacionado con la capacidad del tratamiento con PRP para alterar la comunicación entre las células cancerosas y el estroma circundante a través de la alteración en la expresión de una amplia variedad de citoquinas.

7. La formulación de PRP tiene un gran potencial para ser trasladada al ámbito clínico, siendo adecuada para ser utilizada como una terapia más personalizada dirigida contra las células madre cancerígenas y el microambiente tumoral para evitar la recurrencia del cáncer y la metástasis.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] “World Health Organization: Cancer Statistics,” *Último acceso en 01 marzo 2023*, 2023. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed Mar. 01, 2023).
- [2] G. Ouyang *et al.*, “The global, regional, and national burden of gallbladder and biliary tract cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990 to 2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017,” *Cancer*, vol. 127, no. 13, pp. 2238–2250, 2021, doi: 10.1002/cncr.33476.
- [3] K. A. Cronin *et al.*, “Annual report to the nation on the status of cancer, part 1: National cancer statistics,” *Cancer*, no. June, pp. 4251–4284, 2022, doi: 10.1002/cncr.34479.
- [4] L. Rahib, B. D. Smith, R. Aizenberg, A. B. Rosenzweig, J. M. Fleshman, and L. M. Matrisian, “Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states,” *Cancer Res.*, vol. 74, no. 11, pp. 2913–2921, 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0155.
- [5] A. Hernández Martínez, R. Madurga, N. García-Romero, and Á. Ayuso-Sacido, “Unravelling glioblastoma heterogeneity by means of single-cell RNA sequencing,” *Cancer Lett.*, vol. 527, pp. 66–79, 2022, doi: 10.1016/j.canlet.2021.12.008.
- [6] G. Rindi *et al.*, *Overview of the 2022 WHO Classification of Neuroendocrine Neoplasms*, vol. 33, no. 1. Springer US, 2022.
- [7] P. Neuperger *et al.*, “Analysis of the single-cell heterogeneity of adenocarcinoma cell lines and the investigation of intratumor heterogeneity reveals the expression of transmembrane protein 45a (Tmem45a) in lung adenocarcinoma cancer patients,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 1, 2022, doi: 10.3390/cancers14010144.
- [8] T. Sun *et al.*, “Dualistic classification of high grade serous ovarian carcinoma has its root in spatial heterogeneity,” *J. Adv. Res.*, no. xxxx, 2022, doi: 10.1016/j.jare.2022.08.014.
- [9] J. Kaur *et al.*, “Distinct Gene Expression Profiles of Matched Primary and Metastatic Triple-Negative Breast Cancers,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 10, pp. 1–12, 2022, doi: 10.3390/cancers14102447.
- [10] D. S. Micalizzi *et al.*, “Targeting breast and pancreatic cancer metastasis using a dual-cadherin antibody,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 119, no. 43, pp. 1–10, 2022, doi: 10.1073/pnas.2209563119.
- [11] Y. Qiu *et al.*, “Intratumor heterogeneity of driver mutations and TMB distribution in 30 early-stage LUAD patients with multiple lesions,” *Front. Oncol.*, vol. 12, no. August, pp. 1–7, 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.952572.
- [12] P. H. Acosta *et al.*, “Intratumor Resolution of Driver Gene Mutation Heterogeneity in Renal Cancer Using Deep Learning,” *Cancer Res.*, vol. 82, no. 15, pp. 2792–2806, 2022, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-2318.
- [13] I. Varela, P. Menéndez, and A. Sanjuan-Pla, “Intratumor heterogeneity and clonal evolution in blood malignancies and solid tumors,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 39, pp. 66742–66746, Sep. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.20279.
- [14] G. Li *et al.*, “Evolution under Spatially Heterogeneous Selection in Solid Tumors,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 39, no. 1, pp. 1–15, 2022, doi: 10.1093/molbev/msab335.
- [15] C. F. Ruivo *et al.*, “Extracellular Vesicles from Pancreatic Cancer Stem Cells Lead an Intratumor Communication Network (EVNet) to fuel tumour progression,” *Gut*, vol. 71,

- no. 10, pp. 2043–2068, 2022, doi: 10.1136/gutjnl-2021-324994.
- [16] Y. Li *et al.*, “LncRNA SNHG5 promotes the proliferation and cancer stem cell-like properties of HCC by regulating UPF1 and Wnt-signaling pathway,” *Cancer Gene Ther.*, vol. 29, no. 10, pp. 1373–1383, 2022, doi: 10.1038/s41417-022-00456-3.
- [17] X. Li *et al.*, “Melanoma stem cells promote metastasis via exosomal miR-1268a inactivation of autophagy,” *Biol. Res.*, vol. 55, no. 1, pp. 1–16, 2022, doi: 10.1186/s40659-022-00397-z.
- [18] H. Jiang *et al.*, “Revealing the transcriptional heterogeneity of organ-specific metastasis in human gastric cancer using single-cell RNA Sequencing,” *Clin. Transl. Med.*, vol. 12, no. 2, 2022, doi: 10.1002/ctm2.730.
- [19] G. M. De Mendonça Fernandes *et al.*, “Treatment effects of the EGFR pathway drugs on head and neck cancer stem cells,” *Am J Cancer Res.*, vol. 12, no. 9, pp. 4196–4210, 2022, [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36225637/>.
- [20] N. A. Fonseca, A. F. Cruz, V. Moura, S. Simões, and J. N. Moreira, “The cancer stem cell phenotype as a determinant factor of the heterotypic nature of breast tumors,” *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 113, pp. 111–121, May 2017, doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.03.016.
- [21] O. L. Walker, M. L. Dahn, M. R. Power Coombs, and P. Marcato, “The Prostaglandin E2 Pathway and Breast Cancer Stem Cells: Evidence of Increased Signaling and Potential Targeting,” *Front. Oncol.*, vol. 11, no. January, pp. 1–10, 2022, doi: 10.3389/fonc.2021.791696.
- [22] C. Yang *et al.*, “Slow-Cycling Cells in Glioblastoma: A Specific Population in the Cellular Mosaic of Cancer Stem Cells,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 5, pp. 1–18, 2022, doi: 10.3390/cancers14051126.
- [23] G. J. Yoshida, “The heterogeneity of cancer stem-like cells at the invasive front,” *Cancer Cell Int.*, vol. 17, no. 1, p. 23, Dec. 2017, doi: 10.1186/s12935-017-0393-y.
- [24] A. D. C. PAULA and C. LOPES, “Implications of Different Cancer Stem Cell Phenotypes in Breast Cancer,” *Anticancer Res.*, vol. 37, no. 5, pp. 2173–2183, 2017, doi: 10.21873/anticancer.11552.
- [25] S. M. Nalluri, C. Sankhe, J. N. O’Connor, Joseph W. Blanchard, Paul L. Khouri, S. H. Phan, G. Virgi, and E. W. Gomez, “Crosstalk between ERK and MRTF-A signaling regulates TGFβ1-induced epithelial-mesenchymal transition,” *J Cell Physiol*, vol. 237, no. 5, pp. 2503–2515, 2022, doi: 10.1002/jcp.30705.
- [26] Y. C. Tiu *et al.*, “GLIPR1 promotes proliferation, metastasis and 5-fluorouracil resistance in hepatocellular carcinoma by activating the PI3K/PDK1/ROCK1 pathway,” *Cancer Gene Ther*, vol. 29, no. 11, pp. 1720–1730, 2022, doi: 10.1038/s41417-022-00490-1.
- [27] A. Tiwari, S. Swamynathan, V. Jhanji, and S. K. Swamynathan, “KLF4 coordinates corneal epithelial apical-basal polarity and plane of cell division and is downregulated in ocular surface squamous neoplasia,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 61, no. 5, 2020, doi: 10.1167/IOVS.61.5.15.
- [28] Y. Qi *et al.*, “SYT-SSX1 enhances the invasiveness and maintains stem-like cell properties in synovial sarcoma via induction of TGF-β1/Smad signaling,” *BMC Cancer*, vol. 22, no. 1, pp. 1–15, 2022, doi: 10.1186/s12885-022-09229-5.
- [29] M. H. Yang *et al.*, “Procaine Abrogates the Epithelial-Mesenchymal Transition Process through Modulating c-Met Phosphorylation in Hepatocellular Carcinoma,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 20, 2022, doi: 10.3390/cancers14204978.
- [30] A. J. Haas *et al.*, “ZO-1 Guides Tight Junction Assembly and Epithelial Morphogenesis via Cytoskeletal Tension-Dependent and -Independent Functions,” *Cells*, vol. 11, no. 23, p. 3775, 2022, doi: 10.3390/cells11233775.

- [31] C. H. Wong *et al.*, “CircRTN4 promotes pancreatic cancer progression through a novel CircRNA-miRNA-lncRNA pathway and stabilizing epithelial-mesenchymal transition protein,” *Mol. Cancer*, vol. 21, no. 1, pp. 1–15, 2022, doi: 10.1186/s12943-021-01481-w.
- [32] B. Buyuk, S. Jin, and K. Ye, “Epithelial-to-Mesenchymal Transition Signaling Pathways Responsible for Breast Cancer Metastasis,” *Cell. Mol. Bioeng.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–13, 2022, doi: 10.1007/s12195-021-00694-9.
- [33] C. E. Aban *et al.*, “Downregulation of E-cadherin in pluripotent stem cells triggers partial EMT,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-81735-1.
- [34] A. Basu *et al.*, “Statistical parametrization of cell cytoskeleton reveals lung cancer cytoskeletal phenotype with partial EMT signature,” *Commun. Biol.*, vol. 5, no. 1, 2022, doi: 10.1038/s42003-022-03358-0.
- [35] Y. Ohta *et al.*, *Cell–matrix interface regulates dormancy in human colon cancer stem cells*, vol. 608, no. 7924. Springer US, 2022.
- [36] J. Horak *et al.*, “MiR-140 leads to MRE11 downregulation and ameliorates oxaliplatin treatment and therapy response in colorectal cancer patients,” *Front. Oncol.*, vol. 12, no. October, pp. 1–11, 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.959407.
- [37] D. D. Cave *et al.*, “LAMC2 marks a tumor-initiating cell population with an aggressive signature in pancreatic cancer,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 41, no. 1, pp. 1–20, 2022, doi: 10.1186/s13046-022-02516-w.
- [38] D. G. Tang, “Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity,” *Cell Res.*, vol. 22, no. 3, pp. 457–72, Mar. 2012, doi: 10.1038/cr.2012.13.
- [39] T. Colangelo *et al.*, “Loss of circadian gene Timeless induces EMT and tumor progression in colorectal cancer via Zeb1-dependent mechanism,” *Cell Death Differ.*, vol. 29, no. 8, pp. 1552–1568, 2022, doi: 10.1038/s41418-022-00935-y.
- [40] C. H. Tung *et al.*, “ α -Catulin promotes cancer stemness by antagonizing WWP1-mediated KLF5 degradation in lung cancer,” *Theranostics*, vol. 12, no. 3, pp. 1173–1186, 2022, doi: 10.7150/thno.63627.
- [41] L. Vermeulen, F. de Sousa e Melo, D. J. Richel, and J. P. Medema, “The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities,” *Lancet Oncol.*, vol. 13, no. 2, pp. e83–e89, Feb. 2012, doi: 10.1016/S1470-2045(11)70257-1.
- [42] P. Hernández-Camarero, G. Jiménez, E. López-Ruiz, S. Barungi, J. A. Marchal, and M. Perán, “Revisiting the dynamic cancer stem cell model: Importance of tumour edges,” *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 131, pp. 35–45, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.critrevonc.2018.08.004.
- [43] Y. Li *et al.*, “Lymphatic Drainage System and Lymphatic Metastasis of Cancer Cells in the Mouse Esophagus,” *Dig. Dis. Sci.*, 2022, doi: 10.1007/s10620-022-07586-6.
- [44] S. Jiang *et al.*, “Low-dose Apatinib promotes vascular normalization and hypoxia reduction and sensitizes radiotherapy in lung cancer,” *Cancer Med.*, no. May, pp. 1–12, 2022, doi: 10.1002/cam4.5113.
- [45] M. Gola, A. Sejda, J. Godlewski, M. Cieślak, and A. Starzyńska, “Neural Component of the Tumor Microenvironment in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 21, p. 5246, 2022, doi: 10.3390/cancers14215246.
- [46] R. Wu *et al.*, “Intratumoral PDGFB gene predominantly expressed in endothelial cells is associated with angiogenesis and lymphangiogenesis, but not with metastasis in breast cancer,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 195, no. 1, pp. 17–31, 2022, doi: 10.1007/s10549-022-06661-w.
- [47] C. Tian *et al.*, “Blockade of FGF2/FGFR2 partially overcomes bone marrow mesenchymal stromal cells mediated progression of T-cell acute lymphoblastic

- leukaemia,” *Cell Death Dis.*, vol. 13, no. 11, 2022, doi: 10.1038/s41419-022-05377-5.
- [48] P. Lefrançois *et al.*, “In silico analyses of the tumor microenvironment highlight tumoral inflammation, a Th2 cytokine shift and a mesenchymal stem cell-like phenotype in advanced basal cell carcinomas,” *J. Cell Commun. Signal.*, vol. 14, no. 2, pp. 245–254, 2020, doi: 10.1007/s12079-020-00563-6.
- [49] Z. Zhou *et al.*, “CAFs-derived MFAP5 promotes bladder cancer malignant behavior through NOTCH2/HEY1 signaling,” *FASEB J.*, Apr. 2020, doi: 10.1096/fj.201902659R.
- [50] M. S. Ball *et al.*, “CDDO-Me Alters the Tumor Microenvironment in Estrogen Receptor Negative Breast Cancer,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 6560, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-63482-x.
- [51] H. Zhang *et al.*, “CAF secreted miR-522 suppresses ferroptosis and promotes acquired chemo-resistance in gastric cancer,” *Mol. Cancer*, vol. 19, no. 1, p. 43, Dec. 2020, doi: 10.1186/s12943-020-01168-8.
- [52] I. I. Verginadis *et al.*, “A stromal Integrated Stress Response activates perivascular cancer-associated fibroblasts to drive angiogenesis and tumour progression,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 24, no. 6, pp. 940–953, 2022, doi: 10.1038/s41556-022-00918-8.
- [53] F. Shi *et al.*, “Tumor-associated macrophages in direct contact with prostate cancer cells promote malignant proliferation and metastasis through NOTCH1 pathway,” *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 18, no. 16, pp. 5994–6007, 2022, doi: 10.7150/ijbs.73141.
- [54] P. Gascard and T. D. Tlsty, “Carcinoma-associated fibroblasts: Orchestrating the composition of malignancy,” *Genes Dev.*, vol. 30, no. 9, pp. 1002–1019, 2016, doi: 10.1101/gad.279737.116.
- [55] W. Y. Huang *et al.*, “Cancer-Associated Fibroblasts Promote Tumor Aggressiveness in Head and Neck Cancer through Chemokine Ligand 11 and C-C Motif Chemokine Receptor 3 Signaling Circuit,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 13, 2022, doi: 10.3390/cancers14133141.
- [56] G. Zhang, X. Tao, B. Ji, and J. Gong, “Hypoxia-Driven M2-Polarized Macrophages Facilitate Cancer Aggressiveness and Temozolomide Resistance in Glioblastoma,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/1614336.
- [57] K. Chen, Y. Huang, and J. Chen, “Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges,” *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 34, no. 6, pp. 732–740, 2013, doi: 10.1038/aps.2013.27.
- [58] H. Dubois-Pot-Schneider *et al.*, “Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells,” *Hepatology*, vol. 60, no. 6, pp. 2077–2090, 2014, doi: 10.1002/hep.27353.
- [59] L. Wu *et al.*, “TGF- β 1-induced CK17 enhances cancer stem cell-like properties rather than EMT in promoting cervical cancer metastasis via the ERK1/2-MZF1 signaling pathway,” *FEBS J.*, Jul. 2017, doi: 10.1111/febs.14162.
- [60] H. Fujisaki and S. Futaki, “Epithelial–Mesenchymal Transition Induced in Cancer Cells by Adhesion to Type I Collagen,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 1, 2023, doi: 10.3390/ijms24010198.
- [61] F. Xie, X. Huang, C. He, R. Wang, and S. Li, “An Inflammatory Response-Related Gene Signature Reveals Distinct Survival Outcome and Tumor Microenvironment Characterization in Pancreatic Cancer,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 9, no. June, pp. 1–14, 2022, doi: 10.3389/fmolb.2022.876607.
- [62] J. Jin and G. Yu, “Hypoxic lung cancer cell-derived exosomal miR-21 mediates macrophage M2 polarization and promotes cancer cell proliferation through targeting IRF1,” *World J. Surg. Oncol.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–14, 2022, doi: 10.1186/s12957-022-02706-y.

- [63] A. Waltera *et al.*, “Opposing MMP-9 Expression in Mesenchymal Stromal Cells and Head and Neck Tumor Cells after Direct 2D and,” *Int J Mol Sci.*, vol. 24, no. 2, p. 1293, 2023, doi: 10.3390/ijms24021293.
- [64] L. I. Ruffolo *et al.*, “GM-CSF drives myelopoiesis, recruitment and polarisation of tumour-associated macrophages in cholangiocarcinoma and systemic blockade facilitates antitumour immunity,” *Gut*, vol. 71, no. 7, pp. 1386–1398, 2022, doi: 10.1136/gutjnl-2021-324109.
- [65] T. Alkasalias, L. Moyano-Galceran, M. Arsenian-Henriksson, and K. Lehti, “Fibroblasts in the tumor microenvironment: Shield or spear?,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 5, pp. 1–21, 2018, doi: 10.3390/ijms19051532.
- [66] A. Merlos-Suárez *et al.*, “The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse.,” *Cell Stem Cell*, vol. 8, no. 5, pp. 511–24, May 2011, doi: 10.1016/j.stem.2011.02.020.
- [67] P. Dalerba *et al.*, “Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors.,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 29, no. 12, pp. 1120–7, Nov. 2011, doi: 10.1038/nbt.2038.
- [68] J. J. Christiansen and A. K. Rajasekaran, “Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 17, pp. 8319–8326, 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0410.
- [69] H. Jiang *et al.*, “Transformation of epithelial ovarian cancer stemlike cells into mesenchymal lineage via EMT results in cellular heterogeneity and supports tumor engraftment.,” *Mol. Med.*, vol. 18, pp. 1197–208, Jan. 2012, doi: 10.2119/molmed.2012.00075.
- [70] W. D. Brandt *et al.*, “Urothelial carcinoma: Stem cells on the edge,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 28, no. 3–4, pp. 291–304, Dec. 2009, doi: 10.1007/s10555-009-9187-6.
- [71] Y. Nomura *et al.*, “De Novo Emergence of Mesenchymal Stem-Like CD105 + Cancer Cells by Cytotoxic Agents in Human Hepatocellular Carcinoma,” *Transl. Oncol.*, vol. 10, no. 2, pp. 184–189, 2017, doi: 10.1016/j.tranon.2017.01.005.
- [72] Y. Chonan, T. Yamashita, O. Sampetrean, H. Saya, and R. Sudo, “Spatial Heterogeneity of Invading Glioblastoma Cells Regulated by Paracrine Factors,” *Tissue Eng Part A*, vol. 28, no. 13–14, pp. 573–585, 2022, doi: 10.1089/ten.TEA.2021.0168.
- [73] F. Li *et al.*, “Targeting HECTD3- $IKK\alpha$ axis inhibits inflammation-related metastasis,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 7, no. 1, 2022, doi: 10.1038/s41392-022-01057-0.
- [74] F. Hartung, Y. Wang, B. Aronow, and G. F. Weber, “A core program of gene expression characterizes cancer metastases,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 60, pp. 102161–102175, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.22240.
- [75] X. Rao, L. Wan, Z. Jie, X. Zhu, J. Yin, and H. Cao, “Upregulated miR-27a-3p indicates a poor prognosis in pancreatic carcinoma patients and promotes the angiogenesis and migration by epigenetic silencing of GATA6 and activating VEGFA/VEGFR2 signaling pathway,” *Onco. Targets. Ther.*, vol. 12, pp. 11241–11254, 2019, doi: 10.2147/OTT.S220621.
- [76] M. L. De Angelis *et al.*, “An Orthotopic Patient-Derived Xenograft (PDX) Model Allows the Analysis of Metastasis-Associated Features in Colorectal Cancer,” *Front Oncol*, vol. 12, 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.869485.
- [77] J. P. Arnoletti *et al.*, “Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) circulating tumor cells influence myeloid cell differentiation to support their survival and immunoresistance in portal vein circulation,” *PLoS One*, vol. 17, no. 3 March, pp. 1–28, 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0265725.
- [78] J. Zarubova *et al.*, “Cell-Taxi: Mesenchymal Cells Carry and Transport Clusters of Cancer Cells,” *Small*, vol. 2203515, pp. 1–16, 2022, doi: 10.1002/sml.202203515.

- [79] Y. Fang *et al.*, “LAMC1-mediated preadipocytes differentiation promoted peritoneum pre-metastatic niche formation and gastric cancer metastasis,” *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 18, no. 7, pp. 3082–3101, 2022, doi: 10.7150/ijbs.70524.
- [80] Y. Qi, T. Zhao, R. Li, and M. Han, “Macrophage-Secreted S100A4 Supports Breast Cancer Metastasis by Remodeling the Extracellular Matrix in the Premetastatic Niche,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/9895504.
- [81] Y. Mo *et al.*, “Tumor-secreted exosomal miR-141 activates tumor-stroma interactions and controls premetastatic niche formation in ovarian cancer metastasis,” *Mol. Cancer*, vol. 22, no. 1, p. 4, 2023, doi: 10.1186/s12943-022-01703-9.
- [82] J. Zhao *et al.*, “Pirfenidone-loaded exosomes derived from pancreatic ductal adenocarcinoma cells alleviate fibrosis of premetastatic niches to inhibit liver metastasis,” *Biomater. Sci.*, vol. 10, no. 22, pp. 6614–6626, 2022, doi: 10.1039/d2bm00770c.
- [83] I. J. Fidler and G. L. Nicolson, “Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 57, no. 5, pp. 1199–202, Nov. 1976, Accessed: Jan. 16, 2018. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1003551>.
- [84] X. Q. Li, R. Zhang, H. Lu, X. M. Yue, and Y. F. Huang, “Extracellular Vesicle-Packaged CDH11 and ITGA5 Induce the Premetastatic Niche for Bone Colonization of Breast Cancer Cells,” *Cancer Res.*, vol. 82, no. 8, pp. 1560–1574, 2022, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-1331.
- [85] M. Wang *et al.*, “Tumor-derived exosomes drive pre-metastatic niche formation in lung via modulating CCL1+ fibroblast and CCR8+ Treg cell interactions,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 71, no. 11, pp. 2717–2730, 2022, doi: 10.1007/s00262-022-03196-3.
- [86] K. G. Nairon, T. J. DePalma, J. M. Zent, J. L. Leight, and A. Skardal, “Tumor cell-conditioned media drives collagen remodeling via fibroblast and pericyte activation in an in vitro premetastatic niche model,” *iScience*, vol. 25, no. 7, p. 104645, 2022, doi: 10.1016/j.isci.2022.104645.
- [87] H. Zeng *et al.*, “Cancer-associated fibroblasts facilitate premetastatic niche formation through lncRNA SNHG5-mediated angiogenesis and vascular permeability in breast cancer,” *Theranostics*, vol. 12, no. 17, pp. 7351–7370, 2022, doi: 10.7150/thno.74753.
- [88] J. Kang *et al.*, “Tumor microenvironment mechanisms and bone metastatic disease progression of prostate cancer,” *Cancer Lett.*, vol. 530, no. January, pp. 156–169, 2022, doi: 10.1016/j.canlet.2022.01.015.
- [89] D. S. Houg and M. F. Bijlsma, “The hepatic pre-metastatic niche in pancreatic ductal adenocarcinoma,” *Mol. Cancer*, vol. 17, no. 1, pp. 1–18, 2018, doi: 10.1186/s12943-018-0842-9.
- [90] P. Heneberg, “Paracrine tumor signaling induces transdifferentiation of surrounding fibroblasts,” *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 97, pp. 303–11, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.09.008.
- [91] O. De Wever, M. Van Bockstal, M. Mareel, A. Hendrix, and M. Bracke, “Carcinoma-associated fibroblasts provide operational flexibility in metastasis,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 25, pp. 33–46, 2014, doi: 10.1016/j.semcancer.2013.12.009.
- [92] S. Walterskirchen, Natalie Müller, Catharina Ramos, Cristiano Zeindl, S. Stang, V. Herzog, Daniela Sachet, Monika Schimek, L. Unger, H. Gerakopoulos, Vasileios Hengstschläger, Markus Bachleitner-Hofmann, Thomas Michael Bergmann, Michael Dolznig, and R. Oehler, “Metastatic colorectal carcinoma-associated fibroblasts have immunosuppressive properties related to increased IGFBP2 expression,” *Cancer Lett.*, vol. 540, 2022, doi: 10.1016/j.canlet.2022.215737.
- [93] Z. Wang, H. Zhang, Y. Zhai, F. Li, X. Shi, and M. Ying, “Single-Cell Profiling Reveals

- Heterogeneity of Primary and Lymph Node Metastatic Tumors and Immune Cell Populations and Discovers Important Prognostic Significance of CCDC43 in Oral Squamous Cell Carcinoma,” *Front. Immunol.*, vol. 13, no. March, pp. 1–13, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.843322.
- [94] N. Ogba *et al.*, “Luminal breast cancer metastases and tumor arousal from dormancy are promoted by direct actions of estradiol and progesterone on the malignant cells.,” *Breast Cancer Res.*, vol. 16, no. 6, p. 489, Dec. 2014, doi: 10.1186/s13058-014-0489-4.
- [95] M. A. LaBarge, “The difficulty of targeting cancer stem cell niches.,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 16, no. 12, pp. 3121–9, Jun. 2010, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2933.
- [96] P. Karras *et al.*, “A cellular hierarchy in melanoma uncouples growth and metastasis.,” *Nature*, vol. 611, no. 7934, p. E4, 2022, doi: 10.1038/s41586-022-05415-4.
- [97] L. Zhu *et al.*, “Cancer-associated fibroblasts in papillary thyroid carcinoma,” *Clin Exp Med*, 2023, doi: 10.1007/s10238-023-00998-2.
- [98] R. C. Douado *et al.*, “Immunohistochemical Characterization of Cancer-associated Fibroblasts in oral Squamous Cell Carcinoma,” *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, vol. 26, no. 9, pp. 640–647, 2018, doi: 10.1097/PAI.0000000000000486.
- [99] T. Loeck and A. Schwab, “The role of the Na⁺/Ca²⁺-exchanger (NCX) in cancer-associated fibroblasts,” *Biol Chem*, 2023, doi: 10.1515/hsz-2022-0253.
- [100] X. Ning, H. Zhang, C. Wang, and X. Song, “Exosomes Released by Gastric Cancer Cells Induce Transition of Pericytes Into Cancer-Associated Fibroblasts.,” *Med. Sci. Monit.*, vol. 24, pp. 2350–2359, Apr. 2018, doi: 10.12659/msm.906641.
- [101] L. Borriello *et al.*, “Cancer-Associated Fibroblasts Share Characteristics and Protumorigenic Activity with Mesenchymal Stromal Cells,” *Cancer Res.*, vol. 77, no. 18, pp. 5142–5157, Sep. 2017, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2586.
- [102] M. Bartoschek *et al.*, “Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, p. 5150, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-07582-3.
- [103] R. E. Vickman *et al.*, “Heterogeneity of human prostate carcinoma-associated fibroblasts implicates a role for subpopulations in myeloid cell recruitment,” *Prostate*, vol. 80, no. 2, pp. 173–185, Feb. 2020, doi: 10.1002/pros.23929.
- [104] C. Neuzillet *et al.*, “Inter- and intra-tumoural heterogeneity in cancer-associated fibroblasts of human pancreatic ductal adenocarcinoma,” *J. Pathol.*, vol. 248, no. 1, pp. 51–65, May 2019, doi: 10.1002/path.5224.
- [105] Z. Peng, M. Ye, H. Ding, Z. Feng, and K. Hu, “Spatial transcriptomics atlas reveals the crosstalk between cancer-associated fibroblasts and tumor microenvironment components in colorectal cancer,” *J. Transl. Med.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–13, 2022, doi: 10.1186/s12967-022-03510-8.
- [106] D. Kim *et al.*, “Identification and Characterization of Cancer-Associated Fibroblast Subpopulations in Lung Adenocarcinoma,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 14, pp. 1–17, 2022, doi: 10.3390/cancers14143486.
- [107] C. Neuzillet *et al.*, “Periostin- and podoplanin-positive cancer-associated fibroblast subtypes cooperate to shape the inflamed tumor microenvironment in aggressive pancreatic adenocarcinoma,” *J. Pathol.*, vol. 258, no. 4, pp. 408–425, 2022, doi: 10.1002/path.6011.
- [108] C. Li *et al.*, “Single-cell transcriptomics reveals cellular heterogeneity and molecular stratification of cervical cancer,” *Commun. Biol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–10, 2022, doi: 10.1038/s42003-022-04142-w.
- [109] G. Biffi *et al.*, “IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGFβ to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.,” *Cancer Discov.*, vol. 9, no. 2, pp. 282–301, 2019, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0710.

- [110] F. Pelon *et al.*, “Cancer-associated fibroblast heterogeneity in axillary lymph nodes drives metastases in breast cancer through complementary mechanisms,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41467-019-14134-w.
- [111] A. Morén *et al.*, “LXR α limits TGF β -dependent hepatocellular carcinoma associated fibroblast differentiation,” 2019.
- [112] A. M. Siedlar *et al.*, “NADPH oxidase 4 is dispensable for skin myofibroblast differentiation and wound healing,” *Redox Biol.*, vol. 60, no. November 2022, 2023, doi: 10.1016/j.redox.2023.102609.
- [113] J. Datta *et al.*, “Combined MEK and STAT3 Inhibition Uncovers Stromal Plasticity by Enriching for Cancer-Associated Fibroblasts With Mesenchymal Stem Cell-Like Features to Overcome Immunotherapy Resistance in Pancreatic Cancer,” *Gastroenterology*, vol. 163, no. 6, pp. 1593–1612, 2022, doi: 10.1053/j.gastro.2022.07.076.
- [114] C. Hutton *et al.*, “Single-cell analysis defines a pancreatic fibroblast lineage that supports anti-tumor immunity,” *Cancer Cell*, vol. 39, no. 9, pp. 1227-1244.e20, 2021, doi: 10.1016/j.ccell.2021.06.017.
- [115] A. Frafjord *et al.*, “Antibody combinations for optimized staining of macrophages in human lung tumors,” *Scand. J. Immunol.*, Apr. 2020, doi: 10.1111/sji.12889.
- [116] A.-M. Georgoudaki *et al.*, “Reprogramming Tumor-Associated Macrophages by Antibody Targeting Inhibits Cancer Progression and Metastasis,” *Cell Rep.*, vol. 15, no. 9, pp. 2000–11, 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.084.
- [117] V. Haage *et al.*, “Comprehensive gene expression meta-analysis identifies signature genes that distinguish microglia from peripheral monocytes/macrophages in health and glioma,” *Acta Neuropathol. Commun.*, vol. 7, no. 1, p. 20, 2019, doi: 10.1186/s40478-019-0665-y.
- [118] S. P. Arlauckas *et al.*, “Arg1 expression defines immunosuppressive subsets of tumor-associated macrophages,” *Theranostics*, vol. 8, no. 21, pp. 5842–5854, 2018, doi: 10.7150/thno.26888.
- [119] R. Zilionis *et al.*, “Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species,” *Immunity*, vol. 50, no. 5, pp. 1317-1334.e10, 2019, doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.009.
- [120] C. Xu *et al.*, “Origin, activation, and targeted therapy of glioma-associated macrophages,” *Front. Immunol.*, vol. 13, no. October, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.974996.
- [121] R. Novaes, T. F. R. Costa, A. L. Goundry, F. C. G. Verçoza, Brunno R F Rodrigues, Juliany C F Godinho, Joseane Lima Reis, A. Morrot, and A. P. C. A. Lima, “Bone marrow granulocytes downregulate IL-1 β and TNF production and the microbicidal activity of inflammatory macrophages,” *Biochem Cell Biol*, vol. 100, no. 3, pp. 246–265, 2022, doi: 10.1139/bcb-2021-0460.
- [122] A. Vidyarthi *et al.*, “TLR-3 stimulation skews M2 macrophages to M1 through IFN- α signaling and restricts tumor progression,” *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. JUL. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01650.
- [123] K. Sawa-Wejksza, A. Dudek, M. Lemieszek, K. Kaławaj, and M. Kandefer-Szerszeń, “Colon cancer-derived conditioned medium induces differentiation of THP-1 monocytes into a mixed population of M1/M2 cells,” *Tumour Biol.*, vol. 40, no. 9, p. 1010428318797880, Sep. 2018, doi: 10.1177/1010428318797880.
- [124] G. T. Bardi, M. A. Smith, and J. L. Hood, “Melanoma exosomes promote mixed M1 and M2 macrophage polarization,” *Cytokine*, vol. 105, pp. 63–72, 2018, doi: 10.1016/j.cyto.2018.02.002.
- [125] P. S. Zeiner *et al.*, “Distribution and Prognostic Impact of Microglia/Macrophage

- Subpopulations in Gliomas,” *Brain Pathol.*, vol. 29, no. 4, 2019, doi: 10.1111/BPA.12690.
- [126] D. Öhlund *et al.*, “Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer,” *J. Exp. Med.*, vol. 214, no. 3, pp. 579–596, Mar. 2017, doi: 10.1084/jem.20162024.
- [127] M. Falleni *et al.*, “M1 and M2 macrophages’ clinicopathological significance in cutaneous melanoma,” *Melanoma Res.*, vol. 27, no. 3, pp. 200–210, 2017, doi: 10.1097/CMR.0000000000000352.
- [128] S. Darmanis *et al.*, “Single-Cell RNA-Seq Analysis of Infiltrating Neoplastic Cells at the Migrating Front of Human Glioblastoma,” *Cell Rep.*, vol. 21, no. 5, pp. 1399–1410, 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.030.
- [129] P. Hernández-camarero, E. López-ruiz, J. A. Marchal, and M. Perán, “Cancer : a mirrored room between tumor bulk and tumor microenvironment,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 40, no. 1, p. 217, 2021, doi: 10.1186/s13046-021-02022-5.
- [130] Y. Akatsu *et al.*, “Fibroblast growth factor signals regulate transforming growth factor- β -induced endothelial-to-myofibroblast transition of tumor endothelial cells via Elk1,” *Mol. Oncol.*, vol. 13, no. 8, pp. 1706–1724, 2019, doi: 10.1002/1878-0261.12504.
- [131] H. Denys *et al.*, “Differential impact of TGF- β and EGF on fibroblast differentiation and invasion reciprocally promotes colon cancer cell invasion,” *Cancer Lett.*, vol. 266, no. 2, pp. 263–274, 2008, doi: 10.1016/j.canlet.2008.02.068.
- [132] Y. Kojima *et al.*, “Autocrine TGF- β and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 46, pp. 20009–20014, 2010, doi: 10.1073/pnas.1013805107.
- [133] S. Kamali Zonouzi, P. S. Pezeshki, S. Razi, and N. Rezaei, “Cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer,” *Clin. Transl. Oncol.*, vol. 24, no. 5, pp. 757–769, 2022, doi: 10.1007/s12094-021-02734-2.
- [134] C. R. Goulet, G. Bernard, S. Tremblay, S. Chabaud, S. Bolduc, and F. Pouliot, “Exosomes induce fibroblast differentiation into cancer-associated fibroblasts through TGF β signaling,” *Mol. Cancer Res.*, vol. 16, no. 7, pp. 1196–1204, 2018, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0784.
- [135] K. Sasaki *et al.*, “Analysis of cancer-associated fibroblasts and the epithelial-mesenchymal transition in cutaneous basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and malignant melanoma,” *Hum. Pathol.*, vol. 79, pp. 1–8, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.humpath.2018.03.006.
- [136] L. González, N. Eiro, B. Fernandez-Garcia, L. O. González, F. Dominguez, and F. J. Vizoso, “Gene expression profile of normal and cancer-associated fibroblasts according to intratumoral inflammatory cells phenotype from breast cancer tissue,” *Mol. Carcinog.*, vol. 55, no. 11, pp. 1489–1502, 2016, doi: 10.1002/mc.22403.
- [137] M. Z. Gungor, M. Uysal, and S. Senturk, “The Bright and the Dark Side of TGF- β Signaling in Hepatocellular Carcinoma: Mechanisms, Dysregulation, and Therapeutic Implications,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 4, 2022, doi: 10.3390/cancers14040940.
- [138] A. K. Patel *et al.*, “A subtype of cancer-associated fibroblasts with lower expression of alpha-smooth muscle actin suppresses stemness through BMP4 in oral carcinoma,” *Oncogenesis*, vol. 7, no. 10, p. 78, Oct. 2018, doi: 10.1038/s41389-018-0087-x.
- [139] M. A. Kiskowski *et al.*, “Role for Stromal Heterogeneity in Prostate Tumorigenesis,” *Cancer Res.*, vol. 71, no. 10, pp. 3459–3470, May 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2999.
- [140] D. E. Costea *et al.*, “Identification of Two Distinct Carcinoma-Associated Fibroblast Subtypes with Differential Tumor-Promoting Abilities in Oral Squamous Cell

- Carcinoma,” *Cancer Res.*, vol. 73, no. 13, pp. 3888–3901, Jul. 2013, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4150.
- [141] Z. Ou *et al.*, “Single-Nucleus RNA Sequencing and Spatial Transcriptomics Reveal the Immunological Microenvironment of Cervical Squamous Cell Carcinoma,” *Adv. Sci.*, vol. 9, no. 29, pp. 1–20, 2022, doi: 10.1002/advs.202203040.
- [142] R. García-Rocha *et al.*, “Evidence that cervical cancer cells cultured as tumorspheres maintain high CD73 expression and increase their protumor characteristics through TGF- β production,” *Cell Biochem. Funct.*, vol. 40, no. 7, pp. 760–772, 2022, doi: 10.1002/cbf.3742.
- [143] V. Thorsson *et al.*, “The Immune Landscape of Cancer,” *Immunity*, vol. 48, no. 4, pp. 812–830, 2018.
- [144] R. L. Bowman *et al.*, “Macrophage Ontogeny Underlies Differences in Tumor-Specific Education in Brain Malignancies,” *Cell Rep.*, vol. 17, no. 9, pp. 2445–2459, 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.052.
- [145] M. Chittezhath *et al.*, “Molecular Profiling Reveals a Tumor-Promoting Phenotype of Monocytes and Macrophages in Human Cancer Progression,” *Immunity*, vol. 41, no. 5, pp. 815–829, 2014, doi: 10.1016/j.immuni.2014.09.014.
- [146] C. Wu *et al.*, “Single-cell characterization of malignant phenotypes and microenvironment alteration in retinoblastoma,” *Cell Death Dis.*, vol. 13, no. 5, 2022, doi: 10.1038/s41419-022-04904-8.
- [147] J. Mamrot, S. Balachandran, E. J. Steele, and R. A. Lindley, “Molecular model linking Th2 polarized M2 tumour-associated macrophages with deaminase-mediated cancer progression mutation signatures,” *Scand. J. Immunol.*, vol. 89, no. 5, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1111/sji.12760.
- [148] M. F. Wu *et al.*, “The M1/M2 spectrum and plasticity of malignant pleural effusion-macrophage in advanced lung cancer,” *Cancer Immunol. Immunother.*, 2020, doi: 10.1007/s00262-020-02781-8.
- [149] E. Müller *et al.*, “Toll-like receptor ligands and interferon- γ synergize for induction of antitumor M1 macrophages,” *Front. Immunol.*, vol. 8, no. OCT, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01383.
- [150] S. C. Lin *et al.*, “Periostin promotes ovarian cancer metastasis by enhancing M2 macrophages and cancer-associated fibroblasts via integrin-mediated NF- κ B and TGF- β 2 signaling,” *J. Biomed. Sci.*, vol. 29, no. 1, pp. 1–17, 2022, doi: 10.1186/s12929-022-00888-x.
- [151] R. Zhang *et al.*, “Cancer-associated fibroblasts enhance tumor-associated macrophages enrichment and suppress NK cells function in colorectal cancer,” *Cell Death Dis.*, vol. 10, no. 4, 2019, doi: 10.1038/s41419-019-1435-2.
- [152] F. Zhang *et al.*, “TGF- β induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 32, pp. 52294–52306, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.10561.
- [153] J. Yin, X. Zhao, X. Chen, and G. Shen, “Emodin suppresses hepatocellular carcinoma growth by regulating macrophage polarization via microRNA-26a/transforming growth factor beta 1/protein kinase B,” *Bioengineered*, vol. 13, no. 4, pp. 9548–9563, 2022, doi: 10.1080/21655979.2022.2061295.
- [154] M. G. Best *et al.*, “RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics,” *Cancer Cell*, vol. 28, no. 5, pp. 666–676, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.018.
- [155] K. Ganesh *et al.*, “L1CAM defines the regenerative origin of metastasis-initiating cells in colorectal cancer,” *Nat. Cancer*, vol. 1, no. January, 2020, doi: 10.1038/s43018-019-0006-x.

- [156] N. Terraneo *et al.*, “L1 cell adhesion molecule confers radioresistance to ovarian cancer and defines a new cancer stem cell population,” *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 1, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3390/cancers12010217.
- [157] F. Hartung, A. Patil, R. J. Meshram, and G. F. Weber, “Gene expression signatures of site-specificity in cancer metastases,” *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 37, no. 1, pp. 159–171, 2020, doi: 10.1007/s10585-019-09995-w.
- [158] A. M. Bellizzi, “Immunohistochemistry in the diagnosis and classification of neuroendocrine neoplasms: what can brown do for you?,” *Hum. Pathol.*, vol. 96, pp. 8–33, 2020, doi: 10.1016/j.humpath.2019.12.002.
- [159] B. Kim *et al.*, “A CTGF-RUNX2-RANKL Axis in Breast and Prostate Cancer Cells Promotes Tumor Progression in Bone,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 35, no. 1, pp. 155–166, 2020, doi: 10.1002/jbmr.3869.
- [160] M. Gao *et al.*, “Clinicopathological study of distant metastases of salivary adenoid cystic carcinoma,” *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 42, no. 8, pp. 923–928, 2013, doi: 10.1016/j.ijom.2013.04.006.
- [161] X. H. F. Zhang *et al.*, “Selection of bone metastasis seeds by mesenchymal signals in the primary tumor stroma,” *Cell*, vol. 154, no. 5, pp. 1060–1073, 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.07.036.
- [162] R. N. Kaplan *et al.*, “VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche,” *Nature*, vol. 438, no. 7069, pp. 820–827, Dec. 2005, doi: 10.1038/nature04186.
- [163] A. Hoshino *et al.*, “Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis,” *Nature*, vol. 527, no. 7578, pp. 329–335, Oct. 2015, doi: 10.1038/nature15756.
- [164] I. Nazarenko *et al.*, “Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation,” *Cancer Res.*, vol. 70, no. 4, pp. 1668–1678, 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2470.
- [165] S. Rana, S. Yue, D. Stadel, and M. Zöller, “Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 44, no. 9, pp. 1574–1584, 2012, doi: 10.1016/j.biocel.2012.06.018.
- [166] W. Mu, Z. Wang, and M. Zöller, “Ping-Pong-Tumor and Host in Pancreatic Cancer Progression,” *Front. Oncol.*, vol. 9, p. 1359, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.01359.
- [167] C. Neufert, C. Heichler, T. Brabletz, F. R. Scheibe, Kristina Boonsanay, Verawan Greten, and M. F. Neurath, “Inducible mouse models of colon cancer for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression and lymph node metastasis,” *Nat. Protoc.*, vol. 16, no. 1, pp. 61–85, 2021, doi: 10.1038/s41596-020-00412-1.
- [168] C. H. Liu *et al.*, “Lipopolysaccharide-Mediated Chronic Inflammation Promotes Tobacco Carcinogen-Induced Lung Cancer and Determines the Efficacy of Immunotherapy,” *Cancer Res.*, vol. 81, no. 1, pp. 144–157, 2021, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-1994.
- [169] L. A. de S. Rios, B. Cloete, and S. Mowla, “Activation-induced cytidine deaminase: in sickness and in health,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 146, no. 11, pp. 2721–2730, 2020, doi: 10.1007/s00432-020-03348-x.
- [170] L. Wong, F. S. Vizeacoumar, F. J. Vizeacoumar, and L. Chelico, “APOBEC1 cytosine deaminase activity on single-stranded DNA is suppressed by replication protein A,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. 1, pp. 322–339, 2021, doi: 10.1093/nar/gkaa1201.
- [171] M. H. Tan *et al.*, “Dynamic landscape and regulation of RNA editing in mammals,” *Nature*, vol. 550, no. 7675, pp. 249–254, 2017, doi: 10.1038/nature24041.
- [172] Y. Shiromoto, M. Sakurai, M. Minakuchi, K. Ariyoshi, and K. Nishikura, “ADAR1 RNA editing enzyme regulates R-loop formation and genome stability at telomeres in cancer cells,” *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-21921-x.

- [173] G. Godsmark, L. A. De Souza Rios, and S. Mowla, “Activation-Induced Cytidine Deaminase Promotes Proliferation and Enhances Chemoresistance and Migration in B-cell Lymphoma,” *Anticancer Res.*, vol. 41, no. 1, pp. 237–247, 2021, doi: 10.21873/anticancerres.14770.
- [174] L. Li *et al.*, “Activation-induced cytidine deaminase expression in colorectal cancer,” *Int J Clin Exp Pathol*, vol. 12, no. 11, pp. 4119–4124, 2019, [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31933808/>.
- [175] F. Ito, Y. Fu, S.-C. A. Kao, H. Yang, and X. S. Chen, “Family-Wide Comparative Analysis of Cytidine and Methylcytidine Deamination by Eleven Human APOBEC Proteins,” *J Mol Biol.*, vol. 429, no. 12, pp. 1787–1799, 2017, doi: 10.1016/j.jmb.2017.04.021.
- [176] S. Hou, J. M. Lee, W. Myint, H. Matsuo, N. K. Yilmaz, and C. A. Schiffer, “Structural basis of substrate specificity in human cytidine deaminase family APOBEC3s,” *J. Biol. Chem.*, vol. 297, no. 2, p. 100909, 2021, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100909.
- [177] N. Paz-Yaacov *et al.*, “Elevated RNA Editing Activity Is a Major Contributor to Transcriptomic Diversity in Tumors,” *Cell Rep.*, vol. 13, no. 2, pp. 267–276, 2015, doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.080.
- [178] A. Nishikori *et al.*, “Upregulated expression of activation-induced cytidine deaminase in ocular adnexal marginal zone lymphoma with igg4-positive cells,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 8, 2021, doi: 10.3390/ijms22084083.
- [179] C. Zong *et al.*, “Exposure to 1,2-Dichloropropane Upregulates the Expression of Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) in Human Cholangiocytes Co-Cultured With Macrophages,” *Toxicol. Sci.*, vol. 168, no. 1, pp. 137–148, 2019, doi: 10.1093/toxsci/kfy280.
- [180] M. Petljak *et al.*, “Characterizing Mutational Signatures in Human Cancer Cell Lines Reveals Episodic APOBEC Mutagenesis,” *Cell*, vol. 176, no. 6, pp. 1282–1294.e20, 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.02.012.
- [181] C. Messerschmidt *et al.*, “Distinct immune evasion in APOBEC-enriched, HPV-negative HNSCC,” *Int. J. Cancer*, vol. 147, no. 8, pp. 2293–2302, 2020, doi: 10.1002/ijc.33123.
- [182] S. Li *et al.*, “APOBEC3B and IL-6 form a positive feedback loop in hepatocellular carcinoma cells,” *Sci. China Life Sci.*, vol. 60, no. 6, pp. 617–626, 2017, doi: 10.1007/s11427-016-9058-6.
- [183] S. Faure-Dupuy *et al.*, “Control of APOBEC3B induction and cccDNA decay by NF- κ B and miR-138-5p,” *JHEP Reports*, vol. 3, no. 6, p. 100354, 2021, doi: 10.1016/j.jhepr.2021.100354.
- [184] B. Mussil, R. Suspène, M. M. Aynaud, A. Gauvrit, J. P. Vartanian, and S. Wain-Hobson, “Human APOBEC3A Isoforms Translocate to the Nucleus and Induce DNA Double Strand Breaks Leading to Cell Stress and Death,” *PLoS One*, vol. 8, no. 8, pp. 1–17, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0073641.
- [185] E. Y. Alqassim *et al.*, “RNA editing enzyme APOBEC3A promotes pro-inflammatory M1 macrophage polarization,” *Commun. Biol.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1038/s42003-020-01620-x.
- [186] M. A. Zipeto *et al.*, “ADAR1 Activation Drives Leukemia Stem Cell Self-Renewal by Impairing Let-7 Biogenesis,” *Cell Stem Cell*, vol. 19, no. 2, pp. 177–191, 2016, doi: 10.1016/j.stem.2016.05.004.
- [187] C. K. Pfaller, C. X. George, and C. E. Samuel, “Adenosine Deaminases Acting on RNA (ADARs) and Viral Infections,” *Annu. Rev. Virol.*, vol. 8, no. 1, pp. 239–264, 2021, doi: 10.1146/annurev-virology-091919-065320.
- [188] L. Jiang *et al.*, “Adar1 suppresses interferon signaling in gastric cancer cells by

- micrna-302a-mediated irf9/stat1 regulation,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 17, pp. 1–13, 2020, doi: 10.3390/ijms21176195.
- [189] C. K. Ishizuka, Jeffrey J Manguso, Robert T Cheruiyot *et al.*, “Loss of ADAR1 in tumours overcomes resistance to immune checkpoint blockade,” *Nature*, vol. 565, no. 7737, pp. 43–48, 2019, doi: 10.1038/s41586-018-0768-9.
- [190] Q. Jiang *et al.*, “Inflammation-driven deaminase deregulation fuels human pre-leukemia stem cell evolution,” *Cell Rep.*, vol. 34, no. 4, p. 108670, 2021, doi: 10.1016/j.celrep.2020.108670.
- [191] C. P. Kung *et al.*, “Evaluating the therapeutic potential of ADAR1 inhibition for triple-negative breast cancer,” *Oncogene*, vol. 40, no. 1, pp. 189–202, 2021, doi: 10.1038/s41388-020-01515-5.
- [192] M. M. Yujie Ding, X. Shi, J. Ji, and Y. Su, “ADAR1p150 regulates the biosynthesis and function of miRNA-149* in human melanoma,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 523, no. 4, pp. 900–907, 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.12.110.
- [193] S. Takeda *et al.*, “Activation of AZIN1 RNA editing is a novel mechanism that promotes invasive potential of cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer,” *Cancer Lett.*, vol. 444, pp. 127–135, 2019, doi: 10.1016/j.canlet.2018.12.009.Activation.
- [194] J. Li *et al.*, “ADAR1 attenuates allogeneic graft rejection by suppressing miR-21 biogenesis in macrophages and promoting M2 polarization,” *FASEB J.*, vol. 32, no. 9, pp. 5162–5173, 2018, doi: 10.1096/fj.201701449R.
- [195] P. Hernández Camarero, E. López Ruiz, J. A. Marchal Corrales, and M. Perán Quesada, “Unifying Different Cancer Theories in a Unique Tumour Model : Chronic Inflammation and Deaminases as Meeting Points,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 15, p. 8720, 2022, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms23158720>.
- [196] D. Guallar *et al.*, “ADAR1-Dependent RNA Editing Promotes MET and iPSC Reprogramming by Alleviating ER Stress,” *Cell Stem Cell*, vol. 27, no. 2, pp. 300–314.e11, 2020, doi: 10.1016/j.stem.2020.04.016.
- [197] L. A. Crews *et al.*, “An RNA editing fingerprint of cancer stem cell reprogramming,” *J. Transl. Med.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–12, 2015, doi: 10.1186/s12967-014-0370-3.
- [198] X. Liu *et al.*, “ADAR1 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition and stem-like cell phenotype of oral cancer by facilitating oncogenic microRNA maturation,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 38, no. 1, pp. 1–16, 2019, doi: 10.1186/s13046-019-1300-2.
- [199] P. Shen *et al.*, “CircNEIL3 regulatory loop promotes pancreatic ductal adenocarcinoma progression via miRNA sponging and A-to-I RNA-editing,” *Mol. Cancer*, vol. 20, no. 1, pp. 1–22, 2021, doi: 10.1186/s12943-021-01333-7.
- [200] J. Ramírez-Moya, A. R. Baker, F. J. Slack, and P. Santisteban, “ADAR1-mediated RNA editing is a novel oncogenic process in thyroid cancer and regulates miR-200 activity,” *Oncogene*, vol. 39, no. 18, pp. 3738–3753, 2020, doi: 10.1038/s41388-020-1248-x.
- [201] D. Fumagalli *et al.*, “Principles Governing A-to-I RNA Editing in the Breast Cancer Transcriptome,” *Cell Rep.*, vol. 13, no. 2, pp. 277–289, 2015, doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.032.
- [202] Y. Nemlich *et al.*, “ADAR1-mediated regulation of melanoma invasion,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-04600-2.
- [203] J. Chen *et al.*, “Global RNA editing identification and characterization during human pluripotent-to-cardiomyocyte differentiation,” *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, vol. 26, no. December, pp. 879–891, 2021, doi: 10.1016/j.omtn.2021.10.001.
- [204] J. T. Roberts *et al.*, “ADAR Mediated RNA Editing Modulates MicroRNA Targeting in Human Breast Cancer,” *Process.*, vol. 6, no. 5, p. 42, 2018, doi: 10.3390/pr6050042.
- [205] V. Tassinari, V. Cesarini, D. A. Silvestris, A. Scafidi, L. Cucina, and A. Gallo,

- “MicroRNA Editing Detection and Function: A Combined In Silico and Experimental Approach for the Identification and Validation of Putative Oncogenic Targets.” *Methods Mol Biol.*, vol. 2181, pp. 253–267, 2021, doi: 10.1007/978-1-0716-0787-9_15.
- [206] Y. Shiromoto, M. Sakurai, H. Qu, A. V Kossenkov, and K. Nishikura, “Processing of Alu small RNAs by DICER / ADAR1 complexes and their RNAi targets,” *RNA*, vol. 26, no. 12, pp. 1801–1814, 2020, doi: 10.1261/rna.076745.120.
- [207] C. Farace *et al.*, “Deregulation of cancer-stem-cell-associated miRNAs in tissues and sera of colorectal cancer patients,” *Oncotarget*, vol. 11, no. 2, pp. 116–130, 2020, doi: 10.18632/oncotarget.27411.
- [208] U. Kapoor *et al.*, “ADAR-deficiency perturbs the global splicing landscape in mouse tissues,” *Genome Res.*, vol. 30, no. 8, pp. 1107–1118, 2020, doi: 10.1101/gr.256933.119.
- [209] J. Ramírez-Moya, C. Miliotis, A. R. Baker, R. I. Gregory, F. J. Slack, and P. Santisteban, “An ADAR1-dependent RNA editing event in the cyclin-dependent kinase CDK13 promotes thyroid cancer hallmarks,” *Mol. Cancer*, vol. 20, no. 1, pp. 1–20, 2021, doi: 10.1186/s12943-021-01401-y.
- [210] M. Mostafazadeh, N. Samadi, H. Kahroba, B. Baradaran, S. Haiaty, and M. Nouri, “Potential roles and prognostic significance of exosomes in cancer drug resistance,” *Cell Biosci.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–15, 2021, doi: 10.1186/s13578-020-00515-y.
- [211] F. Yang *et al.*, “Exosomal miRNAs and miRNA dysregulation in cancer-associated fibroblasts,” *Mol. Cancer*, vol. 16, no. 1, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1186/s12943-017-0718-4.
- [212] S. Ramachandran and V. Palanisamy, “Horizontal transfer of RNAs: exosomes as mediators of intercellular communication,” *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, vol. 3, no. 2, pp. 286–293, Mar. 2012, doi: 10.1002/wrna.115.
- [213] M. F. Bolukbasi *et al.*, “miR-1289 and “Zipcode”-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles,” *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 1, p. e10, Feb. 2012, doi: 10.1038/mtna.2011.2.
- [214] L. B. Alexandrov *et al.*, “The repertoire of mutational signatures in human cancer,” *Nature*, vol. 578, no. 7793, pp. 94–101, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-1943-3.
- [215] X. Ye *et al.*, “Genome-wide mutational signatures revealed distinct developmental paths for human B cell lymphomas,” *J. Exp. Med.*, vol. 218, no. 2, 2021, doi: 10.1084/jem.20200573.
- [216] M. Asaoka, S. K. Patnaik, T. Ishikawa, and K. Takabe, “Different members of the APOBEC3 family of DNA mutators have opposing associations with the landscape of breast cancer,” *Am J Cancer Res.*, vol. 11, no. 10, pp. 5111–5125, 2021, [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34765315/>.
- [217] P. Delgado *et al.*, “Interplay between UNG and AID governs intratumoral heterogeneity in mature B cell lymphoma,” *PLoS Genet.*, vol. 16, no. 12 December, pp. 1–23, 2020, doi: 10.1371/journal.pgen.1008960.
- [218] P. P. Argyris *et al.*, “Endogenous APOBEC3B overexpression characterizes HPV-positive and HPV-negative oral epithelial dysplasias and head and neck cancers,” *Mod. Pathol.*, vol. 34, no. 2, pp. 280–290, 2021, doi: 10.1038/s41379-020-0617-x.
- [219] M. Schubert, H. Hackl, F. J. Gassner, R. Greil, and R. Geisberger, “Investigating epigenetic effects of activation-induced deaminase in chronic lymphocytic leukemia,” *PLoS One*, vol. 13, no. 12, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0208753.
- [220] Z. Che *et al.*, “Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression Facilitates the Malignant Phenotype and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Clear Cell Renal Cell Carcinoma,” *DNA Cell Biol.*, vol. 39, no. 7, pp. 1299–1312, 2020, doi: 10.1089/dna.2019.5119.

- [221] H. Li *et al.*, “AID modulates carcinogenesis network via DNA demethylation in bladder urothelial cell carcinoma,” *Cell Death Dis.*, vol. 10, no. 4, 2019, doi: 10.1038/s41419-019-1472-x.
- [222] S. B. Nandy and R. Lakshmanaswamy, “Cancer Stem Cells and Metastasis,” *Prog Mol Biol Transl Sci*, vol. 151, pp. 137–176, 2017, doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.07.007.
- [223] L. Peng *et al.*, “Characterization of RNA editome in primary and metastatic lung adenocarcinomas,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 7, pp. 11517–11529, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.14076.
- [224] D. Alonso-Curbelo *et al.*, “A gene – environment-induced epigenetic program initiates tumorigenesis,” *Nature*, vol. 590, pp. 642–648, 2021, doi: 10.1038/s41586-020-03147-x.
- [225] C. J. Cho, S. J. Myung, and S. Chang, “ADAR1 and MicroRNA; a hidden crosstalk in cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 4, 2017, doi: 10.3390/ijms18040799.
- [226] Y. Tan *et al.*, “Platinum(IV) complexes as inhibitors of CD47-SIRP α axis for chemioimmunotherapy of cancer,” *Eur J Med Chem*, 2022, doi: 10.1016/j.ejmech.2021.114047.
- [227] B. O. Kanabe, M. Ozaslan, S. A. Aziz, and R. A. Al-Attar, Mustafa S Kılıç, İbrahim Halil Khailany, “Expression patterns of LncRNA-GASS5 and its target APOBEC3C gene through miR-103 in breast cancer patients,” *Cell Mol Biol*, vol. 67, no. 3, pp. 5–10, 2021, doi: 10.14715/cmb/2021.67.3.2.
- [228] J. K. Benhamida *et al.*, “Pancreatoblastomas and mixed and pure acinar cell carcinomas share epigenetic signatures distinct from other neoplasms of the pancreas,” *Mod. Pathol.*, vol. 35, no. 7, pp. 956–961, 2022, doi: 10.1038/s41379-021-00989-2.
- [229] X. Huang, G. Zhang, and T. Liang, “Subtyping for pancreatic cancer precision therapy,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 43, no. 6, pp. 482–494, 2022, doi: 10.1016/j.tips.2022.03.005.
- [230] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2019,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 69, no. 1, pp. 7–34, 2019, doi: 10.3322/caac.21551.
- [231] X. Liu *et al.*, “Multi-omics analysis of intra-tumoural and inter-tumoural heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma,” *Clin. Transl. Med.*, vol. 12, no. 1, 2022, doi: 10.1002/ctm2.670.
- [232] C. A. Ross, “The trophoblast model of cancer,” *Nutr. Cancer*, vol. 67, no. 1, pp. 61–67, 2015, doi: 10.1080/01635581.2014.956257.
- [233] A. González-Titos, P. Hernández-Camarero, S. Barungi, J. A. Marchal, J. Kenyon, and M. Perán, “Trypsinogen and chymotrypsinogen: potent anti-tumor agents,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 00, no. 00, pp. 1–13, 2021, doi: 10.1080/14712598.2021.1922666.
- [234] M. Perán, J. A. Marchal, M. A. García, J. Kenyon, and D. Tosh, “In vitro treatment of carcinoma cell lines with pancreatic (pro)enzymes suppresses the EMT programme and promotes cell differentiation,” *Cell. Oncol.*, vol. 36, no. 4, pp. 289–301, 2013, doi: 10.1007/s13402-013-0134-8.
- [235] M. Perán *et al.*, “A formulation of pancreatic pro-enzymes provides potent anti-tumour efficacy: A pilot study focused on pancreatic and ovarian cancer,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–15, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-14571-x.
- [236] P. Hernández-Camarero *et al.*, “Pancreatic (pro)enzymes treatment suppresses BXPC-3 pancreatic Cancer Stem Cell subpopulation and impairs tumour engrafting,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 11359, Aug. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-47837-7.
- [237] L. Zhang *et al.*, “Hypoxia-induced ROS aggravate tumor progression through HIF-1 α -SERPINE1 signaling in glioblastoma,” *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, vol. 24, no. 1, pp. 32–49, 2023, doi: 10.1631/jzus.B2200269.

- [238] M. Kemper *et al.*, “Integrin alpha-V is an important driver in pancreatic adenocarcinoma progression,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 40, no. 1, pp. 1–19, 2021, doi: 10.1186/s13046-021-01946-2.
- [239] K. Gumireddy *et al.*, “KLF17 is a negative regulator of epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 11, pp. 1297–1304, 2009, doi: 10.1038/ncb1974.
- [240] L. Baeyens, S. De Breuck, J. Lardon, J. K. Mfopou, I. Rooman, and L. Bouwens, “In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells,” *Diabetologia*, vol. 48, no. 1, pp. 49–57, 2005, doi: 10.1007/s00125-004-1606-1.
- [241] A. N. Naser, W. Guiler, Q. Lu, and Y. H. Chen, “Nanoarchitecture and molecular interactions of epithelial cell junction proteins revealed by super-resolution microscopy,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1516, no. 1, pp. 175–187, 2022, doi: 10.1111/nyas.14855.
- [242] K. Dorman *et al.*, “Serum biomarker panel diagnostics in pancreatic ductal adenocarcinoma: the clinical utility of soluble interleukins, IFN- γ , TNF- α and PD-1/PD-L1 in comparison to established serum tumor markers,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, no. 0123456789, 2022, doi: 10.1007/s00432-022-04112-z.
- [243] P. Nallasamy *et al.*, “Pancreatic Tumor Microenvironment Factor Promotes Cancer Stemness via SPP1–CD44 Axis,” *Gastroenterology*, vol. 161, no. 6, pp. 1998–2013.e7, 2021, doi: 10.1053/j.gastro.2021.08.023.
- [244] T. Y. Avery, N. Köhler, R. Zeiser, T. Brummer, and D. A. Ruess, “Onco-immunomodulatory properties of pharmacological interference with RAS-RAF-MEK-ERK pathway hyperactivation,” *Front. Oncol.*, vol. 12, no. July, pp. 1–30, 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.931774.
- [245] H. Lin *et al.*, “S100A10 Promotes Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells Proliferation, Migration and Adhesion through JNK/LAMB3-LAMC2 Axis,” *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 1, p. 202, 2022, doi: 10.3390/cancers15010202.
- [246] W. R. Im *et al.*, “A Regulatory Noncoding RNA, nc886, Suppresses Esophageal Cancer by Inhibiting the AKT Pathway and Cell Cycle Progression,” *Cells*, vol. 9, no. 4, p. 801, 2020, doi: 10.3390/cells9040801.
- [247] I. S. Ibrahim *et al.*, “Cost-effectiveness of pancreas surveillance: The CDKN2A-p16-Leiden cohort,” *United Eur. Gastroenterol. J.*, no. November 2022, pp. 1–8, 2023, doi: 10.1002/ueg2.12360.
- [248] J. F. H. Pittaway, C. Lipsos, K. Mariniello, and L. Guasti, “The role of delta-like non-canonical Notch ligand 1 (DLK1) in cancer,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 28, no. 12, pp. R271–R287, 2021, doi: 10.1530/ERC-21-0208.
- [249] Y. Tong *et al.*, “KAT2A succinyltransferase activity-mediated 14-3-3 ζ upregulation promotes β -catenin stabilization-dependent glycolysis and proliferation of pancreatic carcinoma cells,” *Cancer Lett*, vol. 469, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1016/j.canlet.2019.09.015.
- [250] S. Shoucair *et al.*, “Comprehensive Analysis of Somatic Mutations in Driver Genes of Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals KRAS G12D and Mutant TP53 Combination as an Independent Predictor of Clinical Outcome,” *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 29, no. 4, pp. 2720–2731, 2022, doi: 10.1245/s10434-021-11081-z.
- [251] D. Salomon, “Transforming growth factor β in cancer: Janus, the two-faced god,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 106, no. 2, pp. 1–2, 2014, doi: 10.1093/jnci/djt441.
- [252] Y. Han *et al.*, “HPV-Induced MiR-21 Promotes Epithelial Mesenchymal Transformation and Tumor Progression in Cervical Cancer Cells through the TGF β R2/hTERT Pathway,” *Contrast Media Mol. Imaging*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/6297694.

- [253] J. Chen *et al.*, “The high-risk HPV oncogene E7 upregulates miR-182 expression through the TGF- β /Smad pathway in cervical cancer,” *Cancer Lett.*, vol. 460, no. 1017, pp. 75–85, 2019, doi: 10.1016/j.canlet.2019.06.015.
- [254] J. C. Shih *et al.*, “Unveiling the role of microRNA-7 in linking TGF- β -Smad-mediated epithelial-mesenchymal transition with negative regulation of trophoblast invasion,” *FASEB J.*, vol. 33, no. 5, pp. 6281–6295, 2019, doi: 10.1096/fj.201801898RR.
- [255] G. Hather *et al.*, “Growth rate analysis and efficient experimental design for tumor xenograft studies,” *Cancer Inform.*, vol. 13, no. 4, pp. 65–72, 2014, doi: 10.4137/CIn.s13974.
- [256] Y. Zhang *et al.*, “A ratiometric pH probe for acidification tracking in dysfunctional mitochondria and tumour tissue in vivo,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 10, no. 28, pp. 5422–5429, 2022, doi: 10.1039/d2tb00553k.
- [257] J. Kay and B. Kassell, “The autoactivation of trypsinogen,” *J. Biol. Chem.*, vol. 246, no. 21, pp. 6661–6665, 1971, doi: 10.1016/s0021-9258(19)34166-3.
- [258] M. Sendler *et al.*, “Cathepsin B-Mediated Activation of Trypsinogen in Endocytosing Macrophages Increases Severity of Pancreatitis in Mice,” *Gastroenterology*, vol. 154, no. 3, pp. 704–718.e10, 2018, doi: 10.1053/j.gastro.2017.10.018.
- [259] M. Hirota, M. Ohmuraya, D. Hashimoto, K. Suyama, H. Sugita, and M. Ogawa, “Roles of Autophagy and Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor in Trypsinogen Activation in Acute Pancreatitis,” *Pancreas*, vol. 49, no. 4, pp. 493–497, 2020, doi: 10.1097/MPA.0000000000001519.
- [260] T. Fujimoto *et al.*, “Cathepsin B is highly expressed in pancreatic cancer stem-like cells and is associated with patients’ surgical outcomes,” *Oncol. Lett.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–9, 2021, doi: 10.3892/ol.2020.12291.
- [261] S. Bünger *et al.*, “Pancreatic carcinoma cell lines reflect frequency and variability of cancer stem cell markers in clinical tissue,” *Eur Surg Res*, vol. 49, pp. 88–98, 2012, doi: 10.1159/000341669.
- [262] T. Ishiwata *et al.*, “Pancreatic cancer stem cells: features and detection methods,” *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 24, no. 4, pp. 797–805, 2018, doi: 10.1007/s12253-018-0420-x.
- [263] B. Ferrara *et al.*, “A Comprehensive Characterization of Stemness in Cell Lines and Primary Cells of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 18, 2022, doi: 10.3390/ijms231810663.
- [264] P. Vasefi *et al.*, “Nanog, as a key cancer stem cell marker in tumor progression,” *Gene*, vol. 827, no. November 2021, p. 146448, 2022, doi: 10.1016/j.gene.2022.146448.
- [265] S. Kumar *et al.*, “Deregulation of the CD44-NANOG-MDR1 associated chemoresistance pathways of breast cancer stem cells potentiates the anti-cancer effect of Kaempferol in synergism with Verapamil,” *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 437, 2022, doi: 10.1016/j.taap.2022.115887.
- [266] W. Xie, J. Yu, Y. Yin, X. Zhang, X. Zheng, and X. Wang, “OCT4 induces EMT and promotes ovarian cancer progression by regulating the PI3K/AKT/mTOR pathway,” *Front. Oncol.*, vol. 12, no. August, pp. 1–13, 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.876257.
- [267] P. Cheng *et al.*, “Nanog down-regulates the Wnt signaling pathway via β -catenin phosphorylation during epidermal stem cell proliferation and differentiation,” *Cell Biosci.*, vol. 5, p. 5, 2015, doi: 10.1186/2045-3701-5-5.
- [268] Z. Li, X. Huang, W. Hu, and H. Lu, “Down-regulation of USP22 reduces cell stemness and enhances the sensitivity of pancreatic cancer cells to cisplatin by inactivating the Wnt/ β -catenin pathway,” *Tissue Cell*, vol. 77, no. March, p. 101787, 2022, doi: 10.1016/j.tice.2022.101787.

- [269] J. H. Kim, J. Hwang, J. H. Jung, H. J. Lee, D. Y. Lee, and S. H. Kim, “Molecular networks of FOXP family: Dual biologic functions, interplay with other molecules and clinical implications in cancer progression,” *Mol. Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. 1–19, 2019, doi: 10.1186/s12943-019-1110-3.
- [270] S. Leng *et al.*, “SIRT1 coordinates with the CRL4B complex to regulate pancreatic cancer stem cells to promote tumorigenesis,” *Cell Death Differ.*, vol. 28, no. 12, pp. 3329–3343, 2021, doi: 10.1038/s41418-021-00821-z.
- [271] I.-R. Cho *et al.*, “SIRT1 inhibits proliferation of pancreatic cancer cells expressing pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF), a novel oncogene, by suppression of β -catenin.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 423, no. 2, pp. 270–5, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.107.
- [272] A. Munasinghe *et al.*, “Fibronectin acts as a molecular switch to determine SPARC function in pancreatic cancer,” *Cancer Lett.*, vol. 477, no. September 2019, pp. 88–96, 2020, doi: 10.1016/j.canlet.2020.02.031.
- [273] N. Hao, D. Yang, T. Liu, S. Liu, X. Lu, and L. Chen, “Laminin-integrin a6b4 interaction activates notch signaling to facilitate bladder cancer development,” *BMC Cancer*, vol. 22, no. 1, pp. 1–11, 2022, doi: 10.1186/s12885-022-09645-7.
- [274] R. Mu *et al.*, “Hypoxia Promotes Pancreatic Cancer Cell Dedifferentiation to Stem-Like Cell Phenotypes with High Tumorigenic Potential by the HIF-1 α /Notch Signaling Pathway,” *Pancreas*, vol. 50, no. 5, pp. 756–765, 2021, doi: 10.1097/MPA.0000000000001828.
- [275] A. G. Clark, F. E. Bertrand, and G. Sigounas, “A potential requirement for Smad3 phosphorylation in Notch-mediated EMT in colon cancer,” *Adv. Biol. Regul.*, vol. 88, no. December 2022, p. 100957, 2023, doi: 10.1016/j.jbior.2023.100957.
- [276] Y. Jia *et al.*, “Long non-coding RNA NEAT1 mediated RPRD1B stability facilitates fatty acid metabolism and lymph node metastasis via c-Jun/c-Fos/SREBP1 axis in gastric cancer,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 41, no. 1, pp. 1–20, 2022, doi: 10.1186/s13046-022-02449-4.
- [277] R. Morales-bárceñas, M. Sánchez-pérez, Yesennia Santibáñez-andrade, Y. I Chirino, E. Soto-Reyes, and C. García- Cuellar, “Airborne particulate matter (PM 10) induces cell invasion through Aryl Hydrocarbon Receptor and Activator Protein 1 (AP-1) pathway deregulation in A549 lung epithelial cells,” *Mol Biol Rep*, vol. 50, no. 1, pp. 107–119, 2023, doi: 10.1007/s11033-022-07986-x.
- [278] S. Del Mar Díaz-González *et al.*, “Transregulation of microRNA miR-21 promoter by AP-1 transcription factor in cervical cancer cells,” *Cancer Cell Int.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–15, 2019, doi: 10.1186/s12935-019-0931-x.
- [279] S. Gambera *et al.*, “Role of Activator Protein-1 Complex on the Phenotype of Human Osteosarcomas Generated from Mesenchymal Stem Cells,” *Stem Cells*, vol. 36, no. 10, pp. 1487–1500, 2018, doi: 10.1002/stem.2869.
- [280] W. Feng *et al.*, “TNFAIP3 promotes ALDH-positive breast cancer stem cells through FGFR1/MEK/ERK pathway,” *Med. Oncol.*, vol. 39, no. 12, pp. 1–13, 2022, doi: 10.1007/s12032-022-01844-3.
- [281] J. Rinehart *et al.*, “Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 22, no. 22, pp. 4456–4462, 2004, doi: 10.1200/JCO.2004.01.185.
- [282] R. Kong, X. Qian, and W. Ying, “Pancreatic cancer cells spectral library by DIA-MS and the phenotype analysis of gemcitabine sensitivity,” *Sci. Data*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2022, doi: 10.1038/s41597-022-01407-1.
- [283] Z. Zhang, A. Richmond, and C. Yan, “Immunomodulatory Properties of PI3K/AKT/mTOR and MAPK/MEK/ERK Inhibition Augment Response to Immune

- Checkpoint Blockade in Melanoma and Triple-Negative Breast Cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 13, 2022, doi: 10.3390/ijms23137353.
- [284] Z. Zhang and Y. Xu, “FZD7 accelerates hepatic metastases in pancreatic cancer by strengthening EMT and stemness associated with TGF- β /SMAD3 signaling,” *Mol. Med.*, vol. 28, no. 1, pp. 1–12, 2022, doi: 10.1186/s10020-022-00509-1.
- [285] Q. Gao *et al.*, “Dysregulated glucuronic acid metabolism exacerbates hepatocellular carcinoma progression and metastasis through the TGF β signalling pathway,” *Clin. Transl. Med.*, vol. 12, no. 8, 2022, doi: 10.1002/ctm2.995.
- [286] F. Lu, S. Chen, W. Shi, X. Su, H. Wu, and M. Liu, “GPC1 promotes the growth and migration of colorectal cancer cells through regulating the TGF- β 1/SMAD2 signaling pathway,” *PLoS One*, vol. 17, no. 6 June, pp. 1–14, 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0269094.
- [287] R. Yang *et al.*, “Downregulation of nc886 contributes to prostate cancer cell invasion and TGF β 1-induced EMT,” *Genes Dis.*, vol. 9, no. 4, pp. 1086–1098, 2022, doi: 10.1016/j.gendis.2020.12.010.
- [288] A. Cherukunnath, R. Davargaon, R. Ashraf, U. Kamdar, and S. Srivastava, Amit K Tripathi, Prem P Chatterjee, Nabanita Kumar, “KLF8 is activated by TGF- β 1 via Smad2 and contributes to ovarian cancer progression,” *J Cell Biochem*, vol. 123, no. 5, pp. 921–934, 2022, doi: 10.1002/jcb.30235.
- [289] B. Schniewind *et al.*, “Dissecting the role of TGF-beta type I receptor/ALK5 in pancreatic ductal adenocarcinoma: Smad activation is crucial for both the tumor suppressive and prometastatic function,” *Oncogene*, vol. 26, no. 33, pp. 4850–4862, Jul. 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1210272.
- [290] S. Biswas *et al.*, “Mutational inactivation of TGFBR2 in microsatellite unstable colon cancer arises from the cooperation of genomic instability and the clonal outgrowth of transforming growth factor β resistant cells,” *Genes, Chromosom. Cancer*, vol. 47, no. 2, pp. 95–106, Feb. 2008, doi: 10.1002/gcc.20511.
- [291] B. Jovanović *et al.*, “T β RIII expression in human breast cancer stroma and the role of soluble T β RIII in breast cancer associated fibroblasts,” *Cancers (Basel)*, vol. 8, pp. 1–18, 2016, doi: 10.3390/cancers8110100.
- [292] H. Ungefroren *et al.*, “Rac1b negatively regulates TGF- β 1-induced cell motility in pancreatic ductal epithelial cells by suppressing Smad signalling,” *Oncotarget*, vol. 5, no. 1, pp. 1–28, 2014, doi: 10.18632/oncotarget.1696.
- [293] A. Bertrand-Chapel *et al.*, “SMAD2/3 mediate oncogenic effects of TGF- β in the absence of SMAD4,” *Commun. Biol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–13, 2022, doi: 10.1038/s42003-022-03994-6.
- [294] L. Luo, N. Li, N. Lv, and D. Huang, “SMAD7: a timer of tumor progression targeting TGF- β signaling,” *Tumor Biol.*, vol. 35, no. 9, pp. 8379–8385, 2014, doi: 10.1007/s13277-014-2203-7.
- [295] M. Barboura *et al.*, “Tannic Acid, A Hydrolysable Tannin, Prevents Transforming Growth Factor- β -Induced Epithelial–Mesenchymal Transition to Counteract Colorectal Tumor Growth,” *Cells*, vol. 11, no. 22, p. 3645, 2022, doi: 10.3390/cells11223645.
- [296] H. Ungefroren *et al.*, “Rac1b negatively regulates TGF- β 1-induced cell motility in pancreatic ductal epithelial cells by suppressing Smad signalling,” *Oncotarget*, vol. 5, no. 1, pp. 277–290, 2014, doi: 10.18632/oncotarget.1696.
- [297] D. Witte *et al.*, “Negative regulation of TGF- β 1-induced MKK6-p38 and MEK-ERK signalling and epithelial-mesenchymal transition by Rac1b,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 17313, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-15170-6.
- [298] H. Ungefroren *et al.*, “The Quasimesenchymal Pancreatic Ductal Epithelial Cell Line PANC-1—A Useful Model to Study Clonal Heterogeneity and EMT Subtype Shifting,”

Cancers (Basel)., vol. 14, no. 9, 2022, doi: 10.3390/cancers14092057.

- [299] A. Ali *et al.*, “KLF17 empowers TGF- β /Smad signaling by targeting Smad3-dependent pathway to suppress tumor growth and metastasis during cancer progression.,” *Cell Death Dis.*, vol. 6, p. e1681, Jan. 2015, doi: 10.1038/cddis.2015.48.
- [300] H. Xie *et al.*, “Circular RNA circ_0047744 suppresses the metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma by regulating the miR-21/SOCS5 axis,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 605, pp. 154–161, 2022, doi: 10.1016/j.bbrc.2022.03.082.
- [301] A. Misawa, R. Katayama, S. Koike, A. Tomida, T. Watanabe, and N. Fujita, “AP-1-Dependent miR-21 expression contributes to chemoresistance in cancer stem cell-like SP cells,” *Oncol Res*, vol. 19, no. 1, pp. 23–33, 2010, doi: 10.3727/096504010X12828372551759.
- [302] S. R. Pfeffer, C. H. Yang, and L. M. Pfeffer, “The Role of miR-21 in Cancer,” *Drug Dev. Res.*, vol. 76, no. 6, pp. 270–277, Sep. 2015, doi: 10.1002/ddr.21257.
- [303] L. Liu *et al.*, “Circular RNA ciRS-7 promotes the proliferation and metastasis of pancreatic cancer by regulating miR-7-mediated EGFR/STAT3 signaling pathway,” *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, vol. 18, no. 6, pp. 580–586, 2019, doi: 10.1016/j.hbpd.2019.03.003.
- [304] Y. Shang *et al.*, “MiR-7-5p/KLF4 signaling inhibits stemness and radioresistance in colorectal cancer,” *Cell Death Discov.*, vol. 9, no. 1, 2023, doi: 10.1038/s41420-023-01339-8.
- [305] T. T. Bonello *et al.*, “Phase separation of Hippo signalling complexes,” *EMBO J.*, vol. 42, no. 6, pp. 1–20, 2023, doi: 10.15252/embj.2022112863.
- [306] L. Thines, L. Gorisse, Z. Li, S. Sayedyahosseini, and D. B. Sacks, “Calmodulin activates the Hippo signaling pathway by promoting LATS1 kinase-mediated inhibitory phosphorylation of the transcriptional coactivator YAP,” *J. Biol. Chem.*, vol. 298, no. 5, pp. 1–12, 2022, doi: 10.1016/j.jbc.2022.101839.
- [307] H. Yan *et al.*, “Loss of the wild-type KRAS allele promotes pancreatic cancer progression through functional activation of YAP1,” *Oncogene*, vol. 40, no. 50, pp. 6759–6771, 2021, doi: 10.1038/s41388-021-02040-9.
- [308] N. M. Aiello *et al.*, “EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration,” *Dev. Cell*, vol. 45, no. 6, pp. 681–695.e4, 2018, doi: 10.1016/j.devcel.2018.05.027.
- [309] A. J. Kolnes *et al.*, “FSH Levels Are Related to E-cadherin Expression and Subcellular Location in Nonfunctioning Pituitary Tumors,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 105, no. 8, pp. 2587–2594, 2020, doi: 10.1210/clinem/dgaa281.
- [310] N. G. Kim, E. Koh, X. Chen, and B. M. Gumbiner, “E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 29, pp. 11930–11935, 2011, doi: 10.1073/pnas.1103345108.
- [311] H. Nishina, “Physiological and pathological roles of the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway in liver formation, homeostasis, and tumorigenesis,” *Cancer Sci.*, vol. 113, no. 6, pp. 1900–1908, 2022, doi: 10.1111/cas.15352.
- [312] S. Liu *et al.*, “Piezo1 impairs hepatocellular tumor growth via deregulation of the MAPK-mediated YAP signaling pathway,” *Cell Calcium*, vol. 95, no. December 2020, 2021, doi: 10.1016/j.ceca.2021.102367.
- [313] D. Huang *et al.*, “Regulation of Hippo signalling by p38 signalling,” *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 4, pp. 328–337, Aug. 2016, doi: 10.1093/jmcb/mjw036.
- [314] S. Wang *et al.*, “LKB1 and YAP phosphorylation play important roles in Celestrol-induced β -catenin degradation in colorectal cancer,” *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 11, pp. 1–19, 2019, doi: 10.1177/1758835919843736.

- [315] M. Shao, L. Wang, Q. Zhang, T. Wang, and S. Wang, "STMN2 overexpression promotes cell proliferation and EMT in pancreatic cancer mediated by WNT/ β -catenin signaling," *Cancer Gene Ther.*, vol. 30, no. 3, pp. 472–480, 2023, doi: 10.1038/s41417-022-00568-w.
- [316] X. Tong *et al.*, "SOX10, a novel HMG-box-containing tumor suppressor, inhibits growth and metastasis of digestive cancers by suppressing the Wnt/ β -catenin pathway," *Oncotarget*, vol. 5, no. 21, pp. 10571–83, 2014.
- [317] Y. Aimaiti *et al.*, "TGF- β 1 signaling activates hepatic stellate cells through Notch pathway," *Cytotechnology*, vol. 71, no. 5, pp. 881–891, 2019, doi: 10.1007/s10616-019-00329-y.
- [318] Q. Pu, Q. Ma, J. Li, G. Li, and X.-Y. Li, "Soft substrate stiffness modifies corneal epithelial stem cell phenotype through hippo-YAP/notch pathway crosstalk," *Med Hypotheses*, vol. 156, p. 110687, 2021, doi: 10.1016/j.mehy.2021.110687.
- [319] J. Sung Bae, S. mi Kim, and H. Lee, "The Hippo signaling pathway provides novel anti-cancer drug targets," *Oncotarget*, vol. 8, no. 9, pp. 16084–16098, 2015, doi: 10.18632/oncotarget.14306.
- [320] V. Bagheri, M. Gholamin, A. Mansouri, and M. R. Abbaszadegan, "Establishment and characterization of chemotherapy-enriched sphere-forming cells with stemness phenotypes as a new cell line (BAG50) of gastric carcinoma," *Med. Oncol.*, vol. 39, no. 12, pp. 1–9, 2022, doi: 10.1007/s12032-022-01742-8.
- [321] P. Li *et al.*, "Anti-IL-8 antibody activates myeloid cells and potentiates the anti-tumor activity of anti-PD-1 antibody in the humanized pancreatic cancer murine model," *Cancer Lett.*, vol. 539, no. May, p. 215722, 2022, doi: 10.1016/j.canlet.2022.215722.
- [322] I. Psallidas *et al.*, "Secreted phosphoprotein-1 directly provokes vascular leakage to foster malignant pleural effusion," *Oncogene*, vol. 32, no. 4, pp. 528–535, 2013, doi: 10.1038/onc.2012.57.
- [323] I. Giopanou *et al.*, "Osteopontin drives KRAS -mutant lung adenocarcinoma," *Carcinogenesis*, vol. 41, no. 8, pp. 1134–1144, 2020, doi: 10.1093/carcin/bgz190.
- [324] Y.-X. Li *et al.*, "ACLP promotes activation of cancer-associated fibroblasts and tumor metastasis via ACLP-PPAR γ -ACLP feedback loop in pancreatic cancer," *Cancer Lett.*, vol. 544, p. 215802, 2022, doi: 10.1016/j.canlet.2022.215802.
- [325] Q. Li *et al.*, "ZNF32 prevents the activation of cancer-associated fibroblasts through negative regulation of TGFB1 transcription in breast cancer," *FASEB J.*, vol. 37, no. 4, p. e22837, 2023, doi: 10.1096/fj.202201801R.
- [326] L. Desser, D. Holomanova, E. Zavadova, K. Pavelka, T. Mohr, and I. Herbagek, "Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGF- β levels in human blood," *Cancer Chemother. Pharmacol. Suppl.*, vol. 47, no. 7, pp. 10–15, 2001, doi: 10.1007/s002800170003.
- [327] S. Zhao *et al.*, "CD44 expression level and isoform contributes to pancreatic cancer cell plasticity, invasiveness, and response to therapy," *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, no. 22, pp. 5592–5604, 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-3115.
- [328] C. Chen *et al.*, "Gemcitabine resistance of pancreatic cancer cells is mediated by IGF1R dependent upregulation of CD44 expression and isoform switching," *Cell Death Dis.*, vol. 13, no. 8, pp. 1–13, 2022, doi: 10.1038/s41419-022-05103-1.
- [329] V. R. Silva, L. de S. Santos, R. B. Dias, C. A. Quadros, and D. P. Bezerra, "Emerging agents that target signaling pathways to eradicate colorectal cancer stem cells," *Cancer Commun.*, vol. 41, no. 12, pp. 1275–1313, 2021, doi: 10.1002/cac2.12235.
- [330] J. A. Ajani *et al.*, "YAP1 mediates gastric adenocarcinoma peritoneal metastases that are attenuated by YAP1 inhibition," *Gut*, vol. 70, no. 1, pp. 55–66, 2021, doi: 10.1136/gutjnl-2019-319748.

ARTÍCULOS

PRIMER ARTÍCULO

Hernández-Camarero P, Jiménez G, López-Ruiz E, Barungi S, Marchal JA, Perán M. Revisiting the Dynamic Cancer Stem Cell Model: Importance of Tumour Edges. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*. 2018, 131: 35–45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.08.004>
JCR (2018): 5.012
Hematology 14/73; Q1

1. Referencia (autores, título): Pablo Hernández-Camarero, Gema Jiménez, Elena López-Ruiz, Shivan Barungi, Juan Antonio Marchal, Macarena Perán. Revisiting the Dynamic Cancer Stem Cell Model: Importance of Tumour Edges.
2. Breve resumen:
La falta de un tratamiento eficaz contra el cáncer no se debe sólo a su enorme heterogeneidad, sino también al hecho de que aún no tenemos una respuesta a la pregunta sobre ¿cómo se origina el cáncer? Entre los modelos propuestos para explicar el desarrollo del cáncer, el modelo jerárquico ha sido ampliamente aceptado. Sin embargo, este modelo no logra explicar varias observaciones experimentales, como la ubicación de las células madre cancerosas (CSC) dentro de un tumor o la diferencias entre tumores primarios y metastásicos. Además, la creciente evidencia muestra que el fenotipo CSC no es un estado estable en el tiempo. Aquí, presentamos una revisión crítica sobre los supuestos modelos de desarrollo tumoral, haciendo hincapié en la relevancia de la naturaleza dinámica y cambiante del cáncer y la población de CSC en la que el microambiente tumoral juega un papel crucial. En este estudio proponemos un nuevo modelo de origen tumoral que podría tener un impacto en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.
3. Fecha de publicación: agosto de 2018
4. Estado: publicado
5. Tipo de publicación: Artículo científico/ Revista: *Critical Reviews in Oncology / Hematology*.
6. Categoría: Hematology
7. Ubicación: 14 de 73; Q1 JCR (2018): 5.012
8. Otros datos de interés: 2018, 131: 35–45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.08.004>

SEGUNDO ARTÍCULO

Hernández-Camarero P, López-Ruiz E, Griñán-Lisón C, García MÁ, Chocarro-Wrona C, Marchal JA, Kenyon J, Perán M. Pancreatic (pro)enzymes treatment suppresses
156

BXPC-3 pancreatic Cancer Stem Cell subpopulation and impairs tumour engrafting. Sci Rep. 2019 Aug 6;9(1):11359. doi: 10.1038/s41598-019-47837-7.
JCR (2019): 3.998
Multidisciplinary Sciences 17/71; Q1

1. Referencia (autores, título): Hernández-Camarero P, López-Ruiz E, Griñán-Lisón C, García MÁ, Chocarro-Wrona C, Marchal JA, Kenyon J, Perán M. Pancreatic (pro)enzymes treatment suppresses BXPC-3 pancreatic Cancer Stem Cell subpopulation and impairs tumour engrafting.
2. Breve resumen:
La subpoblación de células madre cancerosas (CSC) dentro del tumor es responsable de la metástasis y de la recurrencia tumoral. Aquí investigamos *in vitro* e *in vivo* los efectos de una mezcla de (pro)enzimas pancreáticas compuesta por quimotripsinógeno A y tripsinógeno (PRP) en células madre cancerígenas (CSC) derivadas de una línea celular de cáncer de páncreas humano, BxPC3. La exposición de las esferas de CSCs pancreáticas al PRP resultó en una disminución significativa de la señal de ALDEFLUOR y de marcadores específicos de CSC pancreáticas como son: CD 326, CD 44 y CxCR4, medidas por citometría de flujo. También se analizó la expresión de los marcadores de CSC mediante inmunofluorescencia y ensayos de western blotting. Además, demostramos que PRP también inhibe la formación de esferas primarias y secundarias de CSCs. Seguidamente, tres matrices de PCR RT2 Profiler se utilizaron para estudiar la regulación de la expresión de múltiples genes después del tratamiento con PRP y dieron como resultado, (i) una inhibición de la transición epitelial-mesenquimal (EMT); (ii) la supresión de genes relacionados con las CSCs; (iii) el aumento de la expresión de genes supresores de tumores; (iv) una disminución de la expresión de genes de migración y metástasis y (v) una modulación de la vía de Señalización de las MAP Quinasas. Por otra parte, se realizó un estudio mas detallado sobre el estado funcional de varias rutas moleculares características de las CSCs como la vía TGF β , WNT/ β -catenina, Hippo y Notch, lo cual mostró que el tratamiento con PRP promueve una inhibición de todas ellas. Finalmente, los estudios *in vivo* con xenoinjertos tumorales en ratones inmunodeprimidos demostraron una alta eficacia antitumoral de PRP contra los tumores inducidos por las CSC pancreáticas humanas. El tratamiento con PRP disminuyó el número de tumores en ratones inmunodeprimidos y redujo el tamaño de los tumores que sí se desarrollaron en los ratones tratado. La conclusión de este estudio es que el tratamiento con las (pro)enzimas pancreáticas es una estrategia valiosa para suprimir la población de CSCs en tumores pancreáticos sólidos.
3. Fecha de publicación: agosto de 2019
4. Estado: publicado
5. Tipo de publicación: Artículo científico/ Revista: Scientific Reports
6. Categoría: Multidisciplinary Sciences

7. Ubicación: 17/71; Q1 JCR (2019): 3.998
8. Otros datos de interés: 2019; 9(1):11359. doi: 10.1038/s41598-019-47837-7

TERCER ARTÍCULO

Hernández-Camarero P, López-Ruiz E, Marchal JA, Perán M. Cancer: a mirrored room between tumor bulk and tumor microenvironment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2021) 40:217. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02022-5>
JCR (2021) 12.658
Oncology 24/245; D1

1. Referencia (autores, título): Hernández-Camarero P, López-Ruiz E, Marchal JA, Perán M. Cancer: a mirrored room between tumor bulk and tumor microenvironment.
2. Breve resumen:
Está ampliamente documentado que el microambiente tumoral (TME) juega un papel clave en la promoción de quimioresistencia, en el apoyo de la progresión tumoral, la capacidad invasiva, la metástasis e incluso en el mantenimiento de las células madre cancerígenas (CSC). Aquí, revisamos la formación del TME presentándola como un reflejo de la propia organización de un tumor durante las diferentes etapas de desarrollo del tumor. Curiosamente, grupos funcionalmente diferentes de células estromales parecen tener distribuciones espaciales específicas dentro del TME que cambian a medida que el tumor evoluciona hacia una etapa avanzada de progresión, lo que se correlaciona con el hecho de que las CSC se encuentren principalmente en los bordes de las masas tumorales sólidas en las etapas de progresión avanzadas. También nos centramos en la retroalimentación continua que se establece entre un tumor y su entorno. La “conversación” entre las células de la masa tumoral y las células del estroma marca la evolución de ambos tipos de células interrelacionadas. Un ejemplo de ello podrían ser las transformaciones metabólicas y funcionales que experimentan las células estromales debido a la actividad tumoral. Además, también se abordan las bases moleculares de la diseminación metastásica, haciendo especial énfasis en la formación del nicho pre-metastásico en localizaciones específicas como reflejo de la firma molecular del tumor primario. Finalmente, se sugieren varios enfoques terapéuticos dirigidos al TME primario y al nicho pre-metastásico. Por ejemplo, un análisis sistemático del TME justo adyacente a la masa tumoral para establecer la proporción de miofibroblastos/fibroblastos inflamatorios asociados con el cáncer (mCAFs/iCAFs) O la implementación de terapias de "reeducación" que consisten en transformar células estromales que apoyan al tumor hacia células supresoras de tumores. En resumen, para mejorar nuestro manejo clínico del cáncer, es crucial entender y aprender cómo gestionar la estrecha interacción entre la masa tumoral primaria, el TME y la metástasis.
3. Fecha de publicación: agosto de 2021
4. Estado: publicado
5. Tipo de publicación: Artículo científico/ Revista: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*

6. Categoría: Oncology
7. Ubicación: 24/245; Q1; JCR(2021) 12.658
8. Otros datos de interés: (2021) 40:217. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02022->

CUARTO ARTÍCULO

Hernández-Camarero P, López-Ruiz E, Marchal JA, Perán M. Unifying Different Cancer Theories in a Unique Tumour Model: Chronic Inflammation and Deaminases as Meeting Points. *Int J Mol Sci.* 2022 Aug 5;23(15):8720. doi: 10.3390/ijms23158720. PMID: 35955853

JCR (2021) 6.208

Biochemistry & Molecular Biology 69/297; Q1

1. Referencia (autores, título): Hernández-Camarero P, López-Ruiz E, Marchal JA, Perán M. Unifying Different Cancer Theories in a Unique Tumour Model: Chronic Inflammation and Deaminases as Meeting Points.
2. Breve resumen:

El aumento en la incidencia del cáncer muestra que existe la necesidad de comprender mejor la heterogeneidad tumoral para desarrollar tratamientos eficientes. Curiosamente, hay varias características comunes a casi todos los tipos de cáncer, como por ejemplo la inducción de inflamación crónica o la alteración funcional de las deaminasas. Las deaminasas son una familia de enzimas con capacidad de edición de nucleótidos, que se clasifican en dos grupos principales: basadas en ADN y basadas en ARN. La estrecha relación entre la inflamación y la desregulación de estas moléculas ha sido ampliamente documentada, lo que puede explicar la peculiar heterogeneidad intra-tumoral, tanto a nivel de mutaciones en el ADN como a nivel transcripcional, de esta enfermedad. En efecto, la heterogeneidad en el cáncer dificulta establecer un modelo único de progresión tumoral. Actualmente, hay tres modelos principales de progresión del cáncer: estocástico, jerárquico y dinámico, aunque no hay consenso sobre cuál de ellos representa mejor la biología del cáncer porque generalmente se simplifican demasiado. Aquí, para explicar con precisión la progresión del tumor, proponemos interacciones entre la inflamación crónica, la desregulación de deaminasas, la heterogeneidad genética intra-tumoral, la plasticidad fenotípica del cáncer e incluso la aparición, previamente propuesta, de la población de CSCs en los bordes de las masas tumorales sólidas en etapas de progresión avanzadas (en lugar de ser las células de origen de las neoplasias malignas primarias). El nuevo modelo de desarrollo tumoral propuesto en este estudio no contradice los modelos previamente aceptados y puede abrir una ventana a enfoques terapéuticos interesantes.
3. Fecha de publicación: agosto de 2022
4. Estado: publicado
5. Tipo de publicación: Artículo científico/ Revista: *Int J Mol Sci.*
6. Categoría: Biochemistry & Molecular Biology
7. Ubicación: 69/297; Q1

8. Otros datos de interés: 2022 Aug 5;23(15):8720. doi: 10.3390/ijms23158720.
PMID: 35955853