



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Departamento de Fisiología

**EXPRESIÓN DE LA NICOTINAMIDA
N-METILTRANSFERASA (NNMT) EN EL
ESTROMA TUMORAL: IMPLICACIONES
TERAPÉUTICAS Y PRONÓSTICAS EN EL
CÁNCER PULMONAR**

Programa de Doctorado en Fisiología

Tesis Doctoral presentada por:

Cristina Carreres Rey

Dirigida por:

Dr. Javier Pereda Cervera

Dr. Julián Carretero Asunción

Dra. Lourdes Chuliá Peris

Julio 2024

D. Javier Pereda Cervera, Profesor Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València,

D. Julián Carretero Asunción, Profesor Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València,

Dña. Lourdes Chuliá Peris, investigadora postdoctoral del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València.

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada “EXPRESIÓN DE LA NICOTINAMIDA N-METILTRANSFERASA (NNMT) EN EL ESTROMA TUMORAL: IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS Y PRONÓSTICAS EN EL CÁNCER PULMONAR”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Cristina Carreres Rey, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 26 de julio del 2024.



Fdo. Javier Pereda Cervera



Fdo. Julián Carretero Asunción



Fdo. Lourdes Chuliá Peris

A LA MEUA FAMÍLIA

AGRADECIMIENTOS

Perquè les pàgines d'aquesta tesi han estat escrites tenint present a totes les persones que m'han recolzat durant els 5 anys. Perquè aquest camí llarg i dur m'ha fet veure que el cim de la muntanya moltes vegades no es troba on nosaltres pensem. No importa tant arribar sinó més bé intentar-ho. A tots, moltes gràcies.

En primer lloc, gràcies als meus directors per haver-me donat l'opunitat de conèixer de primera mà el món de la investigació, però per damunt de tot, gràcies per haver-me ajudat en els moments més difícils. Julián, gracias por aportar el espíritu crítico, entrega y cariño que tanto necesita la ciencia. Javi, per guiar-me i escoltar-me durant aquests anys. Lour, per ser el meu referent al laboratori, per ser un recolzament per a mi. Gràcies, gràcies, gràcies.

A mi Evi, por ser tan valiente y atreverse con todo. ¡Qué suerte la de trabajar con mis niñas bonitas! Gracias a todos los compis del Fisio: Salva Aparisi, Inés, María, Alicia, Xabeli, Iván, Sergio, Toni, Ángel, Salva Pérez, Salva Mena, Miguel, Eva Serna. A Xelo, per comprendre'm, cuidar-me i ajudar-me en tots els moments difícils, milions de gràcies! A la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión IIS La Fe. A Sonia, per tot el que m'has ensenyat i sempre haver confiat amb mi! Gracias a Elena, por toda tu inmensa ayuda en la etapa más difícil de la tesis. A mis chicas de Toxi: Luna y Mer, ¡qué bien encontrarnos, que bien terminar juntas y continuar con más noches de pizza y planes de futuro!

Mil gracias a toda la sección de cultivos y citometría del SCSIE por estar siempre disponibles a ayudarme en todo lo que necesitara. A Antonio, per fer les vesprades de cultius més divertides. Espere que quan ens tornem a trobar hages fet el teu propi museu d'instruments. A la unidad de Cirugía Torácica del

Hospital de La Ribera, en especial a José M. Galbis y al servicio de Patológica del Hospital Quirón. Gracias a Antonio Cremades, a Rosa Farràs y a Silvia Calabuig por siempre estar dispuestos a ayudarnos.

A les meues xiques: Merce, Maria Saus, Rita, Andrea, Raqui, Maria Navalón, Paula, Ana, Eva, Sara. Gràcies per sempre estar presents. Quin orgull veure el que hem aconseguit des dels 3 anys! A qui no m'ha deixat caure, a qui ha lluitat amb mi i per mi, a tu Alba. Em vaig quedar amb el millor de Farmàcia. Gràcies a Guille i a tu, per cuidar-nos i acollir-nos a Blai i a mi a casa vostra.

A tu Blai, qui m'ha donat les millors benvingudes a casa després dels dies llargs al laboratori. Sols tu podries fer aquest camí més fàcil. Gràcies per arribar en el moment més precís de la meua vida. Gràcies per construir un futur amb mi. T'estime més que tot. Gràcies a Toni, M^aÀngeles, Toni, Mireia i Aleix per fer-me sentir com a casa i donar-me sempre el vostre suport.

A Sandra, per ser sempre la força que em fa avançar. Les dos sabem com de dur ha sigut però també que la recompensa vindrà, segur que ho fa. Mare i Pare: Sandra i jo som el reflexe del vostre esforç, treball imparable i constància. Gràcies per confiar sempre amb mi amb tot allò que em propose. Gràcies als meus tios Raúl i M^a José, i als meus germans Guillem i Jaume. Vos vull moltíssim!!

Iaio, iaia, vosaltres heu construït els fonaments més forts que tota casa pot necessitar. Vosaltres sou la meua dignitat, vosaltres sou els meus valors. Gràcies per esperar-me tots els divendres amb els braços oberts amb un crit "ja està ací la reina de la casa". Però sobretot, gràcies per haver-nos criat als quatre com a germans. Iaio, per ser un Pare per a tots, continua cuidant de Guillem i cuideu tots dos de nosaltres fins tornar a trobar-nos. Aquesta tesi va per vosaltres. Vos estime.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN.....	XIII

I. INTRODUCCIÓN	1
1. EL CÁNCER	3
1.1. Fisiopatología del cáncer	5
1.2. El cáncer de pulmón.....	12
1.2.1. Epidemiología del cáncer de pulmón	12
1.2.2. Clasificación histológica del cáncer de pulmón	14
1.2.3. Estratificación clínica del cáncer de pulmón: clasificación TNM	16
1.2.4. Etiología del cáncer de pulmón	18
1.2.5. Manifestaciones y diagnóstico del cáncer de pulmón	19
1.3. Genética del cáncer de pulmón no microcítico	20
1.4. Tratamiento del cáncer de pulmón	25
1.4.1. Mutaciones en <i>EGFR</i> y los ITQs como tratamiento	31
2. MECANISMOS DE ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA A ITQs DE <i>EGFR</i>	33
2.1. Mecanismos de resistencia dependientes de <i>EGFR</i>	35
2.2. Mecanismos de resistencia independientes de <i>EGFR</i>	37
2.2.1. Mecanismos epigenéticos de resistencia CPNM.....	38
3. LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL	40
3.1. Inducción del programa EMT	42
3.2. Regulación transcripcional y plasticidad del programa EMT	45
4. COMPLEJIDAD DEL MICROAMBIENTE TUMORAL Y MECANISMOS DE RESISTENCIA ASOCIADOS.....	46
4.1. Composición y funciones.....	46
5. FIBROBLASTOS ASOCIADOS AL CÁNCER	55
5.1. Origen de los CAFs	55
5.2. Heterogeneidad de los CAFs.....	58
5.2.1. Activación de los CAFs	58
5.2.2. Heterogeneidad funcional de los CAFs	61
5.2.3. Subpoblaciones principales de CAFs.....	65
6. NICOTINAMIDA N-METILTRANSFERASA	68

6.1. Expresión y funciones de la NNMT	68
6.2 Regulación de la expresión de NNMT	71
6.3. Principales rutas metabólicas asociadas a la NNMT	71
6.3.1. Relación entre el metabolismo y la reprogramación epigenética	73
6.4. Principales rutas metabólicas asociadas a la NNMT	75
 II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	77
 III. MATERIAL Y MÉTODOS	81
1. MODELO EXPERIMENTAL Y MUESTRAS CLÍNICAS	83
2. CULTIVOS CELULARES	85
2.1. Aislamiento de fibroblastos primarios de pulmón humano y congelación	85
2.2. Caracterización del cultivo	87
3. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR	88
4. ESTUDIOS DE MIGRACIÓN CELULAR. <i>SCRATCH ASSAY</i>	88
5. GEL CONTRACCIÓN DE COLÁGENO	89
6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TGFB1	90
7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i> ..	92
7.1. Extracción y determinación de la concentración de proteínas	92
7.2. Electroforesis y Transferencia	93
7.3. Inmunodetección	95
8. AISLAMIENTO DE ARN Y RT-qPCR	96
8.1. Extracción ARN	97
8.2. Retrotranscripción	98
8.3. Diseño, preparación y optimización de <i>primers</i>	99
8.4. PCR cuantitativa. Reacción en cadena de la polimerasa	102
9. INMUNOFLUORESCENCIA	103
10. ESTUDIO DE TRANSDUCCIÓN GÉNICA CON CONSTRUCCIONES LENTIVIRALES	106
10.1. Producción de partículas virales	107
10.2. TRANSDUCCIÓN VIRAL O INFECCIÓN DE LAS CÉLULAS DIANA	108
11. HISTOLOGÍA: TINCIONES E INMUNOHISTOQUÍMICA	109
11.1. Tinción de Hematoxilina/Eosina	109

11.2. Tinción del tricrómico de Masson	110
11.3. Inmunohistoquímica. Tinción con DAB	112
12. COCULTIVOS BIDIMENSIONALES Y TRIDIMENSIONALES	113
12.1. Cocultivo bidimensional.....	113
12.1.1. Estudio de la citotoxicidad celular: Método sulforodamina B.....	113
12.1.2. Análisis de la apoptosis celular por citometría de flujo.....	114
12.2. Cocultivo tridimensional.....	116
12.2.1. Técnica para la formación de esferas	116
12.2.2. Caracterización del modelo tridimensional.....	117
12.2.3. Medida de la viabilidad celular mediante ensayo de luminiscencia	119
12.2.4. Estudio de la resistencia tumoral a través de medios condicionados	120
12.2.5 Estudio de secreción de múltiples citoquinas	121
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y ELABORACIÓN DE FIGURAS	122
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	123
1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS CAFs Y FNs AISLADOS DE BIOPSIAS DE CPNM	125
1.1. Proliferación y cierre de herida <i>in vitro</i> en FNs y CAFs.....	127
1.2. Capacidad contráctil y secreción de colágeno	130
1.3 Secreción de TGFB1 en los cultivos primarios de CAFs y FNs	133
2. NNMT COMO MARCADOR DE LOS CAFs.....	136
3. LA NNMT DEL ESTROMA TUMORAL COMO BIOMARCADOR DE PRONÓSTICO EN EL CPNM.....	144
4. IMPACTO FUNCIONAL DE LA MODULACIÓN DE NNMT EN LOS CAFs DEL ESTROMA ASOCIADO AL CPNM	151
4.1. NNMT modula el fenotipo miofibroblasto en los CAFs de CPNM	152
4.2. NNMT modula la funcionalidad de los CAFs de CPNM	158
5. PAPEL DE LA NNMT ESTROMAL EN LA RESISTENCIA ADQUIRIDA A LOS ITQs DE EGFR.....	164
5.1. Caracterización del cocultivo bidimensional.....	164
5.1.1 Sensibilidad tumoral a los ITQs de EGFR.....	164
5.1.2 Expresión de marcadores EMT en el cocultivo bidimensional ..	168
5.1.3 Secreción de TGFB1 en los cultivos bidimensionales.....	170
5.2. Caracterización del cocultivo tridimensional	172

5.2.1. Estudio morfológico de las esferas.....	172
5.2.2. Expresión de marcadores EMT en el cocultivo tridimensional .	178
5.3. Análisis de la sensibilidad a los ITQs de EGFR en los cultivos 3D	185
5.3.1 Papel de los factores solubles liberados por los CAFs en la resistencia a los ITQs de EGFR.....	189
5.3.2. Secreción de TGFB1 en los cultivos tridimensionales	191
5.3.3. Identificación de otros factores solubles liberados por los CAFs implicados en la resistencia a ITQs de EGFR	193
V. CONCLUSIONES.....	203
VI. BIBLIOGRAFÍA	207
VII. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	267

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sellos distintivos del cáncer	6
Figura 2: Tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo	12
Figura 3: Estimación de la incidencia mundial de cáncer pulmonar en ambos sexos	13
Figura 4: Representación gráfica de los distintos tipos y subtipos histológicos de cáncer de pulmón	14
Figura 5: De la clasificación histológica del CPNM a la molecular.....	22
Figura 6: Vías de señalización de EGFR	23
Figura 7: Avances en la terapia de CPNM.....	28
Figura 8: Frecuencia de mutaciones de <i>EGFR</i> en CPNM	32
Figura 9: Mutaciones del gen <i>EGFR</i> y la respuesta a los ITQ	33
Figura 10: Mecanismos de resistencia a los EGFR-ITQs dependientes e independientes del <i>EGFR</i>	34
Figura 11: Comunicación entre las vías de señalización de MET y EGFR	37
Figura 12: Cambios celulares asociados a la EMT y EAT	40
Figura 13: Principales inductores del programa EMT	42
Figura 14: Vía de señalización del TGF- β en la EMT	44
Figura 15: Cambios en el MAT asociados a la resistencia tumoral	48
Figura 16: La progresión tumoral provoca cambios en la MEC a diferentes niveles	51
Figura 17: Origen de los CAFs. El origen de los CAFs es diverso y complejo	58
Figura 18: Activación de los CAFs por múltiples mecanismos	60
Figura 19: Heterogeneidad funcional de los CAFs en la progresión del cáncer ..	62
Figura 20: Principales subpoblaciones de CAFs.....	66
Figura 21: Resumen de los efectos celulares pro-oncogénicos de la NNMT.....	70
Figura 22: Principales rutas metabólicas en las que está implicada la NNMT	72
Figura 23: Imágenes de la morfología de las líneas celulares empleadas.....	84
Figura 24: Inmunofluorescencia de marcadores FMT y epiteliales en FNs y CAFs	87
Figura 25: Tipos de muerte celular en función de los marcajes con Anexina V-FITC y DAPI.	115
Figura 26: Representación esquemática de la formación de esferas a través de la técnica <i>hanging drop</i>	117
Figura 27: Reacción de la luciferasa utilizada en la medida de viabilidad celular	119
Figura 28: Crecimiento celular en las poblaciones de FNs y CAFs	128
Figura 29: Ensayo de cierre de herida por FNs y CAFs en presencia de mitomicina C a 0, 24 y 48 horas	129
Figura 30: Contracción de colágeno de FNs y CAFs.	131
Figura 31: Niveles de <i>COL 1A1</i> extracelular en los FNs y CAFs tratados con TGFB1. RT-PCR.	132

Figura 32: Secreción de TGFB1 en los FNs y CAFs. Concentración de TGFB1 medido por ELISA en los sobrenadantes de los cultivos tras 48 horas	134
Figura 33: Inducción de la FMT y NNMT en los FNs y CAFs incubados con y sin TGFB1. <i>Western blotting</i>	138
Figura 34: Inducción de la FMT en los FNs y CAFs tratados con y sin TGFB1. RT-PCR. Las células fueron tratadas con y sin TGFB1 (5 ng/ml).....	139
Figura 35: Inmunofluorescencia representativa de la expresión de α -SMA y NNMT en cultivos FNs y CAFs tras ser incubados en presencia o ausencia de TGFB1	141
Figura 36: Porcentaje de coexpresión entre α -SMA y NNMT en cultivos FNs y CAFs tras ser incubados en presencia o ausencia de TGFB1 mediante inmunofluorescencia.....	142
Figura 37: Análisis inmunohistoquímico de Hematoxilina/Eosina, Tricrómico de Masson y tinciones de α -SMA y NNMT en cortes pulmonares procedentes de pacientes con CPNM	146
Figura 38: Estudio de la correlación entre el tiempo libre de progresión y supervivencia global de los pacientes con CPNM, el estroma tumoral y la NNMT	149
Figura 39: Silenciamiento de la NNMT en CAFs de CPNM tras la modulación génica mediante infección lentiviral de partículas shARN.....	152
Figura 40: Expresión génica de los marcadores fibróticos en CAFs de CPNM con diferentes niveles de NNMT y en respuesta al TGFB1	153
Figura 41: Niveles proteicos de los marcadores fibróticos en CAFs de CPNM con diferentes niveles de NNMT y en respuesta al TGFB1	154
Figura 42: Expresión de los marcadores EMT en los CAFs de CPNM tras la modulación de la expresión génica de la NNMT silenciada medido por RT-PCR	156
Figura 43: Localización y niveles de expresión de α -SMA y NNMT en cultivos de fibroblastos shNT y shNNMT en respuesta al TGFB1.	157
Figura 44: Crecimiento celular en las poblaciones de shNT y shNNMT	158
Figura 45: Ensayo de cierre de herida por fibroblastos shNT y shNNMT en presencia de mitomicina C a 0, 24 y 48 horas	159
Figura 46: Contracción de colágeno de CAFs shNT y shNNMT	160
Figura 47: Secreción de TGFB1 en los CAFs shNT y CAFs shNNMT	161
Figura 48: Análisis de la muerte celular inducida por el osimertinib en cocultivos bidimensionales de HCC4006, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT	166
Figura 49: Expresión de <i>NNMT</i> y marcadores EMT en los cultivos bidimensionales de HCC4006, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT	169
Figura 50: Secreción de TGFB1 en el monocultivo de HCC4006 y cocultivo de HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT	171
Figura 51: Caracterización de los cultivos tridimensionales de HCC4006, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT	174

Figura 52: Análisis del tamaño, número de células y distancia intercelular en el cultivo tridimensional de HCC4006, HCC4006/CAFshNT, HCC4006/CAFshNNMT	177
Figura 53: Localización y niveles de CDH1 en los cultivos tridimensionales de HCC4006, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT	179
Figura 54: Localización y niveles de expresión de VIM en los cultivos tridimensionales de HCC4006, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT	181
Figura 55: Expresión de marcadores EMT en los cultivos tridimensionales de HCC4006, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT	183
Figura 56: Estudio de la viabilidad celular en respuesta al osimertinib de los cultivos tridimensionales de HCC4006, CAFs, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT	185
Figura 57: Evaluación de la apoptosis del cultivo tridimensional de HCC4006, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT en respuesta al tratamiento con osimertinib.	187
Figura 58: Viabilidad celular en respuesta al osimertinib en homoesferas de HCC4006 tratadas con medios condicionados (MC)	190
Figura 59: Niveles de secreción de TGFB1 en las esferas de HCC4006, HCC4006/CAFshNT, HCC4006/CAFshNNMT, CAFs shNT y CAFs shNNMT ..	192
Figura 60: Viabilidad celular en respuesta al osimertinib y al TGFB1 en las heteroesferas de HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT	193
Figura 61: Análisis de los niveles de 41 citoquinas y factores de crecimiento en los medios condicionados de las heteroesferas HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT	194
Figura 62: Concentraciones de HGF en los medios de cultivo tridimensionales de HCC4006, CAFs shNT, CAFs shNNMT, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT	198
 Figura S 1: Análisis inmunohistoquímico de Hematoxilina/Eosina, Tricrómico de Masson y tinciones de α -SMA y NNMT en cortes pulmonares procedentes de 27 pacientes con CPNM.	271

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación TNM del cáncer de pulmón	16
Tabla 2: Resumen de los componentes de la MEC	50
Tabla 3: Composición de geles electroforesis SDS-PAGE	94
Tabla 4: Anticuerpos primarios empleados en la detección de proteínas en <i>Western blot</i>	95
Tabla 5: Anticuerpos secundarios empleados en la detección de proteínas en <i>Western blot</i>	96
Tabla 6: Lista de reactivos y volúmenes para la retrotranscripción.	98
Tabla 7: Secuencias de los <i>primers</i> utilizados en la RT-PCR.....	101
Tabla 8: Lista de los reactivos empleados en la PCR cuantitativa.	102
Tabla 9: Lista de anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia	105
Tabla 10: Lista de anticuerpos secundarios empleados en inmunofluorescencia.....	105
Tabla 11: Reactivos empleados para la formación de partículas lentivirales	107
Tabla 12: Soluciones de trabajo en la tinción de Masson.....	111
Tabla 13: Lista de anticuerpos empleados en la tinción DAB.....	112
Tabla 14: Lista de anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia	118
Tabla 15: Lista de anticuerpos secundarios empleados en inmunofluorescencia.....	118
Tabla 16: Tabla resumen de las citoquinas analizadas mediante un <i>array</i> de anticuerpos.....	121
Tabla 17: Datos demográficos de los pacientes con AC pulmonar estudiados por inmunohistoquímica.....	144

ABREVIATURAS

α -SMA	α -actina del músculo liso (del inglés <i>α-Smooth Muscle Actin</i>)
1-MNA	1-Metil nicotinamida
AC	Adenocarcinoma
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AKT	Proteína quinasa B
ALK	Quinasa del linfoma anaplástico (del inglés <i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>)
apCAF	Fibroblasto asociado al cáncer presentador de antígeno
APOBEC	Apolipoproteína B
APS	Persulfato amónico (del inglés <i>Ammonium persulfate</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATCC	del inglés <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosín trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico (del inglés <i>Bicinchoninic acid</i>)
BMP	Proteína morfogenética ósea (del inglés <i>Bone Morphogenic Proteins</i>)
BRAF	B-Raf Proto-Oncogén, Serina/Treonina Quinasa
BSA	Albúmina del suero bovino (del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAF	Fibroblasto asociado al cáncer (del inglés <i>Cancer associated fibroblast</i>)
CCE	Carcinoma de células escamosas o epidermoide
CCG	Carcinoma de células grandes
CCL2	Proteína quimiotáctica de monocitos
CDH1	E-Cadherina
CDH2	N-Cadherina

COL1A1	Colágeno tipo I
CPM	Cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico
CPNM	Cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico
CSC	Célula madre cancerosa (del inglés <i>Cancer stem cell</i>)
CSF-1	Factor estimulante de colonias Macrófagos (del inglés <i>Colony Stimulating Factor 1</i>)
CTLA-4	Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (del inglés <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>)
CXCL	Quimioquina
CXCR	Receptor de quimioquina (del inglés <i>Interleukin Receptor</i>)
DAB	Diamiobenzidina
DAPI	Diamidinofenilindol (del inglés <i>Diamidinophenylindole</i>)
DMEM	Del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPBS	Del inglés <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
EAT	Transición epitelio ameboides
EDTA	Etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico (del inglés <i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epitelial
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (del inglés <i>Enzyme-Linked Immunosorbent assay</i>)
EML4	Proteína 4 asociada a microtúbulos de equinodermo (del inglés <i>Echinoderm microtubule associated protein-like 4</i>)
EMT	Transición epitelio-mesenquimal (del inglés <i>Epithelial to Mesenchymal Transition</i>)
EndMT	Transición endotelio-mesenquimal (del inglés <i>Endothelial to Mesenchymal Transition</i>)
EPOC	Enfermedades obstructivas crónicas
FAK	Quinasa de adhesión focal (del inglés <i>Focal adhesion kinase</i>)

FAP	Proteína de activación de fibroblastos (del inglés <i>Fibroblast Activation Protein</i>)
FDA	del inglés <i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés <i>Fibroblast Growth Factor</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (del inglés <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
FMT	Transición del fibroblasto al miofibroblasto (del inglés <i>Fibroblast to Myofibroblast Transition</i>)
FN	Fibroblasto normal
FN1	Fibronectina
FSP1	Proteína específica de fibroblastos 1 (del inglés <i>Fibroblast-Specific Protein 1</i>)
FT	Factores de transcripción
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HGF	Factor de crecimiento de los hepatocitos (del inglés <i>Hepatocyte growth factor</i>)
HIF1 α	Factor inducible por la hipoxia (del inglés <i>Hypoxia Inducible Factor</i>)
HNF1 β	Factor nuclear hepático-1beta (del inglés <i>Hepatocyte Nuclear Factor-1 beta</i>)
HRP	Peroxidasa del rábano picante (del inglés <i>Horseradish Peroxidase</i>)
HSC	Célula madre hematopoyética (del inglés <i>Hematopoietic stem cells</i>)
iCAF	Fibroblasto asociado al cáncer con fenotipo inflamatorio
iCAF	Fibroblasto asociado al cáncer con características inflamatorias
ICGC	Consorcio Internacional del Genoma del Cáncer (del inglés <i>International Cancer Genome Consortium</i>)
IFN γ	Interferón γ

IGF1	Factor de crecimiento de insulina (del inglés <i>insulin like growth factor I</i>)
IL1	Interleuquina 1
IL10	Interleuquina 10
IL6	Interleuquina 6
ITQ	Inhibidores de tirosina quinasa
JAK	Quinasa Jano (del inglés <i>Janus Kinase</i>)
KRAS	Homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata kirsten (del inglés <i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>)
LOX	Lisil oxidasa
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>)
MAT	Microambiente tumoral
MC	Medio condicionado
mCAF	Fibroblasto asociado al cáncer de matriz
MCP1	Proteína quimiotáctica de monocitos (del inglés <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>)
MDSC	Células mieloides supresoras (del inglés <i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i>)
MEC	Matriz extracelular
MET	Transición mesénquima-epitelio (del inglés <i>Mesenchymal to Epithelial Transition</i>)
MET	Receptor del HGF
mioCAF	Fibroblasto asociado al cáncer con fenotipo miofibroblasto
MMP	Metaloproteinasa de la matriz
MSC	Células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (del inglés <i>Mesenchymal stem cells</i>)
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero (del inglés <i>mammalian Target Of Rapamycin</i>)
NAM	Nicotinamida

NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B (del inglés <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NK	Célula asesina natural (del inglés <i>Natural Killer cell</i>)
NNMT	Nicotinamida N-metiltransferasa
PARPs	oli-ADP-ribosiltransferasa
PBS	Tampón fosfato-salino (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PD-1	Proteína 1 de la muerte celular programada (del inglés <i>Programmed cell Death protein 1</i>)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>)
PD-L1	Ligando 1 de la muerte celular programada 1 (del inglés <i>Programmed cell Death 1 Ligand 1</i>)
PFA	Paraformaldeído
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosoinositol-3 quinasa (del inglés <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>)
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
PPAR γ	Receptor activado por proliferadores peroxisomales
PTCH1	del inglés <i>Patched-1</i>
PTEN	del inglés <i>phosphatase and tensin homolog</i>
RAF	del inglés <i>proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
RAS	Oncogén viral del sarcoma de rata (del inglés <i>Rat Sarcoma</i>)
RB	Proteína asociada al retinoblastoma
ROS	ROS Protooncogén 1, Receptor Tirosina Quinasa
RTK	Rector de tirosina quinasa (del inglés <i>Receptor Tyrosine Kinases</i>)
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (del inglés <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>)
SAH	S-adenosil homocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SBF	Suero bovino fetal

ABREVIATURAS

SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sodio (del inglés <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SG	Supervivencia global
SLP	Supervivencia libre de progresión
SMAD	Proteína de la mosca homóloga a la proteína morfogénica ósea humana (del inglés <i>Mothers Against Decapaplegic homolog</i>)
SNAIL	Del inglés <i>Zinc finger protein</i>
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (del inglés <i>Single nucleotide polymorphisms</i>)
STAT3	Transductor de la señal y activador de la transcripción (del inglés <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>)
TAM	Macrófagos asociados a tumores (del inglés <i>Tumor Macrophages Associated</i>)
TBS-tween	Tampón Trizma Salino-Tween 20
TEMED	Tetrametiletildiamina
TGFB1	Factor de crecimiento transformante beta 1 (del inglés <i>Transforming Growth Factor beta 1</i>)
TIMP	Inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz (del inglés <i>Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases</i>)
TSP1	Trombospondina-1
TWIST	Proteína relacionada con la torsión (del inglés <i>Twist-related protein</i>)
ULA	Ultra baja adherencia (del inglés <i>Ultra Low attachment</i>)
vCAF	Fibroblasto asociado al cáncer vascular
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VIM	Vimentina
Wnt	Miembro 1 de la familia Wnt
ZEB	Del inglés <i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox</i>

RESUMEN

El carcinoma pulmonar es la principal causa de muerte relacionada con el cáncer debido a su alta prevalencia y mal pronóstico, siendo el cáncer pulmonar no microcítico (CPNM) la histología más prevalente. Los últimos avances en el diseño de terapias dirigidas han proporcionado un beneficio clínico significativo para pacientes cuyos tumores presentan mutaciones activadoras en oncogenes como *EGFR*, *ROS1* o *ALK*. Actualmente, los pacientes de CPNM con mutaciones en *EGFR* son tratados con inhibidores de tirosina quinasa (ITQs) los cuales han demostrado una gran eficacia clínica. Sin embargo, los pacientes recaen debido a la aparición de resistencias inevitablemente a través de múltiples mecanismos moleculares que no solo afectan a las células tumorales. De hecho, el estudio del microambiente tumoral (MAT) ha cobrado especial relevancia en los últimos años. El MAT está compuesto por una gran variedad de células no tumorales (como los fibroblastos asociados al cáncer, CAFs) y proporciona un entorno favorable para la progresión tumoral, la metástasis y la regulación del metabolismo. La NNMT (Nicotinamida N-metiltransferasa) se ha identificado como un factor metabólico que modula la transición epitelio-mesenquimal (EMT) en células tumorales y el fenotipo CAF en el MAT del cáncer ovárico. Con estos antecedentes, postulamos que la NNMT del estroma podría modular el fenotipo miofibroblasto de los CAFs del estroma del CPNM, y mediar la resistencia adquirida a los ITQs de EGFR.

El análisis de cultivos primarios de muestras pareadas de fibroblastos normales (FNs) y CAFs aislados de pacientes de CPNM demostró que los CAFs presentan una menor capacidad proliferativa, migratoria y mayor contractibilidad, secreción de componentes de la matriz extracelular y de TGFB1, características propias del fenotipo miofibroblasto. Además, los CAFs sobreexpresan NNMT y algunos marcadores fibróticos y de la EMT,

observándose una coexpresión entre α -SMA y NNMT. El análisis inmunohistoquímico de las biopsias quirúrgicas demostró una correlación entre los niveles de NNMT en los CAFs, el volumen de tumor ocupado por el estroma y un peor pronóstico de los pacientes. Además, la represión de NNMT en los CAFs con técnicas de silenciamiento génico revirtió parcialmente el fenotipo miofibroblasto. Por otro lado, el cocultivo bidimensional y tridimensional de células tumorales con CAFs incrementó la resistencia a los ITQs de EGFR. En este último, la inhibición de la NNMT estromal aumentó la sensibilidad a estos inhibidores, además de mitigar el fenotipo EMT. Finalmente, identificamos el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) como un importante mediador en la resistencia adquirida a ITQs de EGFR dependiente de la actividad NNMT estromal. En conclusión, nuestros resultados indican que la NNMT juega un papel relevante en la actividad protumoral de los CAFs de CPNM, la evolución clínica de los pacientes y la resistencia a los ITQs de EGFR.

I. INTRODUCCIÓN

1. EL CÁNCER

El cáncer es un conjunto de enfermedades en el que las células de un tejido específico no responden adecuadamente a las señales de regulación de diferenciación, supervivencia, proliferación y muerte celulares, de forma que se produce un crecimiento anormal y descontrolado. Cuando se trata de tumores malignos, las células cancerosas pueden invadir tejidos adyacentes o incluso metastatizar a tejidos lejanos a través de la circulación linfática o sanguínea (Cooper, 2000).

La forma más común de clasificar el cáncer atiende al tipo de célula de origen y sus características histológicas. Los carcinomas esporádicos son el tipo de cáncer más frecuente y se originan a partir de las células epiteliales. Cuando el carcinoma afecta al tejido glandular que reviste ciertos órganos, se denomina adenocarcinoma (AC) y si el tumor afecta a los tejidos que revisten órganos, se denomina carcinoma de células escamosas o epidermoide. Los sarcomas son el tipo de cáncer del tejido conectivo o conjuntivo, como son los huesos o cartílagos. Leucemias, mielomas y linfomas, también conocidos como cánceres hematológicos, se originan a partir de células sanguíneas (Cooper, 2000; Robert A. Weinberg, 2014).

Actualmente definimos el cáncer como una enfermedad genética, causada por mutaciones en genes que controlan el funcionamiento celular. Estos genes codifican proteínas que modulan la división y el crecimiento celular, y por ello, permiten evadir los mecanismos homeostáticos tisulares (Stratton *et al.*, 2009). Las mutaciones pueden deberse a errores que se producen al dividirse las células, a la exposición a agentes mutagénicos presentes en el medio ambiente, o bien, a factores hereditarios (Basu, 2018;

Kumari *et al.*, 2022). En situaciones fisiológicas, el organismo elimina las células con alteraciones en el ADN antes de que se vuelvan malignas. Sin embargo, dicha capacidad disminuye con el paso de los años contribuyendo a la carcinogénesis (López-Otín *et al.*, 2013; Tyner *et al.*, 2002).

El cáncer es una enfermedad heterogénea tanto intra- como interindividualmente. A medida que este avanza, se producen cambios adicionales, incluso dentro de un mismo tumor, que incrementan la heterogeneidad genética intratumoral. Las alteraciones genéticas que contribuyen al cáncer suelen afectar a tres tipos principales de genes: protooncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del ADN en un entorno epigenético permisivo (Vogelstein & Kinzler, 2004). En condiciones fisiológicas, los protooncogenes intervienen en el crecimiento y la división celular, pero de manera negativa. Cuando estos genes sufren mutaciones, pueden convertirse en genes causantes de cáncer, también llamados oncogenes. Por otro lado, los genes supresores de tumores también intervienen en el control del crecimiento y la división celular. La inactivación de estos genes desencadena divisiones celulares descontroladas que impulsan la carcinogénesis (Tran *et al.*, 2008). En el caso de las mutaciones inactivadoras en los genes reparadores del ADN, las células tienden a desarrollar inestabilidad genética y cambios en sus cromosomas, como duplicaciones y deleciones (Hahn & Weinberg, 2002). Esta alta capacidad mutacional puede proporcionar características ventajosas que favorecen la progresión del cáncer al desarrollar muy diversas características patológicas (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.1. Fisiopatología del cáncer

Hace ya más de dos décadas, Hanahan y Weinberg, y con actualizaciones en 2011 y 2022, propusieron un conjunto de rasgos funcionales que permitían a las células evolucionar paulatinamente a un estado neoplásico, adquiriendo capacidades tumorigénicas y finalmente, malignas y metastásicas, lo cual proporciona una autonomía frente a señales externas (Figura 1) (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011). Aunque todos los cánceres pueden caracterizarse por la adquisición de estas propiedades distintivas, los medios por los que se adquieren son diversos. Asimismo, determinados cambios genéticos pueden conferir simultáneamente más de una capacidad a una célula cancerosa, lo que contribuye a la heterogeneidad de esta enfermedad (Brennan *et al.*, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011). Además, las células tumorales interaccionan con otros tipos celulares de su entorno, aparentemente normales, lo cual favorece la adquisición de rasgos distintivos para dar lugar al denominado microambiente tumoral (MAT). En los últimos años se ha consolidado la idea de que la biología de los tumores requiere abordar cada uno de los componentes que forman parte del MAT (Hanahan & Weinberg, 2011). De este modo, las células del estroma asociado al tumor participan activamente en la tumorigénesis, contribuyendo a la adquisición de dichos sellos o características distintivas, lo cual constituye el eje central de este trabajo.

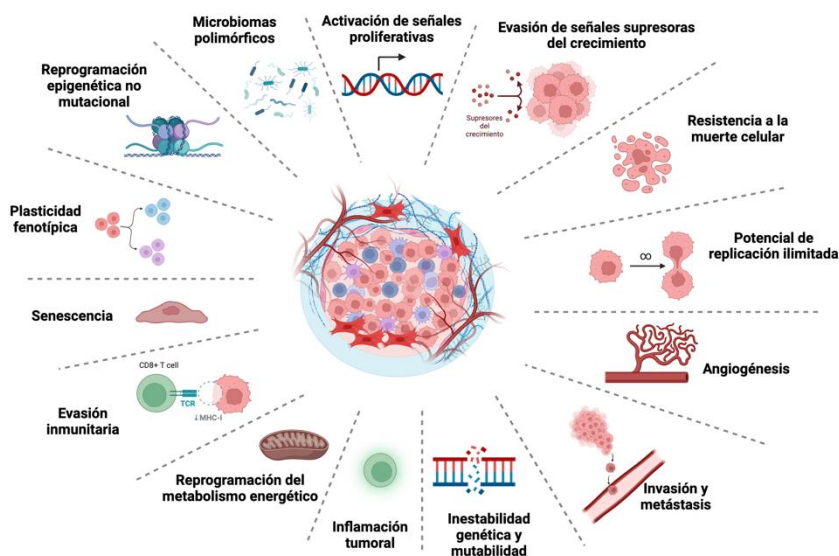


Figura 1: Sellos distintivos del cáncer. Adaptado de (Hanahan, 2022).

A continuación, se describirán brevemente algunos de los sellos distintivos adquiridos por las células tumorales.

- a) **Activación de señales proliferativas.** Las células de tejidos normales controlan las señales que promueven el crecimiento y la división celular. De este modo se consigue la homeostasis, manteniendo la arquitectura y función normal del tejido. Sin embargo, en las células tumorales, se produce una desregulación de dichas señales, normalmente controladas por factores de crecimiento que se unen a receptores de la superficie celular con dominios de tirosina quinasa intracelulares. Las células tumorales pueden mantener las señales proliferativas a través de mutaciones en los receptores de ligandos del factor de crecimiento, la estimulación de forma autocrina, o bien, paracrina, enviando señales para estimular a células del estroma asociado al tumor que, a su vez,

interaccionan con las células tumorales mediante factores de crecimiento (Bhowmick *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2008).

- b) **Evasión de señales supresoras del crecimiento.** Este proceso lo regulan principalmente genes supresores de tumores. Los dos supresores tumorales más frecuentemente inactivos son el gen *RB1* (codifica para la proteína asociada al retinoblastoma (RB)) (Burkhart & Sage, 2008) y el gen *TP53* (Greenblatt *et al.*, 1994). La RB transduce señales inhibitoras del crecimiento que se originan mayoritariamente fuera de la célula. Aquellas células con defectos en la vía RB sufren una proliferación celular persistente. Por otro lado, la *TP53*, o también llamado “guardián del genoma”, se encarga de recibir señales de estrés y anormalidad intracelular. Actúa como sensor de daño en el genoma o en las señales promotoras del crecimiento, pudiendo detener la progresión del ciclo celular (Sherr & McCormick, 2002).
- c) **Resistencia a la muerte celular.** La apoptosis o muerte programada es un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas genéticamente o desconocidas. Sin embargo, este papel protector frente a posibles enfermedades se atenúa en aquellos tumores que consiguen progresar hasta la malignidad y resistencia a la terapia (Adams & Cory, 2007; Lowe *et al.*, 2004). Una de las formas más comunes de evadir la muerte celular se basa en la pérdida del gen supresor tumoral *TP53* (Junttila & Evan, 2009). Por otra parte, los tumores también pueden aumentar la expresión de reguladores antiapoptóticos (*BCL2*, *BCL-XL*) o señales de supervivencia (*IGF1/2*) disminuyendo factores proapoptóticos (*BAX*, *PUMA*, *BIM*).

- d) **Potencial de replicación ilimitada.** Las células que forman parte de los tejidos normales tienen un número limitado de ciclos de crecimiento y división celular. De forma normal, los telómeros se acortan progresivamente hasta perder la capacidad de protección de los extremos del ADN cromosómico, llegando finalmente a constituir una amenaza para la viabilidad celular. Sin embargo, como se evidencia en múltiples trabajos, las células pueden presentar un potencial de replicación ilimitada por la protección de los extremos de los cromosomas por los telómeros. Esto es debido a la telomerasa, la enzima encargada de agregar fragmentos repetidos de ADN a los telómeros (Blasco, 2005; Shay & Wright, 2000). De este modo, al extender el ADN telomérico, se estaría fomentando la resistencia a la senescencia y la apoptosis (Raynaud *et al.*, 2010).
- e) **Angiogénesis.** Los tumores, al igual que los tejidos normales, requieren de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de poder eliminar desechos metabólicos y dióxido de carbono. Durante la progresión tumoral, la activación de la angiogénesis promueve la neovascularización para satisfacer las necesidades tumorales (Hanahan & Folkman, 1996). Se han descrito proteínas de señalización que se unen a receptores de superficie como reguladores angiogénicos, destacando el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como estimulador del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y la trombospondina-1 (TSP-1), que favorece señales supresoras para contrarrestar los estímulos proangiogénicos (Baeriswyl & Christofori, 2009; Bergers & Benjamin, 2003).
- f) **Invasión y metástasis.** La adquisición de características fenotípicas de las células tumorales puede favorecer la progresión de los tumores al promover la invasión local y metástasis. Se destaca el cambio en la morfología, en la adhesión a otras células y a la matriz extracelular (MEC).

La disminución de la capacidad de adhesión viene dada mayoritariamente por la pérdida de E-Cadherina (CDH1) y un incremento de N-Cadherina (CDH2) u otras moléculas que se relacionan con la migración durante la embriogénesis o inflamación (Cavallaro & Christofori, 2004). Estos cambios fenotípicos permiten un escenario idóneo para la invasión local seguida de una intravasación en los vasos sanguíneos y linfáticos cercanos para llegar a tejidos distantes, formación de pequeños nódulos de células tumorales y, en última instancia, el crecimiento hasta convertirse en tumores macroscópicos (Fidler, 2003; Talmadge & Fidler, 2010).

g) Inestabilidad genética y mutabilidad. Los sellos distintivos anteriormente explicados dependen en gran medida de variaciones en los genomas de las células neoplásicas, o bien, en cambios no mutacionales que afectan a la regulación de la expresión génica (Berdasco & Esteller, 2010; Esteller, 2007; P. A. Jones & Baylin, 2007). Estos cambios favorecen la progresión tumoral al acelerar la acumulación de genotipos favorables (Artandi & DePinho, 2010). Los fallos en los “guardianes del genoma”, como consecuencia a una mayor sensibilidad a los agentes mutagénicos, desencadenan una mayor tasa de mutación en las células tumorales (Ciccia & Elledge, 2010; Friedberg *et al.*, 2006; Harper & Elledge, 2007; Lane, 1992; Negrini *et al.*, 2010). Además, la telomerasa también actúa como un cuidador responsable del mantenimiento de la integridad del genoma. La pérdida de ADN telomérico en muchos tumores puede generar inestabilidad, amplificación y delección de segmentos cromosómicos (Artandi & DePinho, 2010).

h) Inflamación tumoral. Las células inmunitarias se encuentran presentes en la gran mayoría de las lesiones neoplásicas (Flier *et al.*, 1986). Aunque en

un primer momento se pensó que la principal función de las infiltraciones era erradicar los tumores, a principios del siglo XXI se empezaron a asignar funciones tumorigénicas. De este modo, la inflamación puede contribuir a la adquisición de características distintivas a través de factores de crecimiento, factores proangiogénicos, enzimas modificadoras de la matriz que promueven la angiogénesis, invasión y metástasis, así como señales inductoras de la activación de la transición epitelio-mesenquimal (EMT) (DeNardo *et al.*, 2010; Grivennikov *et al.*, 2010; Karnoub & Weinberg, 2007; Qian & Pollard, 2010). Además, las especies reactivas del oxígeno que pueden liberar las células inflamatorias son mutagénicas, lo cual acelera la evolución genética hacia estados de mayor malignidad (Grivennikov *et al.*, 2010).

- i) **Reprogramación del metabolismo energético.** En las células tumorales, la proliferación descontrolada requiere de un ajuste metabólico para poder llevar a cabo el crecimiento y división celular. A principios del siglo XX, Otto Warburg observó que las células tumorales, incluso en presencia de oxígeno, pueden reprogramar su metabolismo de la glucosa hacia la ruta de la glucólisis, una ruta menos eficiente energéticamente hablando comparada con la fosforilación oxidativa mitocondrial (Warburg, 1956; Warburg *et al.*, 1927). Posteriormente, se observó cómo esta activación de la ruta glucolítica está asociada a oncogenes activados como *RAS*, *MYC* y supresores tumorales mutantes *TP53* (DeBerardinis *et al.*, 2008; R. G. Jones & Thompson, 2009). Además, la desviación hacia la ruta glucolítica permite utilizar los intermediarios glucolíticos en vías biosintéticas, como son la generación de nucleósidos y aminoácidos. Esto facilita la biosíntesis de macromoléculas necesarias para la proliferación celular activa (Heiden *et al.*, 2009). Los estudios han demostrado cómo

algunos tumores presentan dos subpoblaciones de células tumorales que se diferencian en las rutas de obtención de energía. Una subpoblación hipóxica, formada por células dependientes de glucosa que secretan lactato; y la otra oxigenada, que utilizaría preferentemente el lactato, funcionando ambas de forma simbiótica (Feron, 2009; Kennedy & Dewhirst, 2009).

- j) **Evasión inmunitaria.** El sistema inmunitario actúa como una barrera para la formación y progresión tumoral. Sin embargo, algunos tumores desarrollan la capacidad de eludir este sistema de defensa e incluso frenar la muerte celular inducida por el mismo. Este hecho es uno de los obstáculos para diseñar estrategias terapéuticas eficaces. Algunas de las funciones inmunológicas que utilizan las células tumorales para llevar a cabo dicha evasión son el ataque a la función de los linfocitos T citotóxicos, la presentación de antígenos, la modificación de la producción de mediadores inmunosupresores o la desviación inmunitaria (Vinay *et al.*, 2015).

En su última versión, Hanahan propuso la inclusión nuevas características distintivas de las células tumorales tales como son la plasticidad fenotípica, la diferenciación alterada, la reprogramación epigenética no mutacional y los microbiomas polimórficos. De este modo, las células malignas pueden cambiar su identidad y convertirse en algo más proclive a la proliferación. Además, podría añadirse el efecto de la senescencia de diversos tipos celulares del microambiente tumoral (Hanahan, 2022).

1.2. El cáncer de pulmón

1.2.1. Epidemiología del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se considera la primera neoplasia a nivel mundial con mayor incidencia (12,4%) y la principal causa de muerte relacionada con el cáncer en hombres y mujeres (18,7%) (Figura 2).

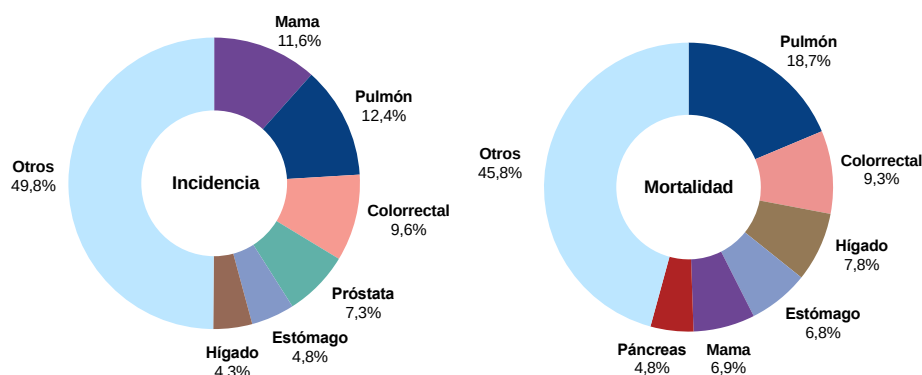


Figura 2: Tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo. Incidencia y mortalidad para el año 2020, en ambos sexos. Adaptado de (Globocan 2024, <http://gco.iarc.fr/today>).

De manera global, los países occidentales presentan una mayor tasa de incidencia de cáncer de pulmón. Así mismo, países asiáticos en vías de desarrollo, como es el caso de China, lideran las primeras posiciones de esta enfermedad (Figura 3) (Globocan, <http://gco.iarc.fr/today>).

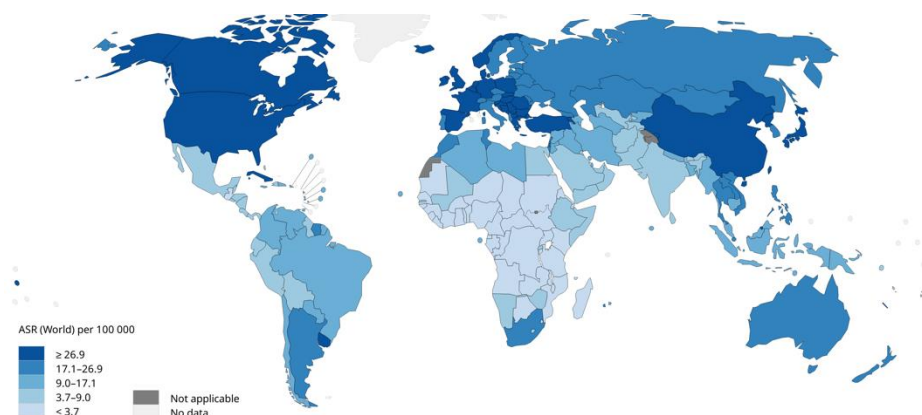


Figura 3: Estimación de la incidencia mundial de cáncer pulmonar en ambos sexos. (Globocan 2024, <http://gco.iarc.fr/today>).

Se ha observado que la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón en las mujeres es mayor que la de los hombres en los países industrializados, hecho que no ocurre en los países en vías de desarrollo (Torre *et al.*, 2015). Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que las muertes por este tipo de neoplasia seguirán aumentando como consecuencia del incremento del consumo de tabaco en todo el mundo, especialmente en Asia. En el caso de España, la incorporación de la mujer al hábito tabáquico hizo que el cáncer de pulmón pasara de ser el cuarto más diagnosticado en 2015, al tercero en 2019 entre las mujeres. En el 2022 se mantuvo en tercer lugar con una incidencia del 7%, por detrás del cáncer de colon y mama, con un 12,9% y 28,9% respectivamente (Globocan, <http://gco.iarc.fr/today>).

En el 2022 se diagnosticaron más de 33.000 nuevos casos de cáncer de pulmón en España, siendo el cuarto tipo de cáncer más frecuente, por detrás del de colon, mama y próstata entre los hombres y las mujeres. Se estima que la supervivencia de este tipo de neoplasia a los 5 años tras el diagnóstico es aproximadamente del 15%. El mal pronóstico del cáncer de pulmón respecto a otros cánceres, como son los de mama o colon, está

relacionado con la aparición tardía de las manifestaciones y, por tanto, el diagnóstico suele realizarse en estadios avanzados. Este hecho determina que menos del 20% de los pacientes con cáncer de pulmón sean candidatos a la resección quirúrgica curativa, siendo el abordaje terapéutico más eficaz para el tratamiento de esta patología.

1.2.2. Clasificación histológica del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón presenta multitud de alteraciones genéticas y fenotípicas, pudiendo distinguir diferentes tipos según sus características histológicas (Figura 4). Alrededor del 85% de los casos son de tipo no microcítico (CPNM), mientras que el 15% se engloba como cáncer de pulmón de tipo microcítico (CPM) (Travis, 2020; Zheng, 2016).

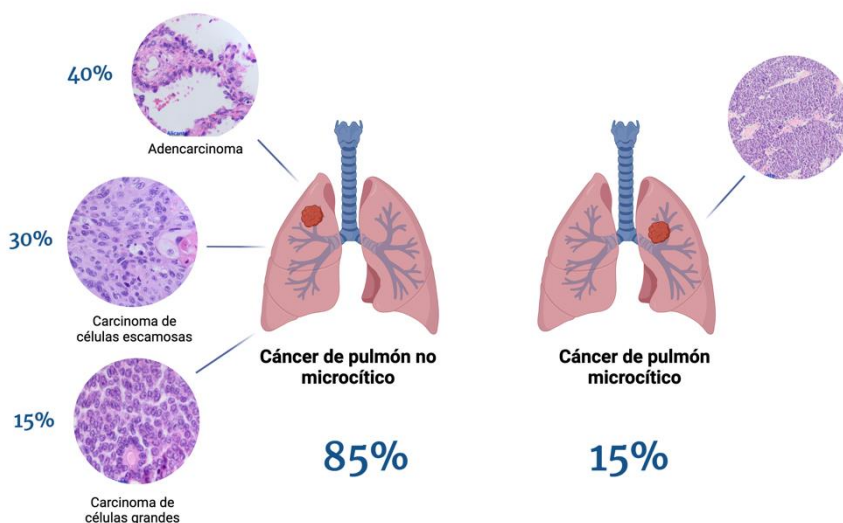


Figura 4: Representación gráfica de los distintos tipos y subtipos histológicos de cáncer de pulmón.

- 1) **Cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (CPM).** Se considera una neoplasia agresiva donde los pacientes suelen desarrollar metástasis con rapidez. El CPM se localiza en las vías respiratorias principales, con células tumorales de pequeño tamaño.

- 2) **Cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico (CPNM).** Existen varios subtipos que se originan en diferentes tipos de células de pulmón:
 - a) **Adenocarcinoma (AC).** Es el subtipo más común, con el 40% de los CPNM. Se considera una neoplasia epitelial maligna con diferenciación glandular o producción de mucina y localización periférica en el pulmón. En cuanto al perfil sociodemográfico, es mayoritario en mujeres, jóvenes y no fumadoras, aunque la mayoría de los casos se desarrollen en exfumadores o fumadores. Generalmente, suele diagnosticarse antes de la propagación, teniendo buen pronóstico las personas que sufren adenocarcinoma *in situ*, o anteriormente denominado carcinoma bronquioalveolar.

 - b) **Carcinoma de células escamosas o epidermoide (CCE).** Representa alrededor del 30% de los CPNM. Es el tipo de cáncer que se relaciona con el tabaquismo. Se originan a partir de las células escamosas, las cuales son células planas que cubren el interior de las vías respiratorias de los pulmones. Las lesiones se localizan en la parte central de los pulmones, cerca de una vía respiratoria principal como es el bronquio.

 - c) **Carcinoma de células grandes (CCG).** Constituye la minoría de los casos de CPNM (15%), presentándose mayoritariamente en personas fumadoras. Se caracteriza por una tasa de crecimiento y

propagación muy elevada, lo cual dificulta su tratamiento. Suele localizarse en la periferia, con aspecto necrótico. Las células tumorales son grandes y de forma poligonal con núcleos pleomórficos y vesiculares, las cuales forman láminas o nidos sólidos sin patrón.

1.2.3. Estratificación clínica del cáncer de pulmón: clasificación TNM

Existen diferentes tipos de sistemas de estadificación, siendo el más útil y común el sistema TNM. Esta clasificación permite describir la gravedad de la enfermedad utilizando letras y números para hacer referencia al tamaño tumoral, la infiltración a los ganglios y la presencia de metástasis (Tabla 1) (Lababede & Meziane, 2018).

- **T (tumor):** hace referencia al tamaño y extensión del tumor primario.
- **N (nódulo):** indica si el cáncer se ha propagado a los ganglios o nódulos linfáticos cercanos.
- **M (metástasis):** determina si el cáncer se ha diseminado hacia otras partes del cuerpo.

Tabla 1: Clasificación TNM del cáncer de pulmón

T (tumor primario)	
Tx	Tumor diagnosticado a base de la detección de células neoplásicas en el esputo o lavado bronquial, pero no visible en pruebas radiológicas o broncoscopia
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor ≤3 cm en su diámetro mayor rodeado por pulmón o pleura. No hay evidencia de invasión del bronquio principal
T1 (mi)	Adenocarcinoma mínimamente invasivo
T1a	Tumor ≤ 1cm en su diámetro mayor

T1b	Tumor > 1 cm y $\leq$ 2 cm en su diámetro mayor
T1c	Tumor > 2 cm y $\leq$ 3 cm en su diámetro mayor
T2	Tumor > 3 cm y $\leq$ 5 cm en su diámetro mayor o $\geq$ 1 cm si invade bronquios principales sin incluir la bifurcación de la tráquea, si invade la pleura visceral o si induce atelectasia o neumonía obstructiva que se extiende hasta el hilio
T2a	Tumor > 3 cm y $\leq$ 4 cm en su diámetro mayor
T2b	Tumor > 4 cm y $\leq$ 5 cm en su diámetro mayor
T3	Tumor > 5 cm y $\leq$ 7 cm en su diámetro mayor o $\geq$ 1 cm si invade directamente la pleura parietal, pared torácica, nervio frénico o pericardio
T4	Tumor > 7 cm en su diámetro mayor o $\geq$ 1 cm si invade el diafragma, mediastino, corazón, tráquea, o presenta parios focos en el otro lóbulo pulmonar del mismo pulmón

N (Ganglios linfáticos regionales)

NX	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
N0	No hay evidencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en los ganglios hiliares ipsilaterales o peribronquiales o invasión directa de dichos ganglios
N2	Metástasis en los ganglios subcarinales y/o mediastínicos ipsilaterales
N3	Metástasis en los ganglios supraclaviculares, ganglios hiliares o mediastínicos contralaterales

M (Metástasis a distancia)

MX	No se puede evaluar la presencia de metástasis a distancia
M0	No se observa metástasis a distancia
M1a	Se observa foco de cáncer en el pulmón contralateral, pleura/pericardio o derrame pleural/pericárdico
M1b	Nódulo(s) tumoral(es) a distancia
M1c	Metástasis a distancia en múltiples órganos

A partir de esta jerarquización se puede evaluar el pronóstico de la enfermedad y diseñar un plan de tratamiento específico para los pacientes.

1.2.4. Etiología del cáncer de pulmón

La principal causa del cáncer de pulmón es el tabaquismo, debido a la presencia de más de 4.000 componentes químicos en el humo de los cigarrillos. De estos, más de 55 son considerados sustancias cancerígenas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. Destacan los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), aminas aromáticas, N-nitrosaminas y otros compuestos orgánicos e inorgánicos como el benceno, arsénico y el cromo (Dela Cruz *et al.*, 2011). La activación de los HAP conlleva a la formación de aductos de ADN y consecuentemente, metilación de genes, cambios en la secuencia del ADN, amplificación o delección de segmentos de ADN, entre otros (Hecht, 1999). De este modo, el consumo activo del tabaco aumenta el riesgo de cáncer de pulmón entre 5 y 10 veces, con una clara relación dosis-respuesta (Schwartz & Cote, 2016). Asimismo, la exposición al humo del tabaco en los no fumadores también aumenta el riesgo de sufrir esta neoplasia en un 20%. Los posibles riesgos asociados al consumo actual de cigarrillos electrónicos aún no se han definido (Barta *et al.*, 2019). Además del tabaco, existen otros factores de riesgo:

- **Contaminación ambiental y exposición de agentes cancerígenos en el trabajo:** existen estudios que respaldan el riesgo de desarrollo del cáncer de pulmón por la presencia de determinadas sustancias presentes en el aire o en el agua como el arsénico o el gas radón. También se destaca la exposición laboral a productos químicos como minerales radiactivos y derivados del carbón que favorecen la inducción del daño oxidativo y el desarrollo de mecanismos carcinogénicos (Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2015).

- **Factores genéticos:** Estudios más recientes afirman que los pacientes con familiares de primer grado con cáncer de pulmón tienen un mayor riesgo, incluso después de controlar el consumo de tabaco. Además, se han identificado polimorfismos (SNPs, *Single nucleotide polymorphisms*) que afectan a genes que codifican diversas enzimas, como las del Citocromo p450, los genes de reparación del ADN y detoxificadoras de xenobióticos (Schwartz *et al.*, 2007).
- **EPOC y otras afecciones pulmonares:** las investigaciones establecen un mayor riesgo de cáncer de pulmón en aquellas personas fumadoras con enfermedades obstructivas crónicas (EPOC), bronquitis crónica, neumonía o tuberculosis (Brenner *et al.*, 2011). Se plantea una relación entre el cáncer de pulmón y la EPOC a través de la inflamación recurrente, la transición epitelio-mesenquimal (EMT) y la remodelación de la MEC. Además, varios estudios han identificado asociaciones entre el enfisema y el cáncer de pulmón en varios *loci* cromosómicos basándose en que la susceptibilidad al cáncer de pulmón puede incluir variantes genéticas relacionadas con la EPOC (Young & Hopkins, 2010).

1.2.5. Manifestaciones y diagnóstico del cáncer de pulmón

El mal pronóstico del cáncer de pulmón está relacionado con la aparición tardía de las manifestaciones clínicas y, por tanto, el diagnóstico suele realizarse en estadios avanzados. Los síntomas más comunes son tos recurrente que puede aparecer con hemoptisis, ronquera, pérdida de peso y apetito, cansancio, debilidad e incluso infecciones pulmonares (Ruano-Raviña *et al.*, 2020; Xing *et al.*, 2019).

El diagnóstico del cáncer de pulmón varía según la histología, el tamaño del tumor, la ubicación y la etapa (Latimer & Mott, 2015). La necesidad de un diagnóstico preciso requiere de la participación de diferentes profesionales sanitarios como son los neumólogos, radiólogos de tórax, oncólogos, cirujanos y patólogos. Los estudios de las células del tejido pulmonar pueden realizarse a partir de diferentes métodos (Latimer & Mott, 2015; Rivera *et al.*, 2013):

- Estudios por imágenes: radiografía de tórax, resonancia magnética y tomografía por emisión de positrones.
- Citología del esputo: este método es utilizado en pacientes con lesiones centrales.
- Toracocentesis: se basa en el estudio del líquido que envuelve los pulmones en caso de derrame pleural maligno.
- Biopsia con aguja o mediante cirugía laparoscópica: implica la inserción de instrumentos quirúrgicos a través de pequeñas incisiones en la piel para extirpar una muestra de tejido.
- Ultrasonido endobronquial y aspiración con aguja transbronquial: esta técnica permite visualizar las estructuras dentro del tórax y aspirar muestras de tejido de las lesiones sospechosas.

1.3. Genética del cáncer de pulmón no microcítico

En las últimas décadas, los avances en el estudio de los mecanismos moleculares han permitido comprender la progresión tumoral, así como el descubrimiento de nuevas terapias dirigidas, que se desarrollarán en apartados posteriores. Las células del CPNM presentan una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas, que permiten la evolución hacia un cáncer invasivo (Inamura, 2017). Tras el desarrollo del cáncer primario, la acumulación continuada de anomalías adquiridas influye en los procesos de

invasión, metástasis y resistencia al tratamiento del cáncer (Harvey I. Pass, 2010). Además, el aumento de la expresión de factores de crecimiento, la angiogénesis mantenida y la evasión de la apoptosis favorecen la progresión tumoral hacia un fenotipo invasivo (Wadowska *et al.*, 2020).

Los avances de la genómica del cáncer se han llevado a cabo gracias a los esfuerzos de investigación del “Atlas del Genoma del Cáncer” (*The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA)-NCI) (Carrot-Zhang *et al.*, 2020; G. F. Gao *et al.*, 2019). Este proyecto público ha caracterizado molecularmente más de 20.000 muestras de cánceres primarios, abarcando 33 tipos de cáncer y ha generado una gran cantidad de datos genómicos, epigenómicos, transcriptómicos y proteómicos. Del mismo modo, se destaca la plataforma pública “Consortio Internacional del Genoma del Cáncer” (ICGC), que ha analizado 50 tipos distintos de tumores. Los objetivos de estos grandes proyectos son mejorar la capacidad de diagnóstico, prevención, así como el descubrimiento de nuevas terapias dirigidas y nuevas estrategias de tratamiento al identificar y caracterizar los cambios moleculares (Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2015).

En el AC de pulmón existen una variedad de mutaciones conductoras o *drivers*. Según la base de datos del TCGA, el *TP53* es el gen más mutado (46%), seguido de *KRAS* (33%) y *EGFR* (14%). Otros genes frecuentemente mutados son *STK11*, *ALK*, *BRAF*, *PIK3CA*, *MET*, *CDKN2A* o *MAP2K* (*MEK*) (Campbell *et al.*, 2016; Collisson *et al.*, 2014; Giordano, 2014). En la Figura 5 se muestra la evolución de la clasificación del CPNM desde una división basada en características únicamente histológicas hasta la clasificación molecular según las alteraciones genómicas que afectan a oncogenes.

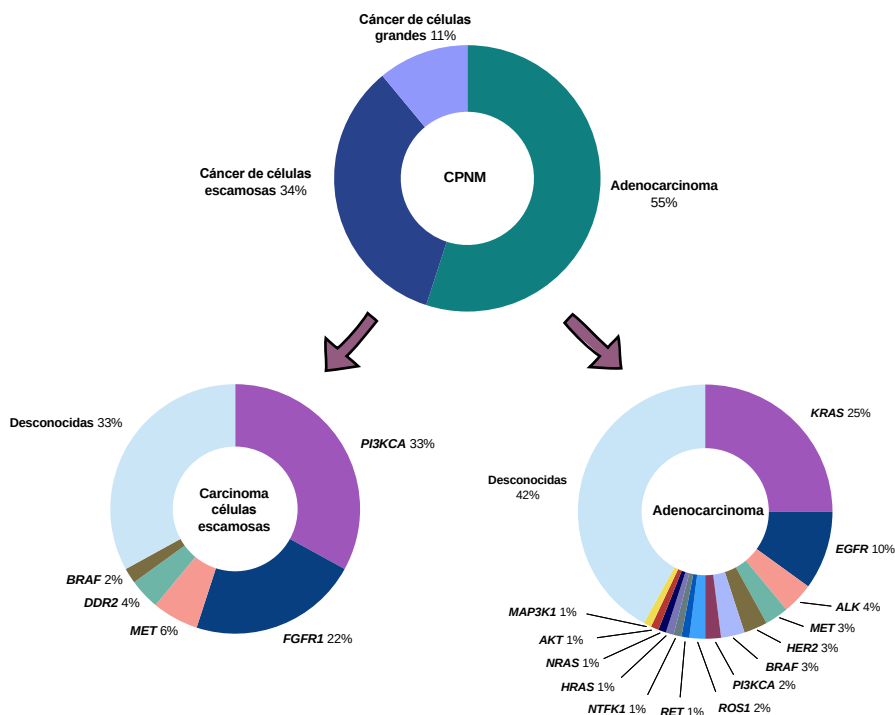


Figura 5: De la clasificación histológica del CPNM a la molecular. En el gráfico superior se representa la clasificación principal del CPNM según la apariencia celular. En los dos gráficos inferiores se clasifica cada uno de los principales CPNM según las principales mutaciones que afectan a oncogenes. Adaptado de (Bubendorf *et al.*, 2017).

- **EGFR:** el gen *EGFR* codifica al receptor del factor de crecimiento epitelial, una tirosina quinasa transmembrana con un dominio de unión extracelular y un componente intracelular con actividad tirosina quinasa intrínseca. La unión del ligando conduce a la homo- o heterodimerización del receptor con otros miembros de la familia del EGFR y aumenta la actividad enzimática (Scagliotti *et al.*, 2004). La incidencia de las mutaciones del *EGFR* es aproximadamente tres veces mayor en los no fumadores frente a los fumadores y en las mujeres frente a los hombres (Imyanitov *et al.*, 2016; Reguart & Remon, 2015). En la Figura 6 se describen las vías de señalización moduladas por la

activación del EGFR, las cuales desempeñan un papel esencial en el control de la proliferación, la supervivencia, la angiogénesis, entre otros procesos.

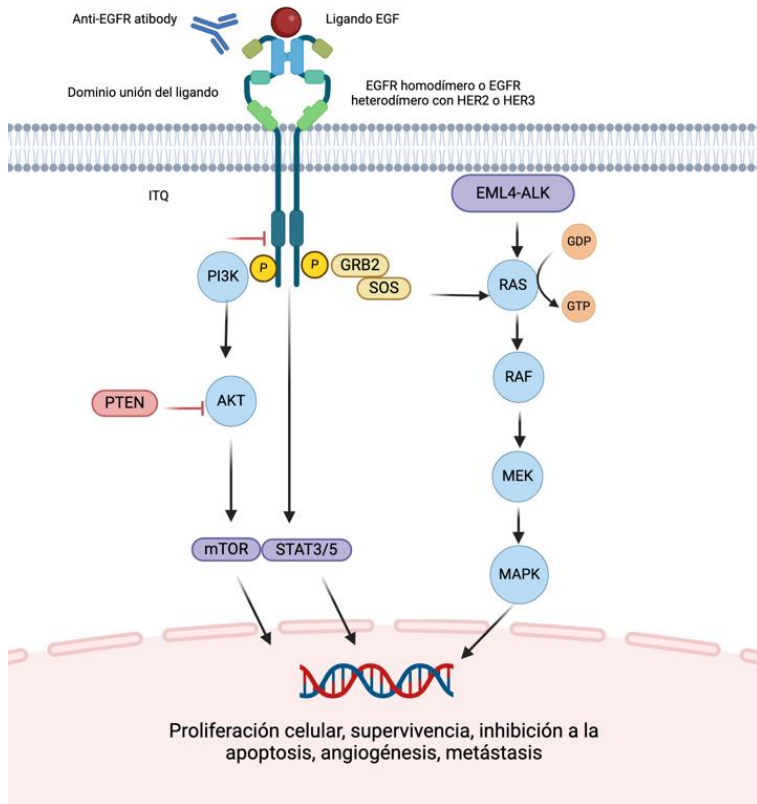


Figura 6: Vías de señalización de EGFR. La unión del ligando EGF al EGFR conduce a la fosforilación del dominio tirosina quinasa, que activa las vías PI3K/AKT/mTOR y RAS/RAF/MEK/MAPK. La vía RAS/RAF/MEK/MAPK también puede ser activada por EML4-ALK, un producto de un gen de fusión. PTEN regula negativamente AKT aguas abajo de EGFR. Esta activación afecta a la regulación de procesos biológicos como es la proliferación, diferenciación, migración y angiogénesis. Adaptado de (Janku *et al.*, 2010).

- **KRAS:** forma parte de la familia *RAS* y codifica una proteína G con actividad GTPasa que interviene en el control de las vías de

transducción de señales de supervivencia, proliferación y diferenciación celular a través de la activación de la vía de las MAP (*Mitogen-activated protein*) quinasas (Simanshu *et al.*, 2017). Las mutaciones activadoras en los codones 12 y 13 de *KRAS* constituyen el 25-40% de las alteraciones oncogénicas (Downward, 2003; Karnoub & Weinberg, 2008).

- ***ALK***: en algunos casos tienen lugar reordenamientos en el brazo p del cromosoma 2, dando lugar a fusiones del dominio quinasa intracelular de este gen con el extremo amino terminal del gen de la proteína asociada a microtúbulos de equinodermo 4 (*EML4*) en la mayoría de los casos. La proteína de fusión produce una señal mitógena que termina en una transformación maligna, estimulando la proliferación celular y la transducción de señales antiapoptóticas (Soda *et al.*, 2007).
- ***BRAF***: se trata de una serina treonina quinasa que se activa constitutivamente por mutaciones puntuales somáticas en el exón 15 en aproximadamente el 1-3% de los pacientes con CPNM (H. Davies *et al.*, 2002; Schmid *et al.*, 2009). Estas quinasas tienen un papel en la regulación de la vía de señalización MAP quinasa/ERKs, la cual impacta en la división, diferenciación y secreción celular.
- ***MET***: codifica un receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa para el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF). Es un oncogén que promueve la migración, invasión y supervivencia de las células tumorales. Además, ha sido vinculado con la resistencia a los inhibidores de tirosina quinasa de EGFR mediante un mecanismo conocido como *switch* oncogénico, como veremos más adelante (Engelman & Jänne, 2008; K. C. Park & Richardson, 2020).

- **ROS1:** es un oncogén que codifica para un receptor de actividad tirosina quinasa de la familia de los receptores de insulina (Nicholas P. Giustini, 2020). Estudios *in vitro* han demostrado que esta proteína se relaciona con las vías MAP/ERK, JAK/STAT3 y PI3K/AKT/mTOR (Charest *et al.*, 2006; K. D. Davies *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2011).
- **PI3K:** la señalización de la PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa) juega un papel importante en el metabolismo, crecimiento y supervivencia celular. En el CPNM pueden desarrollarse tanto la acumulación de copias de la subunidad catalítica de PI3K como mutaciones que alteran su función (Rekhtman *et al.*, 2012; Samuels *et al.*, 2004).

1.4. Tratamiento del cáncer de pulmón

Actualmente, hay varios tipos de tratamientos estándares disponibles para esta enfermedad, incluyendo la cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia, terapia láser, terapia fotodinámica o criocirugía, que serán explicados a continuación.

El tratamiento del cáncer de pulmón depende de la heterogeneidad y estadio clínico. La cirugía se considera la primera opción en aquellos pacientes con CPNM en un estadio I-II (Da Cunha Santos *et al.*, 2011), siempre que no esté contraindicado, considerándose la mejor opción de supervivencia a largo plazo (Sangha *et al.*, 2010). Este procedimiento se basa en extirpar parte del lóbulo del pulmón (segmentomía), su totalidad (lobectomía) o el pulmón completo (neumonectomía). En la actualidad, se han desarrollado técnicas quirúrgicas modernas, incluida la cirugía toracoscópica asistida por vídeo (VATS) menos invasiva para las resecciones pulmonares (G. S. Jones &

Baldwin, 2018). Posteriormente, se examina el tejido para observar la presencia o no de células tumorales en los márgenes de este.

Sin embargo, en caso de complicaciones que impidan la cirugía, o aquellos con enfermedad en estadio I inoperable, pueden recibir como tratamiento radioterapia (Duma *et al.*, 2019; Howington *et al.*, 2013). Por lo contrario, diferentes metaanálisis aconsejan la utilización de quimioterapia neoadyuvante en los estadios intermedio o avanzados donde no puede realizarse una resección quirúrgica (Pignon *et al.*, 2008). El tratamiento neoadyuvante permite abordar precozmente las micrometástasis, la reducción del estadio del tumor favoreciendo la resección completa y una mejor tolerabilidad en comparación con el enfoque adyuvante tras la resección quirúrgica (Duma *et al.*, 2019). Por otra parte, en aquellos pacientes con cáncer de pulmón en fase inicial, puede utilizarse una quimioterapia adyuvante tras la resección para aumentar las probabilidades de erradicación del tumor.

Históricamente, los tratamientos quimioterápicos han combinado platino, ya sea cisplatino o carboplatino, con algún citostático de tercera generación (gemcitabina, vironelbina o paclitaxel) para prevenir el desarrollo de metástasis a distancia y mejorar la tasa de supervivencia en estadios tempranos de la enfermedad (Langer *et al.*, 2010; Pignon *et al.*, 2008). A continuación, se presenta la evolución de los agentes quimioterápicos utilizados (Noonan *et al.*, 2015):

- **Regímenes de quimioterapia de primera generación (1960-1980):** en los años 60 se exploró la actividad de varios agentes individuales como el metotrexato, ciclofosfamida o vinblastina. El metotrexato es un inhibidor de la dihidrofolato reductasa, que bloquea la síntesis de folato. El folato es esencial para la formación y mantenimiento de las células.

Además, el metotrexato inhibe la síntesis de purinas y pirimidinas, lo que conlleva a la detención del ciclo celular en la fase G1.

- **Regímenes de quimioterapia de segunda generación (1980-1995):** se basan en la adición de un agente de platino (cisplatino/carboplatino) combinado con fármacos como la vinblastina (un inhibidor de la mitosis), etopósido (inhibidor de la topoisomerasa) o mitomicina (antibiótico antitumoral), entre otros. Los agentes de platino se entrecruzan con las bases de purina, interfiriendo con los mecanismos de reparación del ADN, provocando el daño y en última instancia, la apoptosis.
- **Regímenes de quimioterapia de tercera generación (1995-actualidad):** combinan un agente de platino más un fármaco complementario (vinorelbina, paclitaxel, docetaxel, gemcitabina o pemetrexed). La docetaxel y paclitaxel se trata de antineoplásicos de la familia de los taxanos. Estos inhiben la despolimerización de los microtúbulos y provocan un bloqueo en la transición de metafase a anafase durante la mitosis, lo que termina en apoptosis. La gemcitabina impide el correcto funcionamiento de la ADN polimerasa al actuar como antimetabolitos, causando una detención en la división celular. El pemetrexed bloquea enzimas relacionados con la producción de folato, compitiendo con el folato y obstaculiza la síntesis de purinas y pirimidinas.

La estrategia de tratamiento CPNM ha evolucionado desde el uso de quimioterapia empírica hasta un enfoque más personalizado basado en el estudio de la histología y los marcadores moleculares. Hasta el 60% de los adenocarcinomas pulmonares y entre el 50% y el 80% de los carcinomas de células escamosas de pulmón tienen mutaciones genéticas en receptores o

proteínas quinasas, lo que resulta en crecimiento incontrolado, proliferación y supervivencia del tumor. Las terapias dirigidas se centran en los productos de estas mutaciones y se presentan en forma de anticuerpos monoclonales de receptores (mAbs) o inhibidores de tirosina quinasa (ITQs) (Figura 7). Por otra parte, la nueva inmunoterapia permite que el sistema inmunológico perciba el cáncer como extraño, estimulando su activación y reduciendo la inhibición que permite el crecimiento y la propagación de la enfermedad (Shroff *et al.*, 2018)

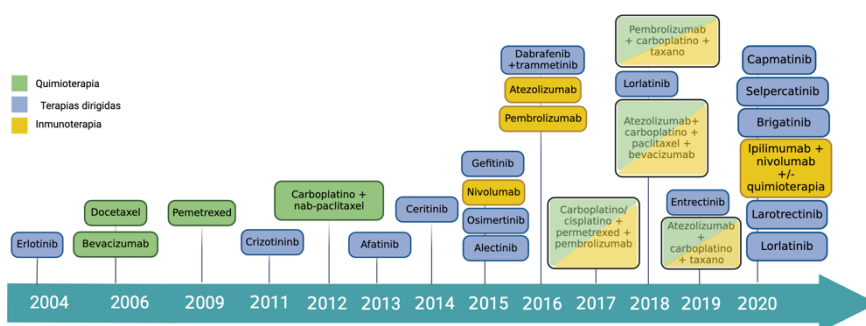


Figura 7: Avances en la terapia de CPNM. Cronología que muestra los medicamentos autorizados o recomendados para el tratamiento del CPNM metastásico y no metastásico en diciembre de 2020. Cuando hubo varias aprobaciones en un año, están organizados en orden cronológico de arriba abajo. Adaptado de (Chaft *et al.*, 2021).

A continuación, se detallan las terapias dirigidas más relevantes en la práctica clínica:

- **Inhibidores del EGFR.** Se utilizan los inhibidores de tirosina quinasa o ITQs, compuestos anilinoquinazolina capaces de inhibir de forma reversible la catálisis al ocupar el sitio de unión del ATP. Mejoran significativamente los resultados clínicos en los pacientes con CPNM con mutaciones activadoras en el gen *EGFR* (Koulouris *et al.*, 2022). En el siguiente apartado explicaremos los diferentes ITQs, destacando

el erlotinib y gefitinib de primera generación, afatinib y dacomitib de segunda, y osimertinib de tercera generación.

- **Anticuerpos monoclonales contra EGFR.** Otra de las estrategias para impedir la activación del receptor EGFR se basa en el bloqueo del ligando EGF al receptor mediante anticuerpos monoclonales, como cetuximab o necitumumab, de primera y segunda generación respectivamente (Duma *et al.*, 2019; Losanno *et al.*, 2016).
- **Inhibidores de KRAS y BRAF.** *KRAS* representa alrededor del 30% de los pacientes con CPNM, destacando la mutación en G12C (Reck *et al.*, 2021). Durante mucho tiempo, la mutación *KRAS* se ha considerado una diana "imposible de atacar" debido al fracaso en el desarrollo de terapias dirigidas contra esta mutación (Suda *et al.*, 2010). El gran avance en el tratamiento directo de la mutación G12C de *KRAS* y la reciente aprobación de los inhibidores covalentes de KRASG12C sotorasib y adagrasib han demostrado lo contrario (H. Wang *et al.*, 2023). Por otra parte, se han identificado mutaciones en *BRAF* en el 2% de los pacientes con CPNM, siendo el tratamiento de elección el vemurafenib (Hyman *et al.*, 2015; Kinno *et al.*, 2014).
- **Inhibidores de ALK y ROS1.** *ALK* puede fusionarse con el gen *EML4* dando lugar al oncogén de fusión *EML4-ALK* (Chan & Hughes, 2015; Savas *et al.*, 2013). Crizotinib y ceritinib, son eficaces en aquellos pacientes con mutaciones en el gen *ALK*. Ceritinib es la alternativa en pacientes que no toleran o desarrollan resistencia a crizotinib. Las translocaciones de *ROS1* afectan al 1% y 2% de los pacientes con CPNM. Se ha observado que ROS1 y ALK comparten alrededor del 50% de homología en el dominio de la quinasa. Por esta razón, los

pacientes con alteraciones en ROS1 pueden ser tratados con el inhibidor de tirosina quinasa crizotinib (Bubendorf *et al.*, 2016)(Ou *et al.*, 2012).

- **Inhibidores de la angiogénesis.** Las vías angiogénicas constituyen un objetivo importante en el tratamiento del CPNM, ya que ayudan al crecimiento del tumor al generar nuevos vasos sanguíneos (Alevizakos *et al.*, 2013). Dicho proceso está regulado por factores proangiogénicos, siendo el principal mediador el VEGF-A. El inhibidor de la angiogénesis más eficaz es el bevacizumab, un anticuerpo monoclonal contra el receptor A del VEGF (Chirieac & Dacic, 2010).
- **Inhibidores de los puntos de control inmunitario.** El sistema inmunológico juega un papel fundamental en la identificación y destrucción de las células neoplásicas. Sin embargo, las células tumorales pueden evadir la vigilancia inmunológica (Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2015). El antígeno 4 o CTLA-4 limita la actividad de los linfocitos T citotóxicos activados. Existen anticuerpos monoclonales como ipilimumab o tremelimumab contra este antígeno, que estimulan la función de los linfocitos T (Alegre *et al.*, 2001). Otro punto de control a destacar es la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) (Freeman *et al.*, 2000; Pardoll, 2012), y el ligando del receptor de muerte programada 1 (PD-L1) (Keir *et al.*, 2008). Las células malignas pueden sobreexpresar PD-L1 como mecanismo de defensa contra el sistema inmunitario. Los anticuerpos monoclonales aprobados más recientemente son el pembrolizumab, el nivolumab y atezolizumab, un anticuerpo recombinante humano que se dirige frente al ligando PD-L1. (De Mello *et al.*, 2021; M. L. Hsu & Naidoo, 2020).& Naidoo, 2020).

El desarrollo de estas terapias dirigidas ha mejorado el pronóstico de los pacientes de CPNM que presentan mutaciones activadoras en sus respectivas dianas moleculares. Se recomienda realizar pruebas moleculares para identificar estas alteraciones genéticas. Por otro lado, a pesar de que este tipo de terapias dirigidas permiten aumentar la supervivencia global de la mayoría de los pacientes, gran parte acaban recayendo debido a la aparición de resistencias (Hirsch *et al.*, 2017; Sequist *et al.*, 2011). Actualmente se están explorando nuevos enfoques terapéuticos basados no solo en la presencia de mutaciones activadoras, la inhibición del ciclo celular o la angiogénesis, sino también en factores relacionados con el entorno en el que se desarrollan los tumores, como la inflamación, el metabolismo, o los mecanismos de escape al control del sistema inmunitario, lo cual abre las puertas a beneficios significativos en el tratamiento frente al cáncer.

1.4.1. Mutaciones en EGFR y los ITQs como tratamiento

Las mutaciones del *EGFR* relacionadas con el CPNM se agrupan en los exones 18 al 21, que codifican el dominio tirosina quinasa, responsable de la activación anormal en las células tumorales, promoviendo la supervivencia, proliferación y replicación celular (Jänne *et al.*, 2005). Las deleciones en el exón 19 y la mutación puntual en el exón 21 L858R son las más comunes y son sensibles a los ITQs de EGFR (Figura 8) (Cansouline *et al.*, 2022; Eck & Yun, 2010; Jänne *et al.*, 2005; B. M. Qin *et al.*, 2005).

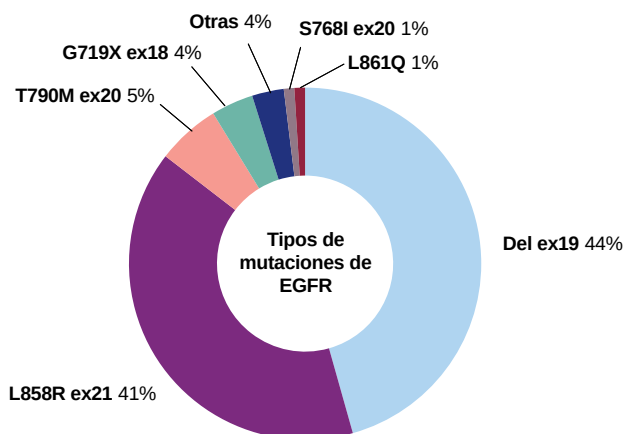


Figura 8: Frecuencia de mutaciones de *EGFR* en CPNM. Adaptado de (Harrison *et al.*, 2020; Passiglia *et al.*, 2022).

Estas mutaciones inducen cambios conformacionales que desestabilizan la forma inactiva del receptor hacia un estado activo (Harrison *et al.*, 2020; Landau & Ben-Tal, 2008; Yun *et al.*, 2007). Esto permite la dimerización independiente del ligando y la estimulación de las vías de señalización descendentes, incluyendo la vía de la proteína quinasa activada por RAS/RAF/Mitógeno (RAS/MAPK), PI3K/AKT y los transductores de señales y activadores de la transcripción STAT (Harrison *et al.*, 2020).

Las formas mutantes *EGFR*^{L858R} y *EGFR*^{Ex19Del} reducen significativamente la afinidad de unión al ATP en comparación con el *EGFR* WT, lo que permite que los inhibidores reversibles de EGFR de primera generación (gefitinib y erlotinib) compitan con el ATP y evitan la activación del receptor. Estos inhibidores se unen con preferencia a los receptores mutantes clásicos del *EGFR* en lugar del *EGFR* WT. Sin embargo, a pesar de la buena respuesta inicial, la mayoría de los pacientes acaban desarrollando otras mutaciones que confieren resistencia a los ITQs (Figura 9) (Carey *et al.*, 2006).

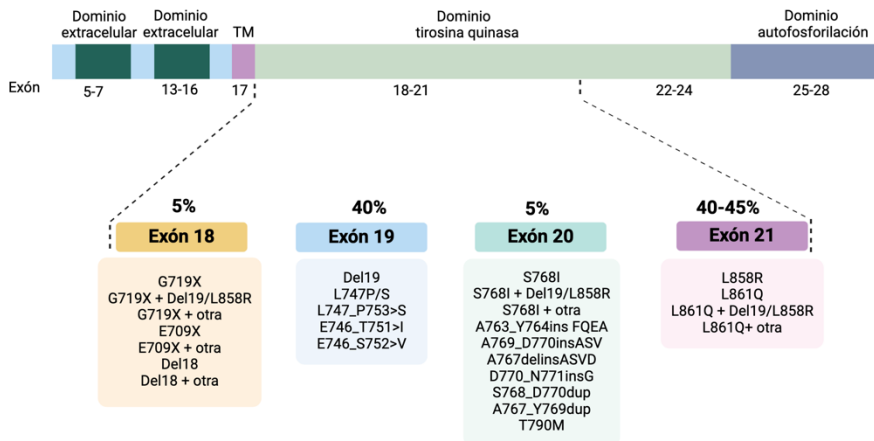


Figura 9: Mutaciones del gen *EGFR* y la respuesta a los ITQ. Exones del gen de *EGFR* mostrando el dominio extracelular (unión a EGF), el dominio transmembrana (TM) y el dominio intracelular (regiones tirosina quinasa y de autofosforilación). En la parte inferior de la imagen se muestran las mutaciones más relevantes de los exones 18 al 21. Adaptado de (Passaro, Mok, *et al.*, 2021).

2. MECANISMOS DE ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA A ITQs DE EGFR

Las resistencias a los ITQs de EGFR pueden clasificarse en dos categorías: intrínseca y adquirida. La resistencia intrínseca se refiere a una respuesta inicial deficiente a los ITQs, correspondiente al 20-30% de los casos (Santoni-Rugiu *et al.*, 2019). Sin embargo, la resistencia adquirida ocurre en aquellos pacientes que responden bien al inicio del tratamiento, pero terminan sufriendo recaídas. De este modo, el fracaso del tratamiento del CPNM puede deberse a la heterogeneidad genética de las poblaciones tumorales o la respuesta adaptativa gradual a los ITQs (Dagogo-Jack & Shaw, 2017). En definitiva, esta diversidad de las células tumorales plantea desafíos para la

farmacología individualizada, exigiendo un estudio continuado a nivel celular y molecular para lograr una respuesta efectiva.

Además, se han identificado múltiples mecanismos de resistencia dependientes e independientes de *EGFR*, incluidas las amplificaciones de los genes *MET* y *HER2*, mutaciones en *RAS* y *PIK3CA*, así como cambios epigenéticos como la EMT o las transformaciones de CPNM a CPM que se desarrollan a continuación (Figura 10) (Passaro, Jänne, *et al.*, 2021).

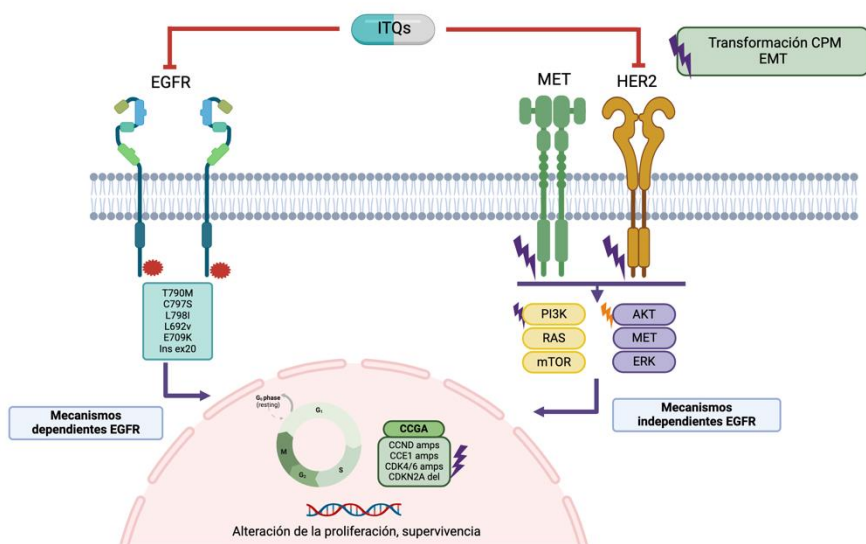


Figura 10: Mecanismos de resistencia a los EGFR-ITQs dependientes e independientes del *EGFR*. Se han caracterizado varios mecanismos que inducen la resistencia al tratamiento con ITQs de EGFR, los cuales pueden agruparse en mecanismos dependientes (mutaciones del gen *EGFR*) e independientes del EGFR (activación de MET, HER2, transformación cáncer de pulmón microcítico (CPM), EMT, entre otras). Las flechas rojas representan efectos inhibidores y las flechas moradas efectos activadores. La resistencia a los ITQs disminuye su efecto inhibidor en la señalización intracelular asociada a la proliferación celular anormal. Adaptado de (Koulouris *et al.*, 2022).

Dentro de este contexto, en los últimos años ha surgido un considerable interés en el estudio del microambiente tumoral debido a su relevancia en

relación con la resistencia a la terapia tumoral. Este tema se explorará más detalladamente en secciones posteriores y constituye un pilar fundamental en el presente trabajo.

2.1. Mecanismos de resistencia dependientes de *EGFR*

El mecanismo de resistencia más común a los ITQ de primera generación es la mutación puntual secundaria T790M en el exón 20 (Mok *et al.*, 2017; H. A. Yu *et al.*, 2013). Se estima que esta mutación es responsable de alrededor del 50-63% de los casos de recaída. Esta modificación altera el sitio de unión del ATP, dificultando la unión del fármaco (Cortot & Jänne, 2014). Con la finalidad de abordar este desafío, se desarrollaron inhibidores de segunda generación como el afatinib. Estos se unen al EGFR de forma covalente e irreversible, superando la resistencia al fármaco causada por la mutación *EGFR*^{T790M}. Sin embargo, se ha observado una elevada toxicidad debido a la escasa selectividad (Zhou *et al.*, 2009). Los ITQ de tercera generación también se unen irreversible y covalentemente al EGFR, pero con una mayor selectividad para las mutaciones *EGFR*^{T790M} sobre el *EGFR* WT en comparación con los ITQ de segunda generación. Por esta razón, en 2015 la FDA aprobó el osimertinib como tratamiento de segunda línea para los pacientes positivos a la mutación *EGFR*^{T790M} tras la progresión con erlotinib o gefitinib. Los datos clínicos recientes han demostrado que osimertinib puede superar a los ITQ de primera generación en el entorno de primera línea por presentar una mayor tasa de supervivencia (Cho *et al.*, 2020).

También existen las inserciones en el exón 20, que confieren una resistencia de *novο* a la mayoría de los ITQ, presentando incluso una respuesta

moderada al tratamiento con osimertinib (Cho *et al.*, 2020). Aunque menos frecuentes, existen mutaciones adicionales en los exones 18, 20 y 21.

La mutación *EGFR*^{C797S} consiste en una mutación terciaria en el exón 20 del gen *EGFR*. En este cambio, la serina reemplaza a la cisteína en el codón 797 del sitio de unión al ATP. Así se reduce la capacidad del osimertinib y otros ITQs de formar un enlace covalente con el EGFR mutante (Niederst *et al.*, 2015; Z. Yang *et al.*, 2018). De hecho, esta mutación ha sido encontrada en el 26% de los pacientes con recaídas después de recibir osimertinib como tratamiento de segunda línea, y en el 7% como tratamiento de primera línea (Mok *et al.*, 2017; Ramalingam *et al.*, 2018). Además, pueden coexistir las mutaciones *EGFR*^{T790M/C797S} (Niederst *et al.*, 2015). Por otro lado, los *EGFR*s con mutaciones triplemente concomitantes *EGFR*^{19del/T790M/C797S} son resistentes a los ITQs de primera, segunda y tercera generación, así como a sus combinaciones (Niederst *et al.*, 2015). Con todo esto, se han desarrollado ITQs de cuarta generación. Algunos ejemplos son el LS-106 y BLU-945, que han demostrado su eficacia preclínica antitumoral en modelos *in vitro* e *in vivo* de tumores con triple mutación C797S (*EGFR*^{19del/T790M/C797S} y *EGFR*^{L858R/T790M/C797S}) (Y. Liu *et al.*, 2022; Schalm *et al.*, 2020).

Del 1 al 8% de los casos presentan mutaciones raras que causan resistencia secundaria en la inhibición del EGFR con ITQs (Santoni-Rugiu *et al.*, 2019). Destacan los residuos mutados del *EGFR*^{L718Q} y *EGFR*^{L792X}, correspondiendo al 2 y 3% de los casos resistentes a osimertinib, respectivamente (Ramalingam *et al.*, 2018). Además, estas mutaciones a menudo se observan simultáneamente con otras alteraciones dependientes de *EGFR*, como T790M.

2.2. Mecanismos de resistencia independientes de *EGFR*

Existen diversos mecanismos de resistencia independientes del *EGFR* que pueden aparecer en combinación con otras vías relacionadas con la vía de señalización EGFR.

Las amplificaciones en *MET* desempeñan un papel en la resistencia a los ITQs al proporcionar una activación independiente del *EGFR* en varias vías de señalización. Estas vías también son activadas por el EGFR como la proteína quinasa activada por mitógenos-MAPK y PI3K-AKT (Figura 11) (Engelman & Jänne, 2008).

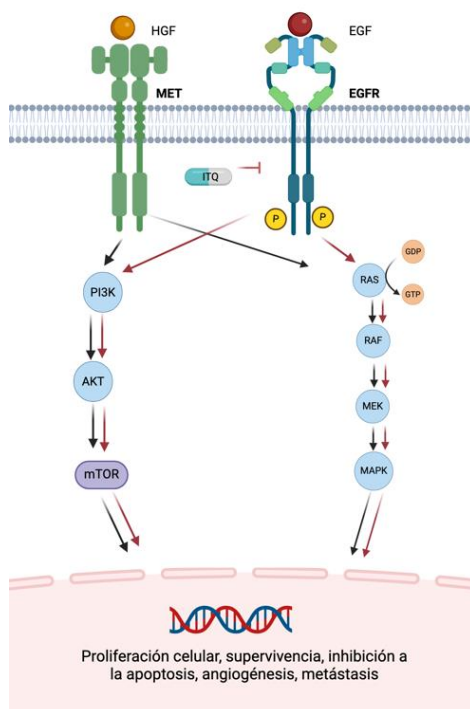


Figura 11: Comunicación entre las vías de señalización de MET y EGFR. La activación del receptor MET por la unión de HGF activa la señalización de PI3K-AKT y MAPK a pesar de la inhibición del EGFR.

Esta mutación es una de las causas más comunes de resistencia a osimertinib, ya que, aunque el EGFR se inhibe farmacológicamente, las vías secundarias de actividad carcinogénica siguen estando activadas. En este contexto, recientemente se ha identificado diferentes tipos de fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) que median la respuesta a los ITQs de células tumorales de CPNM a través de la activación de la vía MET por la unión del factor de crecimiento HGF (H. Hu *et al.*, 2021). Este fenómeno será explorado con más detalle en secciones posteriores de esta tesis.

El gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*HER2*) que codifica el ERBB2, un receptor con actividad tirosina quinasa miembro de la familia HER, regula la activación descendente de diversas vías oncogénicas en el CPNM (quinasa regulada por señales extracelulares-ERK, MAPK, PI3K-AKT) (Jamal-Hanjani *et al.*, 2018; Takezawa *et al.*, 2012). Representa entre un 2-5% de los casos de resistencia a osimertinib. Esta mutación puede coexistir con mutaciones en *EGFR*^{L792X}, *EGFR*^{C797X} y/o amplificación de PIK3CA, *EGFR*^{G796S} y amplificación de *MET* (Leonetti *et al.*, 2019).

2.2.1. Mecanismos epigenéticos de resistencia CPNM

Las transformaciones fenotípicas reguladas por mecanismos epigenéticos también son capaces de inducir resistencia a los ITQs de EGFR. Principalmente podemos clasificar el cambio de fenotipo en dos clases: la transición a cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (CPM) y la transición epitelio-mesenquimal (EMT) (Minari *et al.*, 2018; Weng *et al.*, 2018).

Se ha estimado que el 4-15% de los casos de resistencia a los ITQs de primera línea están relacionados con la transformación histológica de CPNM a

CPM. Los mecanismos implicados no están claros, pero en algunos casos no son mecanismos epigenéticos, sino la inactivación de genes supresores de tumores (*RB1*, *TP53*), así como la presencia de la enzima editora del ARNm de la apolipoproteína B (APOBEC) (J. K. Lee *et al.*, 2017).

Por otro lado, encontramos la plasticidad fenotípica. Este fenómeno ocurre a diferentes niveles e implica la transformación morfológica, la transición desde los fenotipos proliferativos hacia los migratorios e invasivos y la reprogramación metabólica. Estos procesos están regulados principalmente por programas epigenéticos reversibles denominados EMT y transición mesénquima-epitelio (MET) (Tulchinsky *et al.*, 2019). Numerosas investigaciones han identificado la activación del programa EMT en el CPNM con resistencia adquirida a erlotinib o gefitinib (Chung *et al.*, 2011; A. F. Lee *et al.*, 2017; Soucheray *et al.*, 2015; Weng *et al.*, 2019), donde no se han detectado otros mecanismos de resistencia como la mutación *EGFR*^{T790M} y la amplificación de MET (Chung *et al.*, 2011). Además, la adquisición del fenotipo mesenquimal se ha relacionado ampliamente con la vía de señalización del TGF- β (Factor de crecimiento transformante beta), tal y como se explicará en la siguiente sección (Soucheray *et al.*, 2015). Por otro lado, también se ha determinado la activación del programa EMT en la resistencia adquirida al inhibidor de KRAS, caracterizada por la activación sostenida de PI3K en presencia del inhibidor de KRAS G12C AMG510 (Adachi *et al.*, 2020). Estos resultados apoyan la necesidad de desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que ayuden a prolongar la eficacia de los ITQs en pacientes de CPNM con mutaciones en EGFR.

3. LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL

La EMT es fundamental en diferentes etapas del desarrollo embrionario y la reparación tisular. Sin embargo, su expresión aberrante se asocia a la progresión y desarrollo tumoral de los carcinomas (Kalluri & Weinberg, 2009). Este programa puede describirse como un espectro de estados parciales de EMT o MET, con estadios intermedios no estáticos donde las características epiteliales pueden converger con las mesenquimales (Figura 12) (Chaffer *et al.*, 2016; Gonzalez & Medici, 2014). A través de este proceso, las células tumorales adquieren rasgos de células madre tumorales con un fenotipo multipotente, lo que confiere una gran heterogeneidad intratumoral, resistencia a los agentes antineoplásicos, capacidad migratoria, invasora y metastásica (Crosas-Molist *et al.*, 2016; Emad *et al.*, 2020).

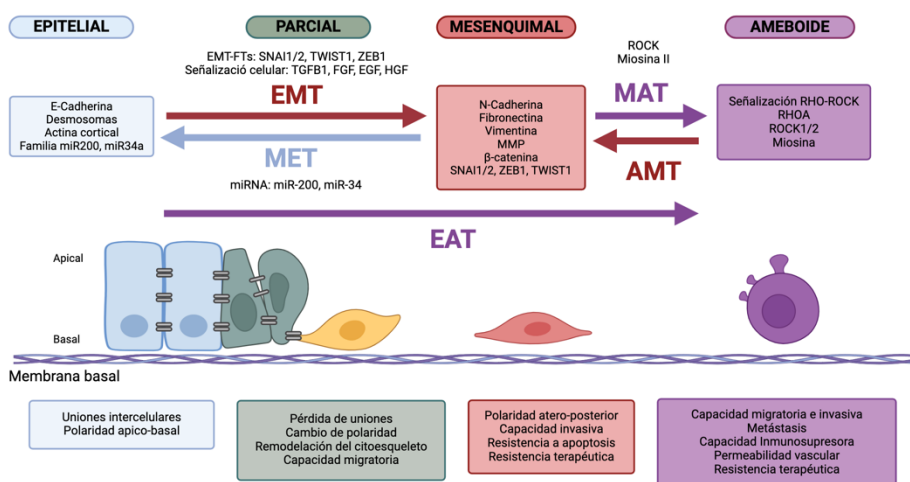


Figura 12: Cambios celulares asociados a la EMT y EAT. A medida que las células epiteliales avanzan hacia un estado mesenquimal, pasan por estados de EMT parcial, reversibles y posiblemente transitorios. La presencia de biomarcadores epiteliales disminuye, mientras que aumenta la de los mesenquimales. Modificado de (Chaffer *et al.*, 2016; Nieto *et al.*, 2016).

Actualmente, se ha descrito un nuevo estado celular más agresivo y metastático que el mesenquimal, conocido como ameboide. En este sentido, las células pueden sufrir una transición mesenquimal ameboide o incluso epitelial ameboide (EAT). Este estado celular se caracteriza por una morfología redondeada, una activación de la vía Rho-ROCK-miosina II y baja adhesión. Las células ameboides presentan un córtex de actina reforzado y utilizan *blebs* como protrusiones funcionales que les confieren mayor capacidad de migración e invasión (Crosas-Molist *et al.*, 2016; Emad *et al.*, 2020). La presencia de células ameboides ha sido descrita en diferentes tumores humanos como melanoma, páncreas, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, sarcoma, adenocarcinoma de próstata, entre otros. Más concretamente, se han visto enriquecidas en los frentes invasivos de tumores primarios con funciones inmunosupresoras, de resistencia a la terapia y formación de metástasis en el melanoma (Graziani *et al.*, 2022; Orgaz *et al.*, 2014; Sanz-Moreno *et al.*, 2011).

Entre las propiedades de la activación del programa EMT se incluyen la pérdida de sus características apicobasales y de los complejos de adhesión intercelular, lo cual desencadena un cambio de la composición del citoesqueleto y el fenotipo mesenquimal adquirido. Esto potencia la migración e invasión a lo largo de la matriz extracelular hacia tejidos subyacentes. Implica la reducción de la expresión de CDH1, el componente principal de las uniones adherentes, aumentando la expresión de marcadores mesenquimales tales como la vimentina (VIM), la fibronectina (FN1), la proteína específica de fibroblastos 1 (FSP1), la α -actina del músculo liso (α -SMA) o la CDH2 (Weng *et al.*, 2019).

3.1. Inducción del programa EMT

La regulación de la expresión génica y la activación de los factores de transcripción (FT) que afectan el equilibrio EMT/MET puede estar influenciada por diferentes vías de señalización: la vía de señalización del TGF- β , la de la proteína morfogenética ósea (BMP), la del receptor tirosina quinasa, la de Wnt/ β -catenina (Jong *et al.*, 2005), la de Notch (Timmerman *et al.*, 2004), la de Hedgehog (Yoo *et al.*, 2011), la del transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3) (Gonzalez & Medici, 2014), la vía de señalización mediada por la MEC (Lindsey & Langhans, 2014) y la de hipoxia mediante el factor de transcripción (HIF1- α) (Yeo *et al.*, 2017) (Figura 13). Como resultado, estas vías aumentan la expresión de marcadores mesenquimales, reducen los epiteliales y, finalmente, cambian el fenotipo de células epiteliales a mesenquimales (Babaei *et al.*, 2021).

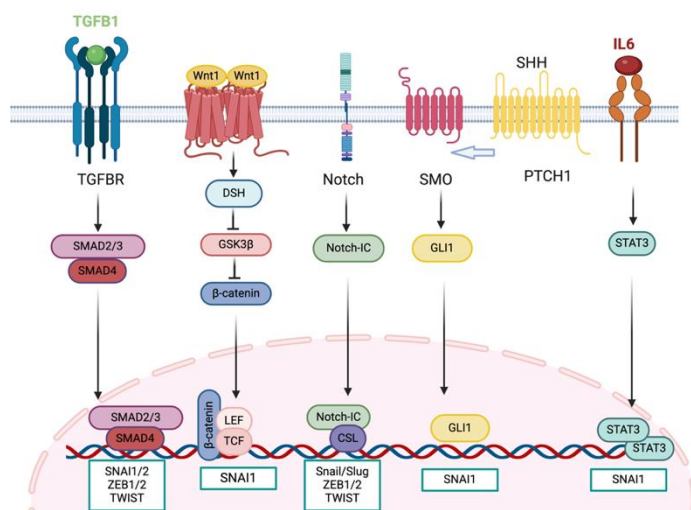


Figura 13: Principales inductores del programa EMT. Las señales del TGF β 1 activan vías de señalización SMAD2/3, que inducen FT. La activación de la señalización Wnt facilitan que la β -catenina entre en el núcleo y active la transcripción de SNAI1. Los

receptores Notch pueden estimularse mediante la unión a ligandos Delta y Jagged y activar FT de la EMT. En la señalización Sonic Hedgehog (SHH), la unión del ligando a los receptores Patched 1 (PTCH1) activa los FT de la familia Smoothed (SMO) y Glioma (GLI1) que inducen la expresión de SNAI1. La interleuquina 6 (IL6) puede inducir la expresión de SNAI1 mediante la activación de STAT3. Adaptado de (B. Du & Shim, 2016).

La señalización TGF- β es la vía más conocida para inducir la EMT, la cual puede activarse mediante la unión de ligandos de la superfamilia TGFB a receptores con actividad serín-treonín quinasa. Se han identificado distintas isoformas, siendo el TGFB1 la más estudiada (Takahashi *et al.*, 2020). El TGFB1 es un factor de crecimiento principal en la comunicación celular que afecta a actividades celulares a distintos niveles regulando y orquestando el crecimiento y diferenciación de todos los tipos celulares y tejidos (Moustakas & Heldin, 2009). Desempeña importantes funciones durante el desarrollo embrionario y en la regulación de la homeostasis tisular. En el contexto del cáncer, el TGFB1 tiene un papel multifacético según el grado y estadio. En estadios tempranos, inhibe el ciclo celular y favorece la apoptosis. Sin embargo, en estadios avanzados se asocia con un aumento de la migración, quimioatracción, invasión y metástasis celular (Derynck *et al.*, 2001; Nagaraj & Datta, 2010). Los niveles de TGFB1 no sólo afectan a las células tumorales, sino también al estroma tumoral, favorecen la diferenciación del fibroblasto al miofibroblasto, inhiben la adhesión celular e inducen la inmunosupresión y angiogénesis (Neel *et al.*, 2012; E. J. Walker *et al.*, 2019).

Tras la estimulación de los receptores TGFB, la señalización se divide en vías dependientes e independientes de SMAD (Figura 14). En la vía dependiente, se produce la fosforilación y activación de proteínas citoplasmáticas SMAD2 y SMAD3. Después, estas proteínas forman el complejo trimérico SMAD (SMAD4) que entra en el núcleo y estimula la transcripción de la VIM, FN1 y colágeno- α tipo I (COL1A1) (Kaimori *et al.*, 2007). Por otro lado, en la vía independiente de SMAD, la señal de TGFB1

puede inducir EMT a través de las vías de GTPasas, PI3K y MAPK. En las células epiteliales, el TGFB1 activa AKT a través de PI3K, lo que conlleva a la activación de mTOR promoviendo el aumento del tamaño celular, la síntesis proteica, además de aumentar la motilidad y capacidad invasiva (Lamouille *et al.*, 2012; Torrealba *et al.*, 2020). Además, el TGFB1 induce reacciones desmoplásticas que dan lugar a cambios en el microambiente tumoral, contribuyendo a la secreción de componentes de la MEC (Kumar *et al.*, 2020).

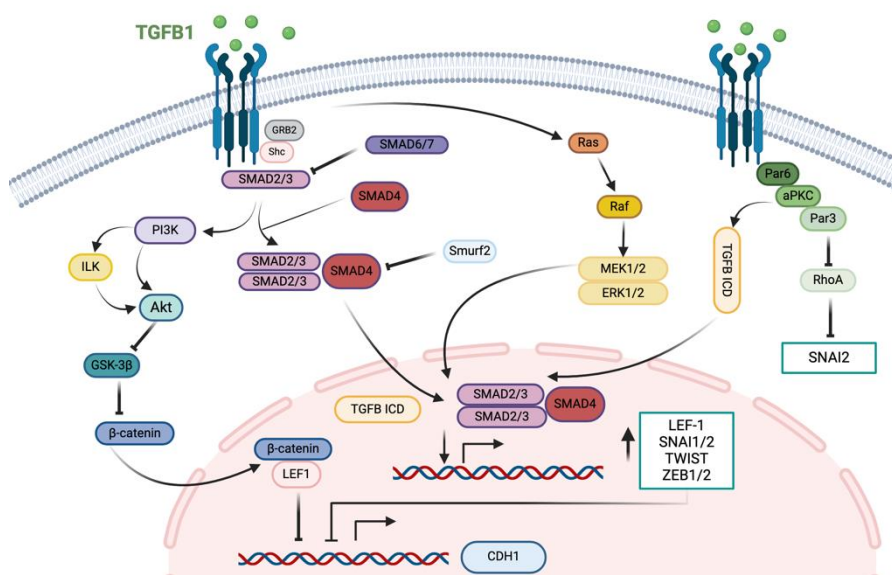


Figura 14: Vía de señalización del TGF- β en la EMT. El TGFB1 se une a su receptor, lo que provoca la activación de varias vías de señalización, incluidas las mediadas por SMAD2/3, Ras y PI3K, que activan FTs que inducen la expresión de genes que codifican FTs de EMT. Además, el complejo Par3-Par6aPKC también se asocia con los receptores de TGFBR y participa en la remodelación del citoesqueleto promoviendo el fenotipo mesenquimal. Las vías independientes de SMAD pueden activar AKT, que a su vez puede inhibir la función de GSK-3 β , una quinasa que inhibe la translocación nuclear de Snail y β -catenina. Adaptado de (Gonzalez & Medici, 2014).

La regulación EMT está estrechamente relacionada con el microambiente, por lo que es preciso investigar con detenimiento los efectos

que pueden tener estos diferentes contextos extracelulares en el diseño y desarrollo de nuevas terapias.

3.2. Regulación transcripcional y plasticidad del programa EMT

El equilibrio EMT/MET de las células tumorales se encuentra regulado por diferentes factores como la activación mutacional de las vías de señalización o estímulos del microambiente (factores de crecimiento y citoquinas, hipoxia, composición y rigidez de la MEC, respuestas inmunitarias o exposición a terapias antitumorales) (Nieto *et al.*, 2016). Esto conduce a modificaciones postraduccionales de los FTs, que ejecutan la reprogramación transcripcional (Saitoh, 2023). Dentro de los FTs de la EMT, se han identificado las familias ZEB (ZEB1 y ZEB2), SNAIL (SNAIL1/SNAIL Y SNAI2/SLUG) y TWIST (TWIST1 Y TWIST2). También se han relacionado con otros FT, como los de las familias SOX y FOX (F. Du *et al.*, 2019; J. Hu *et al.*, 2017). Estos se unen a secuencias de ADN específicas para regular genes diana de EMT (Lamouille *et al.*, 2014). Los FT de la EMT reclutan complejos transcripcionales correpresores y enzimas modificadoras de la cromatina para regular la transcripción de genes diana (Skrypek *et al.*, 2017; Thiery *et al.*, 2009; Tulchinsky *et al.*, 2019). Las proteínas de la unión célula-célula epitelial, como la ocludina, las claudinas y la desmoplaquina, así como la CDH1, son dianas de la represión de la transcripción. Las proteínas del complejo citoesquelético y de polaridad, como la FN1, la vitronectina, la VIM, la CDH2 y las metaloproteinasas de matriz (MMP) son dianas de la activación de la transcripción (R. Y. J. Huang *et al.*, 2012; Wheelock *et al.*, 2008).

Otras dianas de los FT de la EMT son los microARN. Estos son pequeñas moléculas de ARN no codificante que modulan la expresión postranscripcional

de aquellos genes que participan en la proliferación y migración celular uniéndose y bloqueando los ARNm. Se ha descubierto que la familia miR-200 inhibe la EMT al dirigirse a los ARNm *ZEB1* y *ZEB2* (Brabletz & Brabletz, 2010; Cavallari *et al.*, 2021). Sin embargo, la familia ZEB también puede inhibir la expresión de la familia miR-200. Esta red de regulación sugiere que las células tumorales pueden amplificar las señales inductoras de EMT o MET, de modo que las células adoptan estados epiteliales o mesenquimales hasta que nuevos estímulos del microambiente o nuevas mutaciones cambian el equilibrio EMT/MET.

4. COMPLEJIDAD DEL MICROAMBIENTE TUMORAL Y MECANISMOS DE RESISTENCIA ASOCIADOS

4.1. Composición y funciones

El cáncer se desarrolla en entornos tisulares complejos, de los que depende para su sostén, crecimiento, invasión y metástasis (Quail & Joyce, 2013). Anteriormente, el cáncer se consideraba como una enfermedad heterogénea, caracterizada por presentar mutaciones aberrantes y cambios epigenéticos en las propias células tumorales. Sin embargo, durante los últimos años se ha hecho hincapié no sólo en las propias células tumorales, sino también en el denominado microambiente tumoral (MAT), así como en la relación que se establece entre ambos (Nallasamy *et al.*, 2022). Actualmente, se estudia la heterogeneidad derivada de la composición del MAT, así como las proporciones de las células estromales o su estado de activación (Hanahan & Coussens, 2012).

Los estudios iniciales dirigían sus esfuerzos en elucidar si los componentes del MAT desempeñaban un papel protumoral o, por el contrario, antitumoral. Las pruebas actuales demuestran que el MAT está implicado en muchos aspectos del desarrollo tumoral al favorecer el escape de las células tumorales al sistema inmunitario por reducción de inmunogenicidad de estas, así como la adquisición de características invasivas, migratorias e incluso, constituir un papel clave en la resistencia al tratamiento (Baghban *et al.*, 2020). De este modo, las terapias actuales buscan dirigirse al MAT para complementar los métodos de tratamiento tradicionales y mejorar el efecto terapéutico sobre los tumores.

El MAT está formado por componentes extracelulares (MEC), factores de crecimiento, citoquinas y hormonas y una multitud de células no tumorales, incluyendo los fibroblastos, las células inmunitarias (tales como linfocitos infiltrados, macrófagos y granulocitos) y las endoteliales vasculares (Barbazán & Matic Vignjevic, 2019; Bremnes *et al.*, 2011; Santi *et al.*, 2018) (Figura 15). En tejidos normales existe una comunicación bidireccional entre todas estas células y su microambiente, promoviendo de este modo la homeostasis. En el entorno tumoral, los componentes del MAT facilitan el intercambio de nutrientes, oxígeno y metabolitos, promoviendo el desarrollo de las células tumorales tal y como desarrollaremos en los siguientes apartados (Bremnes *et al.*, 2011). Por tanto, la interacción entre las células tumorales y el estroma adyacente proporciona un ambiente idóneo para sostener la señalización proliferativa, inducir la angiogénesis, resistir la muerte celular, activar la invasión y metástasis, desencadenar la inflamación promotora del tumor y evitar la destrucción inmunitaria (Joyce & Pollard, 2009; Y. Xiao & Yu, 2021).

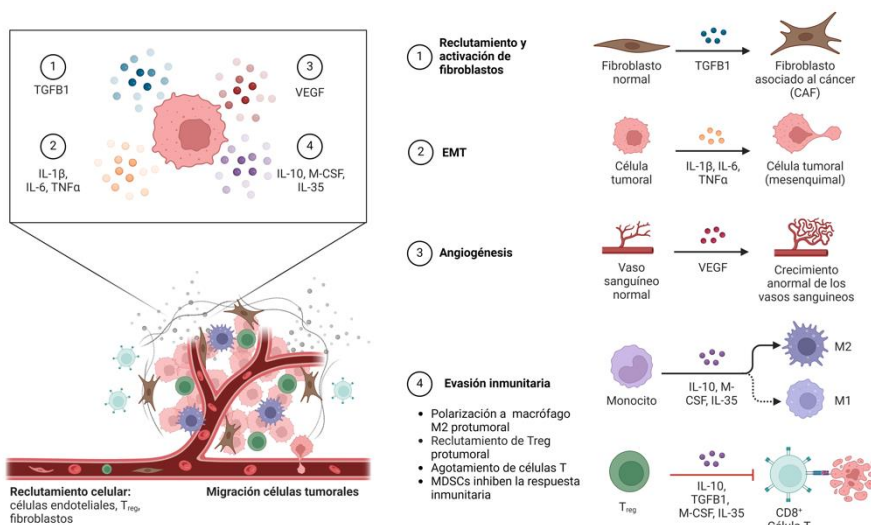


Figura 15: Cambios en el MAT asociados a la resistencia tumoral. El MAT es un ecosistema dinámico que desempeña un papel crucial en el origen, progresión y desarrollo de la resistencia al tratamiento del cáncer. (1) El reclutamiento y la activación de los fibroblastos desempeña un papel importante en el desarrollo de una matriz estructural de soporte, modulación de la respuesta inmunitaria y estimulación de la angiogénesis. (2) En las células tumorales, la EMT facilita la infiltración y movilización hacia zonas alejadas del tumor. (3) La angiogénesis permite el aporte de nutrientes, oxígeno y factores de crecimientos que favorecen el crecimiento y expansión del tumor. (4) El desarrollo de la capacidad de evasión inmunitaria por parte de las células tumorales. Adaptado de (Zhi Li & Yin, 2023).

Una vez las células tumorales consiguen evadir el mecanismo intrínseco de apoptosis, estas deben enfrentarse a procesos de eliminación del sistema inmunitario por antígenos específicos, reconocidos por los linfocitos citotóxicos. Inicialmente, los macrófagos y fibroblastos pueden contribuir al estado de supresión del crecimiento tumoral. Sin embargo, la plasticidad de dichas poblaciones celulares puede resultar en el desarrollo de características protumorales por interacción con las células tumorales (Figura 15) (Quail & Joyce, 2013).

La MEC es una red compleja de macromoléculas que se encuentra en todos los tejidos y órganos, actuando como un soporte y protección arquitectónica y mecánica para las células. Se trata del mayor componente no celular del MAT compuesto por colágenos, fibronectina, elastina, proteoglicanos y glucosaminoglicanos (Tabla 2). Su función principal es mediar en las interacciones entre las células tumorales y las estromales (P. Lu *et al.*, 2012; Roberts & Stinchcombe, 2013). Los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) son los principales productores de matriz, secreción y modificación de los componentes de la MEC en los tumores sólidos (C. Walker *et al.*, 2018).

El colágeno fibrilar tipo I es un componente que interviene en la desmoplasia tumoral y se ha relacionado con la supervivencia y metástasis del cáncer (Cox & Erler, 2014). En diferentes tipos de tumores, se ha observado que las zonas premalignas se caracterizan por membranas basales finas, con menos colágeno (colágeno XV, XIX, IV) o laminina, lo que favorece la invasión tumoral (Amenta *et al.*, 2000, 2003). Respecto a las glicoproteínas y proteoglicanos, rellenan el espacio intersticial y amortiguan la tensión física en la matriz gracias a la alta viscosidad que proporcionan sus cadenas. Además, resisten las fuerzas de compresión, regulan procesos de adhesión, motilidad, proliferación y diferenciación (Iozzo & Schaefer, 2015).

Tabla 2: Resumen de los componentes de la MEC. Adaptado de (Cox & Erler, 2014)

Clases de moléculas de la MEC	Tipos
Colágenos fibrilares	Colágenos I, II, III, V, XI, XXIV y XXVII
Colágenos formadores de redes	Colágenos IV, VIII, X, XV y XVIII
Colágenos formadores de filamentos	Colágenos VI y XXVI
Colágenos asociados a fibrillas con triple hélice interrumpida	Colágenos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXII y XXII
Proteínas elásticas y microfibrilares	Elastina, fibrilinas, fibulinas,
Glicoproteínas	Fibronectina, fibrinógeno, laminina, matrilina, nidógenos, periostina, tenascina, vitronectina.
Proteoglicanos	Agrecano, brevicano, decorina, neurocano, perlecano, versicano
Otros componentes de la matriz	Hialuronano, galectinas, mucinas, hialuronano y proteínas de enlace de proteoglicanos

La MEC es dinámica al tener la capacidad de remodelarse y renovarse continuamente (Figura 16). Debido a sus propiedades biofísicas tales como la rigidez, tensión y densidad, la MEC juega un papel no solo como unidad de soporte del tumor, sino que también regula procesos celulares como son la proliferación, supervivencia, migración, invasión e incluso la morfogénesis de los tejidos o la resistencia a los tratamientos (Nia *et al.*, 2020; Yamada *et al.*, 2019). Existe una relación recíproca entre la MEC y las células que forman parte de esta estructura, tanto células estromales no malignas como tumorales. También, se ha demostrado que su densidad proporciona una barrera contra la infiltración de las células T (Salmon *et al.*, 2012). Por tanto, la MEC constituye una diana antitumoral que podría ayudar en la localización y migración de estas células inmunitarias (Henke *et al.*, 2020).

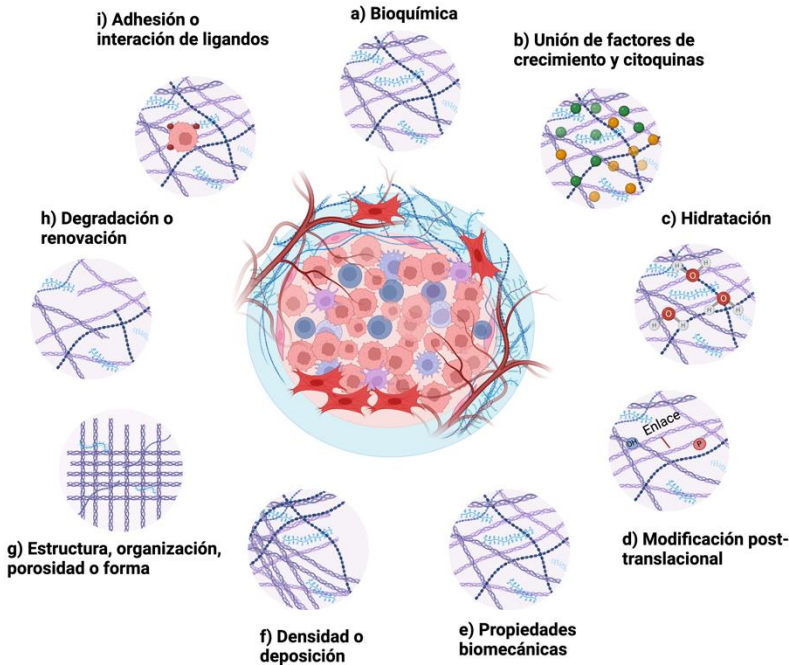


Figura 16: La progresión tumoral provoca cambios en la MEC a diferentes niveles.

(a) Las células estromales y las tumorales, provocan cambios en la bioquímica y composición de la MEC. (b) Los cambios afectan al secuestro de factores de crecimiento y citoquinas, (c) la hidratación, la difusión y perfusión de moléculas. (d) Las modificaciones postraduccionales de la matriz, como la hidroxilación provocan cambios en las propiedades biomecánicas de la MEC (e). (f) La alteración en la deposición de componentes de la MEC afecta a la densidad, desencadenando cambios en la estructura, organización y porosidad (g). (h) La degradación y renovación aberrantes de la matriz, altera el número y el espaciado de los ligandos de adhesión e interacción que se presentan en las células (i). Adaptado de (Cox & Erler, 2014).

Existen proteínas de la matriz que poseen dominios similares a los de los factores de crecimiento. Tras la degradación proteolítica, se vuelven solubles y pueden unirse a los receptores de factores de crecimiento induciendo su activación. Por ejemplo, el colágeno y la FN1 pueden activar una señalización del TGF- β /SMAD dependiente de la integrina, independiente del TGFB1 o del receptor del TGFB (Garamszegi *et al.*, 2010).

En situaciones normales, la regulación de la MEC depende en parte del equilibrio entre las MMPs y sus inhibidores tisulares (TIMPs). Las MMPs son enzimas degradadoras y remodeladoras de las proteínas de la matriz (colágenos, lamininas, FN1), así como moléculas no pertenecientes a la MEC (CDH1 o integrinas). Estas rompen las adhesiones célula-célula y célula-matriz, liberar citoquinas, factores de crecimiento, con lo cual, influyen en la integridad de la matriz y facilitan la migración e invasión de las células tumorales (Chuliá-Peris *et al.*, 2022). En tejidos malignos, las interacciones entre las células tumorales, CAFs, TAM (macrófagos asociados a tumores) y células madre tumorales, alteran el equilibrio MMPs-TIMPs (Sosa *et al.*, 2013).

La MEC tiene la capacidad de secuestrar factores de crecimiento y cationes. Esto promueve funciones tanto promotoras como supresoras del desarrollo y progresión tumoral. Un desequilibrio entre MMPs-TIMPs conlleva a una liberación desregulada de dichas moléculas que termina con la ruptura de los componentes de la matriz (Hynes, 2009; Vitale *et al.*, 2019). Por ejemplo, el aumento de la secreción de la MMP9 libera el VEGF y activa la angiogénesis (Hollborn *et al.*, 2007).

Por tanto, las moléculas de adhesión, los componentes de la MEC, las enzimas proteolíticas y sus inhibidores son cruciales para la comunicación entre las células tumorales y los componentes de la MEC. Cambios en los niveles de expresión de moléculas de adhesión y/o niveles elevados de MMP confieren a las células tumorales la capacidad de migrar más fácilmente, perturbando la arquitectura tisular normal y ejerciendo funciones moduladoras en la MEC. Es por tanto que la modulación de la MEC a través de los inhibidores de las MMP y el TGFB1, la reprogramación de los CAFs y la alteración de la señalización de las integrinas constituyen algunos de los enfoques prometedores en la regresión del tumor (Najafi *et al.*, 2019).

Las células endoteliales vasculares son esenciales en el crecimiento y progresión del tumor gracias a la formación de nuevos vasos sanguíneos. Su proliferación es estimulada por factores como el VEGF (Butler *et al.*, 2010; Dawei Yang *et al.*, 2021). A diferencia de la vasculatura normal, en el MAT suele estar desorganizada, lo que provoca variaciones locales en la oxigenación del tumor (Eales *et al.*, 2016; Harney *et al.*, 2015). Además, las células pasan de un metabolismo de fosforilación oxidativa a la glucólisis. Esto favorece que las células puedan sobrevivir en condiciones de hipoxia, además de aumentar la secreción de lactato que produce una disminución de pH consecuentemente (Damaghi *et al.*, 2015; Gatenby & Gillies, 2004).

Factores solubles secretados por las células tumorales o las estromales, como IL3, o el factor estimulador de colonias (CSF-1), reclutan los TAM hacia el MAT (Qian & Pollard, 2010; Tiwari *et al.*, 2022). Los TAM secretan factores de crecimiento y producen enzimas proteolíticas de la MEC que contribuyen a la diseminación del tumor y supresión de la inmunidad adaptativa antitumoral al expresar niveles elevados de ligandos de control como PD-L1 (Mantovani *et al.*, 2017; Pu & Ji, 2022; Umezu *et al.*, 2019). Además, la presencia de células inmunosupresoras derivadas de origen mieloide y las células T reguladoras (Treg) en el tumor interrumpen la vigilancia inmunitaria y promueven la vascularización del tumor gracias a la secreción de citoquinas y factores de crecimiento como TGFB1 o IL10 (Christoffersson & von Herrath, 2019; Scott *et al.*, 2021; Talmadge & Gabrilovich, 2013).

Por último, intervienen los CAFs, que explicaremos con más detalle en la siguiente sección, y que constituyen el núcleo de nuestro trabajo. Estas células son el componente predominante del estroma asociado al tumor y se activan por factores derivados del tumor como TGFB1, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Su activación provoca la secreción de proteínas remodelando la MEC, la modulación de la respuesta inmunitaria y la desregulación de la homeostasis (Costa *et al.*, 2018; Fane & Weeraratna, 2019). Además, los CAFs también promueven la angiogénesis mediada por la secreción de VEGF (Quail & Joyce, 2013).

El MAT tiene la capacidad de cambiar continuamente en respuesta a señales oncogénicas, favoreciendo la construcción de su propio nicho. Existen diferentes enfoques terapéuticos que buscan reprogramar las células del estroma del MAT para mejorar los efectos antitumorales y constituir terapias dirigidas al MAT (Quail & Joyce, 2013). Cabe destacar que los tratamientos dirigidos contra componentes del MAT resultan prometedores puesto que las células no tumorales tienen una naturaleza más estable que las tumorales (Y. Xiao & Yu, 2021). Sin embargo, en muchas ocasiones, los componentes del MAT presentan una amplia funcionalidad, lo cual dificulta su estudio. Las terapias frente a los componentes no tumorales del MAT deben dirigirse a los cambios fenotípicos relacionados con el cáncer para evitar posibles efectos adversos en las células sanas. Por tanto, es crucial el estudio de las diferencias entre las células que juegan un papel en desarrollo o bloqueo tumoral. En este contexto, en nuestro trabajo, trataremos de distinguir los fibroblastos normales (FNs) de los CAFs.

5. FIBROBLASTOS ASOCIADOS AL CÁNCER

Tal y como se anticipaba en apartados previos, los fibroblastos son el tipo de célula mayoritaria del tejido conectivo. Los fibroblastos favorecen la deposición de los componentes de la MEC, la regulación de procesos de diferenciación en las células epiteliales asociadas, la modulación de respuestas inmunitarias y la homeostasis tisular a través de la secreción de factores solubles (Kalluri & Zeisberg, 2006; Tomasek *et al.*, 2002). Se trata de células que expresan marcadores mesenquimales como la VIM, la α -SMA, la proteína de activación de fibroblastos (FAP), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- α) y/o la proteína específica de fibroblastos (FSP1 o S100A4) (R. Mishra *et al.*, 2019). No obstante, el principal hándicap para identificar esta población celular es su gran heterogeneidad.

A nivel funcional, los CAFs median la proliferación de las células tumorales, angiogénesis, invasión, metástasis y la resistencia a los fármacos en los tumores sólidos, mientras que los FNs promueven el fenotipo epitelial y suprimen la metástasis (Biffi & Tuveson, 2021; Dumont *et al.*, 2013; Kalluri, 2016a).

5.1. Origen de los CAFs

Para definir y comprender el papel de los CAFs en el MAT, debe considerarse el origen, las características morfológicas y los posibles biomarcadores (Kalluri, 2016a). Numerosos autores postulan que la fuente más directa de CAFs es la activación local de los FNs residentes (Bu *et al.*, 2019; Kalluri, 2016a; LeBleu & Kalluri, 2018).

Estos estudios coinciden que la activación de los CAFs se encuentra mediada en gran parte por una regulación epigenética más que por mutaciones genéticas (Ping *et al.*, 2021). Con todo esto, para diferenciar los CAFs de los FNs se emplean multitud de parámetros, incluyendo las características morfológicas, el aumento de la capacidad biosintética, secretora, los componentes de la MEC, enzimas remodeladoras, factores de crecimiento y citoquinas (Bu *et al.*, 2019; H. Du & Che, 2017; Kalluri, 2016a).

No obstante, otras células pueden ser activadas y reclutadas como precursores de los CAFs (Figura 17) (Liao *et al.*, 2019), aunque la ausencia de biomarcadores específicos dificulta conocer su origen. A continuación, se presentan los principales mecanismos alternativos de generación de CAFs (Kalluri, 2016a):

- **Transición endotelio-mesenquimal (EndMT):** las células endoteliales asociadas al tumor pueden adquirir potencial de diferenciación multipotente a través de los exosomas derivados del melanoma que permite desprenderse de los vasos sanguíneos (Yeon *et al.*, 2018) y la exposición con TGFB1 induce cambios fenotípicos hacia una morfología similar al fibroblasto (E. M. Zeisberg *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de que la contribución de la EndMT en la producción de CAFs aún no está completamente caracterizada, varios estudios indican que las células derivadas de este proceso comparten funciones con los CAFs como la cicatrización de heridas, promoción de la angiogénesis o la inducción de la polarización de monocitos en el cáncer de páncreas (Wawro *et al.*, 2018). Además, estas células sufren una pérdida de marcadores endoteliales, como el CD31, y un incremento de marcadores mesenquimales como la FSP y el α -SMA (E. M. Zeisberg *et al.*, 2007).

- **Transición epitelio-mesenquimal (EMT):** se ha observado que las células epiteliales pueden desdiferenciarse y adquirir características mesenquimales, expresando marcadores de los CAFs (Orr *et al.*, 2012; Petersen *et al.*, 2003). Estudios publicados han identificado alteraciones genéticas similares en las células tumorales y en las del estroma circundante, incluyendo los fibroblastos (Fukino *et al.*, 2004; Kurose *et al.*, 2002). Esto indicaría que algunas células tumorales epiteliales y un subconjunto de fibroblastos podrían compartir un origen común.
- **Células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (MSC):** estas células pueden diferenciarse en CAFs a través de la activación de receptor del PDGF y la estimulación del TGFB1 mediante la activación de la vía de señalización JAK/STAT3 y posterior expresión de α -SMA (Aoto *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2019).

Numerosas evidencias experimentales señalan otros orígenes de los CAFs, como son las células madre hematopoyéticas, células madre tumorales (Abangan *et al.*, 2010; Ning *et al.*, 2018); adipocitos donde la aproximación de las células tumorales y la estimulación provoca cambios fenotípicos caracterizados por una mayor expresión de FN1, COL1A1 o FSP1 (Bochet *et al.*, 2013); pericitos a través de la modulación del PDGFR (Hosaka *et al.*, 2016); y células estrelladas a través del eje CXCR4/TGFB1 tras el cocultivo con células tumorales (Tan *et al.*, 2020).

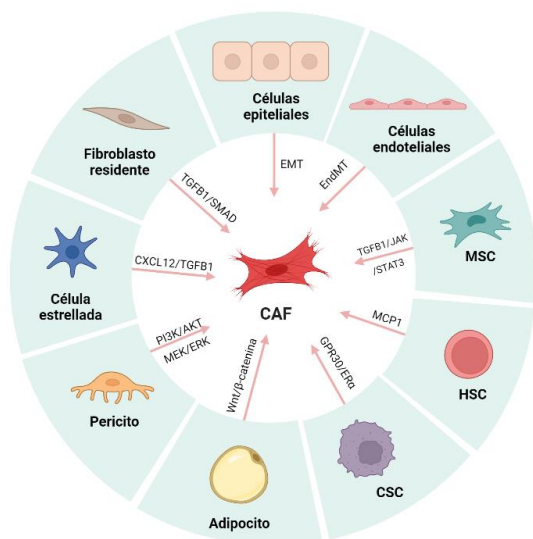


Figura 17: Origen de los CAFs. El origen de los CAFs es diverso y complejo. Los CAFs pueden derivarse de fibroblastos residentes, células epiteliales, CSCs (células madre cancerosas), células endoteliales, MSCs derivadas de la médula ósea, HSCs (células madre hematopoyéticas), adipocitos, pericitos y células estrelladas. Cada tipo de célula puede dar lugar a los CAFs a través de la activación de vías de señalización específicas. Adaptado de (Ping *et al.*, 2021).

5.2. Heterogeneidad de los CAFs

5.2.1. Activación de los CAFs

El papel fisiológico de los fibroblastos es conocido en la respuesta a la cicatrización de las heridas, tanto en lesiones tisulares agudas como en lesiones crónicas, donde la activación continua de los fibroblastos y el depósito excesivo de componentes de la MEC puede deteriorar la función orgánica (Koliaraki *et al.*, 2020; Tomasek *et al.*, 2002). En el contexto del cáncer, los fibroblastos adquieren características similares a los de la fibrosis tisular y, además, establecen comunicaciones recíprocas con las células tumorales (Dakai Yang *et al.*, 2023). Numerosas evidencias afirman que los CAFs

presentan un papel antitumoral temprano como respuesta a la lesión epitelial (Kalluri, 2016). No obstante, la estimulación continua puede provocar una inflamación crónica y alteración de la regeneración funcional del tejido (M. Zeisberg & Kalluri, 2013). La activación sostenida promueve el crecimiento, migración e invasión tumorales gracias a procesos de reprogramación y remodelación del MAT, caracterizada por una desmoplasia del estroma con aumento de depósito de MEC y, en última instancia, aparición de metástasis y resistencia terapéutica (Kuzet & Gaggioli, 2016).

El mecanismo de activación de los CAFs es diverso y complejo y sigue siendo en gran medida desconocido, aunque la reprogramación epigenética contribuye a este estado de activación sostenida (Albregues *et al.*, 2015). Por ejemplo, estados de hipermetilación del promotor de *RASAL1* que codifica un inhibidor de la oncoproteína RAS favorecen la fibrosis renal al activar de forma continuada los fibroblastos (Bechtel *et al.*, 2010). También existen estados de hipometilación que pueden impulsar la regulación de los genes asociados al secretoma de los CAFs; o la senescencia de los fibroblastos asociada a la secreción de factores pro-tumorigénicos que pueden activar a los CAFs (L. Jiang *et al.*, 2008).

La plasticidad de los CAFs puede ser inducida a través de factores de crecimiento y citoquinas como el TGFB1, la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP1), el PDGF, FGF, IL6, IL1, MMP y las especies reactivas de oxígeno secretadas por células tumorales o inmunitarias (Figura 18) (Marsh *et al.*, 2013; Yoon *et al.*, 2021). Además, los cambios estructurales que experimenta el MAT durante el crecimiento tumoral, como son el aumento de rigidez del estroma y las tensiones mecánicas, pueden alterar la disposición de las fibras de colágeno y activar la contractilidad y secreción de componentes de la MEC de los CAFs (Nia *et al.*, 2020; Samuel *et al.*, 2011). Con todo esto,

se desarrollan diferentes subpoblaciones de CAFs dando lugar a la gran característica de este tipo celular, la heterogeneidad (Biffi *et al.*, 2019).

En ocasiones, la activación de los fibroblastos en CAFs a través de la estimulación del factor de crecimiento TGFB1 conduce hacia la diferenciación de uno de los fenotipos más conocidos, el miofibroblasto. Se conoce como Transición Fibroblasto Miofibroblasto (FMT). Este fenotipo se caracteriza por una mayor expresión de α -SMA, FSP1, VIM, entre otros marcadores mesenquimales, así como una mayor actividad del citoesqueleto contráctil (Bremnes *et al.*, 2011; Dakai Yang *et al.*, 2023). De este modo, se observa cómo existen grandes similitudes con el proceso de EMT que sufren los carcinomas epiteliales, siendo el TGFB1, a su vez uno de los principales factores de activación.

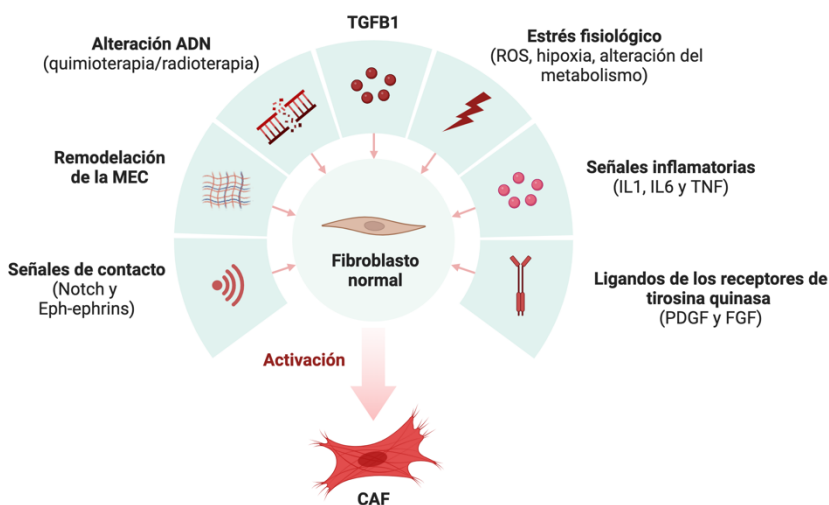


Figura 18: Activación de los CAFs por múltiples mecanismos. Los fibroblastos se activan en respuesta a una lesión tisular y a los estímulos asociados para facilitar la reparación y la regeneración. El esquema resume algunos de los factores y citoquinas que pueden inducir la activación de los CAFs. Adaptado de (Kalluri, 2016; Sahai *et al.*, 2020).

5.2.2. Heterogeneidad funcional de los CAFs

El estudio de la heterogeneidad funcional de los CAFs ha cobrado notable interés en los últimos años debido a que las variaciones en la composición del estroma no solo dan forma a la arquitectura intratumoral, sino que también contribuye a cambios funcionales en las células tumorales.

Además de la MEC, los CAFs activados secretan proteínas extracelulares (colágeno, lamininas, elastina), enzimas de remodelación (Lisil oxidasa (LOX), MMP, TIMP), factores de crecimiento y/o citoquinas (TGFB1, VEGF, PDGFs, prostaglandina E2 (PGE2)) (Alexander & Cukierman, 2016). Los CAFs pueden establecer un ciclo de retroalimentación positiva con las células tumorales, manteniéndose en un estado de activación continuada (Figura 19) (Sun *et al.*, 2022; Wong *et al.*, 2022). A continuación, se describen los principales efectos producidos por la interacción bidireccional de CAFs con las células tumorales:

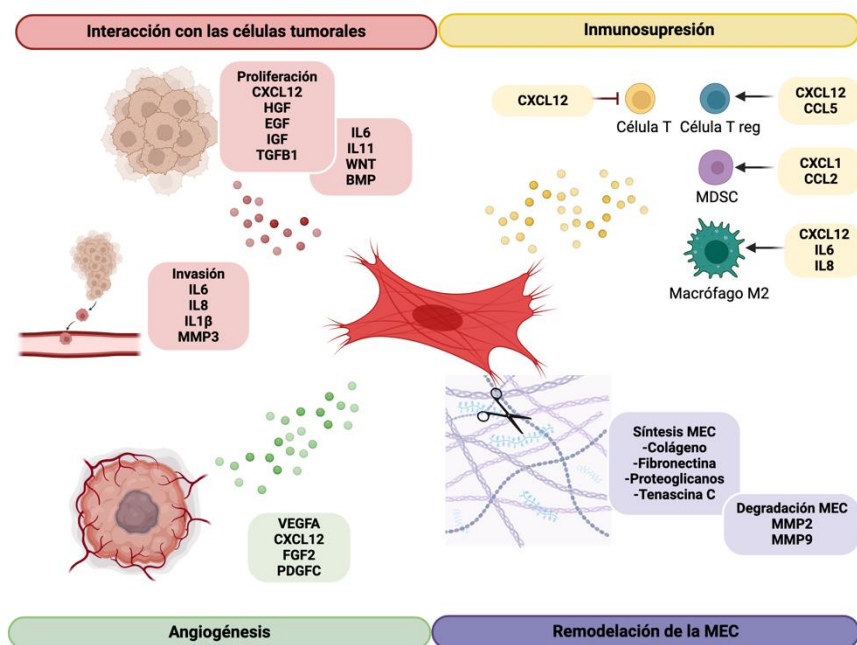


Figura 19: Heterogeneidad funcional de los CAFs en la progresión del cáncer. Los CAFs promueven la proliferación, la invasión, la metástasis y la vascularización a través de la secreción de factores de crecimiento celular y regulan la angiogénesis, el reclutamiento y polarización de células inmunitarias mediante la secreción de citoquinas y quimiocinas. La producción y remodelación de la MEC mediada por los CAFs juega un papel clave en la promoción de tumores. Adaptado de LI

- **Proliferación y crecimiento:** diferentes estudios demuestran que el cocultivo de células tumorales con CAFs pulmonares promueven la proliferación celular a través de la secreción de citoquinas y factores de crecimiento de forma autocrina y paracrina, tales como TGFβ1, CXCL12, PDGF o IL6, que estimula el crecimiento de las células tumorales a través de la señalización JAK/STAT3 (P. Mishra *et al.*, 2011; Mukaida *et al.*, 2014; Ramachandran *et al.*, 2021; Vicent *et al.*, 2012; Wald *et al.*, 2011).

- **Invasión y metástasis:** los factores solubles secretados por los CAFs en los medios condicionados *in vitro* pueden potenciar la capacidad invasiva de las células tumorales (Izumi *et al.*, 2016). Por otra parte, los CAFs pueden mediar dicha migración a través de la remodelación de la MEC, creando brechas que facilitan el camino a las células tumorales y disminuyendo su fuerza de adhesión (Gaggioli *et al.*, 2007). Los CAFs sintetizan proteínas estructurales como el colágeno tipo I y IV, factores de crecimiento del tejido conectivo y factores digestivos como son las MMPs y activadores de plasminógeno. Las MMPs juegan un papel importante en múltiples funciones del estroma tumoral como es la invasión, la angiogénesis, la regulación de la inflamación y la preparación del nicho metastásico (Kessenbrock *et al.*, 2010). En este sentido, los CAFs contribuyen a generar fuerzas directas a través de la MEC, estirando los espacios preexistentes y generando una membrana basal permisiva para la invasión tumoral (Torok, 2018). Además, los CAFs mediante la secreción de factores como el TGFB1 o la IL6 son capaces de activar la EMT de las células tumorales (L. Wang *et al.*, 2017).
- **Angiogénesis:** Los CAFs expresan distintas moléculas reguladoras de la angiogénesis como el VEGFA, así como factores proangiogénicos como CXCL12, PDGF-C o FGF2, lo que permite el crecimiento y metástasis del tumor (De Palma *et al.*, 2017).
- **Escape inmunitario:** se ha demostrado que los CAFs desempeñan un papel fundamental en la regulación del sistema inmunitario a través de la liberación de citoquinas y factores de crecimiento. En el cáncer de próstata, se ha descrito que los CAFs provocan una polarización de los macrófagos a un fenotipo promotor de tumores (TAM) al secretar IL6,

CXCL12 y TGFB1 (A. Zhang *et al.*, 2017). Además, los CAFs pueden tener efecto inmunosupresor por la expresión de CXCL12 (Daniel *et al.*, 2020). En la base de datos del carcinoma de células escamosas de pulmón del Atlas del Genoma del Cáncer, se encontraron una sobreexpresión de IL1, IL6, IL10, PDGF-B, CCL2, o del CSF1 (Wong *et al.*, 2022). Los CAFs son capaces de inducir a las MDSC a través de CCL2, lo cual inhibe la producción de interferón γ (IFN γ) de las células T CD8⁺ favoreciendo la supresión de la proliferación celular (Xiang *et al.*, 2020). Además, los CAFs pueden aumentar la expresión de PD-L1 a través de las citoquinas IL8 o CXCL2 (Inoue et al, 2019).

- **Cambios metabólicos en los CAFs y progresión tumoral:** La interacción entre las células tumorales y los CAFs reprograma el metabolismo tumoral hacia la glucólisis aeróbica. Como consecuencia, los CAFs secretan metabolitos como el lactato y piruvato que serán absorbidos por las células tumorales, facilitando las necesidades metabólicas como fuentes de carbono alternativas (Zhenzhen Li et al, 2021). Además, se han observado alteraciones en el metabolismo de los lípidos y aminoácidos, con el aumento en la utilización de glutamina, crucial para el desarrollo de sus funciones protumorales (Koundouros & Poulogiannis, 2020; Mestre-Farrera et al, 2021).
- **Papel en la resistencia a fármacos antitumorales:** se han demostrado algunos mecanismos por los que los CAFs pueden ayudar a las células tumorales en la adquisición de resistencia a los tratamientos. En primer lugar, se destaca la barrera física. Los CAFs aumentan la expresión de proteínas que forman parte de la MEC, hecho que aumenta la rigidez de la MEC y la dificultad de acceso de los fármacos a las células diana (Najafi et al, 2019). El aumento de la tensión mecánica que ejercen los

CAFs puede colapsar los vasos sanguíneos, provocando hipoxia y comprometiendo la eficacia de los tratamientos (Dufort et al, 2016; Jain et al, 2014). Por otro lado, en la resistencia adquirida a ITQs del EGFR se ha identificado al HGF y al FGF7, que pueden reactivar las vías de señalización de EGFR como es la vía PI3K-AKT y MAPK independiente de estos receptores (H. Hu et al, 2021).

Los CAFs presentan diferentes perfiles transcriptómicos en cada órgano, incluso dentro de un mismo tipo de tumor (Öhlund et al, 2017; Rinn et al, 2006). La heterogeneidad de los marcadores en distintos tipos de tumores y su expresión en tejidos normales dificultan la identificación del papel de los CAFs y sus propiedades en el cáncer (Cortez et al, 2014; Council & Hameed, 2009). Por tanto, la identificación de los CAFs requiere del uso de múltiples marcadores.

5.2.3. Subpoblaciones principales de CAFs

En la actualidad, las técnicas de secuenciación de ARN de células individuales (del inglés *single cell RNA sequencing*, en adelante *scRNA-seq*) aplicado a los CAFs intratumorales, así como la caracterización de sus orígenes, ha llevado a la identificación de diferentes subtipos en el cáncer de pulmón, mama y páncreas, entre otros (Cords et al, 2023; Elyada et al, 2019; Lambrechts et al, 2018; Öhlund et al, 2017). De este modo, los primeros estudios clasificaron a los CAFs en dos poblaciones: mioCAFs, con fenotipo miofibroblasto e iCAFs con capacidad reguladora de la inflamación (Öhlund et al, 2017). En el cáncer de páncreas, los CAFs próximos a los focos tumorales presentaron mayoritariamente un fenotipo mioCAF, caracterizados por una mayor expresión de α -SMA, colágeno, mayor capacidad contráctil, adhesión focal y por tanto, un papel en la remodelación de la MEC, cuya activación es

inducida por la FMT, donde el TGFB1 juega un papel clave (Elyada et al, 2019; Penke & Peters-Golden, 2019; Shi et al, 2020). Sin embargo, los CAFs más alejados de la zona tumoral presentaban una mayor expresión de citoquinas y quimioquinas (IL6, IL8, CXCL1, CXCL2, CXCL12, entre otras) y un incremento en las vías inflamatorias NF- κ B y JAK/STAT3 (Figura 20) (Bartoschek et al, 2018; Elyada et al, 2019; Lavie et al, 2022). Además, se ha determinado que estos dos fenotipos son dinámicos e interconvertibles a través de la estimulación de diferentes vías (Elyada et al, 2019). Este hecho respalda la hipótesis de que las subpoblaciones de CAFs tienen un alto potencial de plasticidad, lo que justifica inducir cambios fenotípicos como estrategia para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer (Dakai Yang et al, 2023).

Recientemente se identificó una nueva población de CAFs (CAF presentador de antígeno o apCAF) caracterizada por una expresión de genes relacionados con el MHC de clase II, confiriendo funciones inmunomoduladoras (Elyada et al, 2019).

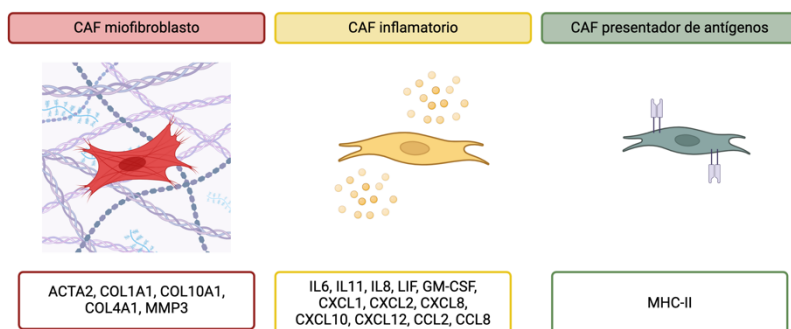


Figura 20: Principales subpoblaciones de CAFs. Adaptado de (Lavie et al, 2022).

Por otro lado, en el caso del cáncer de mama, se han identificado CAFs con elevada expresión de FAP, así como de proteasas de serina que participan en la remodelación de la MEC y la fibrogénesis, además de presentar un papel

inmunosupresor mediado por las células Treg (C. Han *et al.*, 2020). Otros estudios de *scRNA-seq* en cáncer de mama han encontrado otras subpoblaciones como los CAFs vasculares (vCAFs) caracterizados por el marcador nidogen-2 o CAFs de matriz (mCAFs) que expresan el marcador PDGFR- α (H. Li *et al.*, 2017).

En el CPNM, Lambrechts *et al.* analizaron las células estromales derivadas de tejidos tumorales y tejidos pulmonares no tumorales mediante *scRNA-seq* e identificaron siete subpoblaciones moleculares de fibroblastos, donde cinco de ellas eran características de tejidos tumorales. Una de estas subpoblaciones presentaba características EMT y expresión de genes asociados al TGF β 1; otra subpoblación se caracterizaba por mayor expresión de *ACTA2* junto con genes involucrados en miogénesis y angiogénesis, pudiendo clasificarse como mioCAFs; y dos de los otros cinco subtipos presentaban mayor expresión de genes relacionados con la glucólisis (Lambrechts *et al.*, 2018).

En definitiva, la literatura nos demuestra que la clasificación de los diferentes subtipos de CAFs es compleja y depende del estadio, ubicación tisular, características y tipo de cáncer. De este modo, es crucial el estudio de la heterogeneidad de los CAFs para establecer una terminología de consenso y una comprensión más profunda de su papel en la remodelación del MAT y la progresión tumoral. Este conocimiento será fundamental para establecer mejoras en terapias futuras basadas en la modulación de aquellas subpoblaciones de CAFs que más intervengan en la progresión tumoral y especialmente, en el contexto de las resistencias a terapias dirigidas frente a ITQs de EGFR, constituyendo el eje central de este trabajo.

6. NICOTINAMIDA N-METILTRANSFERASA

6.1. Expresión y funciones de la NNMT

La nicotinamida N-metiltransferasa (NNMT) es una enzima metabólica originalmente identificada como responsable en la eliminación de la vitamina B3. La NNMT cataliza la N-metilación de la nicotinamida (NAM, una de las formas de la vitamina B3) y otras piridinas (Alston & Abeles, 1988), utilizando el donante universal metilo S-adenosilmetionina (SAM) (S. C. Lu, 2000; Pissios, 2017). La transferencia de un grupo metilo forma el producto metabólicamente inerte 1-metil nicotinamida (1-MNA) y la S-adenosil homocisteína (SAH) (Palanichamy et al, 2017).

El gen que codifica la NNMT humana se localiza en el cromosoma 11 y codifica para una proteína citoplasmática con un peso molecular de 29 kDa (Hanazawa *et al.*, 1994). En condiciones fisiológicas, la NNMT se expresa principalmente en el hígado (J. Xu *et al.*, 2003), siendo baja en el cerebro, pulmón, corazón, riñón, músculo esquelético y la placenta (G. Liang et al, 2023). Por el contrario, se ha observado una elevada expresión en el cerebelo y el núcleo caudado de pacientes con enfermedad de Parkinson, EPOC, y/o algunos tipos de cáncer (K. Y. Liu et al, 2015; X. M. Lu & Long, 2018).

Además, la función de la NNMT estaba relacionada con la biotransformación y detoxificación de múltiples fármacos y compuestos xenobióticos, así como la regulación de los niveles intracelulares de NAM (Brachs et al, 2019). El estudio del papel de la NNMT se ha centrado en la regulación de vías metabólicas en las células adiposas y hepáticas gracias al consumo y formación de metabolitos (Pissios, 2017). La NNMT ejerce un papel

aparentemente contradictorio en el hígado y en el tejido adiposo, donde sus niveles se correlacionan con rasgos metabólicos opuestos. En concreto, la expresión hepática de NNMT mejora los parámetros lipídicos, mientras que la alta expresión de NNMT en el tejido adiposo se correlaciona con un mayor nivel de grasa corporal y una mayor resistencia a la insulina (Trammell & Brenner, 2015).

En la actualidad, existe un especial interés en el estudio del papel de la NNMT en las adaptaciones metabólicas que ocurren en el MAT y su implicación en los procesos protumorales. La NNMT se ha observado incrementada en diferentes tipos de cánceres y numerosos estudios afirman que podría utilizarse como herramienta de diagnóstico temprano y no invasivo (Pozzi et al, 2018; Sartini et al, 2012, 2013). De hecho, la sobreexpresión de la NNMT está relacionada con un mal pronóstico en diferentes cánceres como el CPNM, de mama u ovario, entre otros (S. Li et al, 2018; Sartini et al, 2015). El silenciamiento de la NNMT favorece la apoptosis de las células tumorales de cáncer de mama y disminuye la tumorigenicidad de las células de CPNM (Sartini et al, 2015). En el cáncer gástrico, se ha establecido una correlación de la NNMT con el grado de infiltración inmunitaria (Wu *et al.*, 2020). También puede promover el crecimiento de las células del cáncer colorrectal y aumentar la resistencia al tratamiento con 5-fluorouracilo a través de la producción de 1-MNA (Xie et al, 2014, 2016). Además, se ha estudiado el papel de la NNMT como un biomarcador sérico y sensible a la detección en el cáncer colorrectal (Song et al, 2020). En el cáncer gástrico se ha observado que la sobreexpresión de NNMT se relaciona con una mayor expresión de TGFB1 y una inducción del programa EMT (L. Liang et al, 2018). Esta enzima también interviene en la regulación de la resistencia a los inhibidores de EGFR en el CPNM. La sobreexpresión NNMT incrementa la expresión de *MYC* vía SIRT1,

una desacetilasa dependiente de NAD^+ (J. Wang et al, 2022; Y. Wang et al, 2019).

La expresión de la NNMT está implicada en la fosforilación de AKT (Tang et al, 2011; M. G. Thomas et al, 2013). Esto potencia la señalización pro-oncogénica dentro de la célula y promueve la metástasis (Tang et al, 2011), la inhibición de la apoptosis (Parsons & Facey, 2021; J. Zhang *et al.*, 2014), la aparición de la resistencia a los fármacos (Jabbarzadeh Kaboli *et al.*, 2020; Milani *et al.*, 2013) y el apoyo a la glucólisis mediante el aumento de la expresión de la hexoquinasa (Wallace, 2005).

En conjunto, la NNMT interviene en la regulación de procesos celulares, que producen un cambio metabólico celular con una glucólisis aumentada y un mantenimiento de la síntesis de NAD^+ . Todo ello favorece la inducción de procesos pro-oncogénicos (Figura 21) (Y. Gao *et al.*, 2021; Parsons & Facey, 2021).

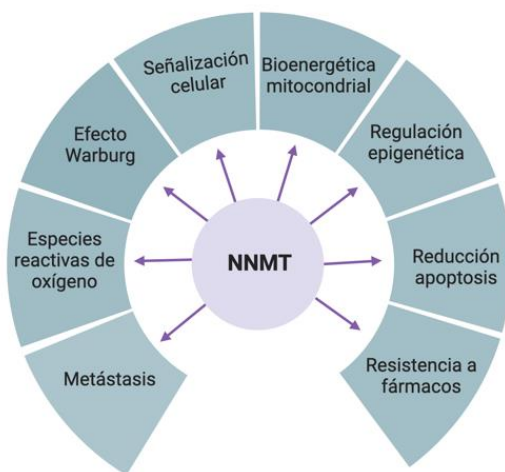


Figura 21: Resumen de los efectos celulares pro-oncogénicos de la NNMT. Adaptado de (Parsons & Facey, 2021).

6.2 Regulación de la expresión de NNMT

Hace ya unos años, se planteó que la activación del factor nuclear hepático-1 β (HNF1 β) potenciaba la sobreexpresión de la NNMT en las células de cáncer papilar de tiroides (J. Xu *et al.*, 2005). También se demostró que la NNMT y su actividad catalítica podían ser reducidas por el inhibidor depsipéptido de la histona desacetilasa (J. Xu & Hershman, 2006). En el tejido adiposo, se ha observado que la disponibilidad de glucosa regula la expresión de NNMT (Ehebauer *et al.*, 2020). Además, durante el proceso de restricción calórica los niveles de NNMT se incrementan tanto en hígado como en músculo, lo que sugiere que la NNMT podría funcionar como un sensor de energía (Hong *et al.*, 2015; Ström *et al.*, 2018). Se ha identificado que las vías de señalización de los transductores y activadores de STAT3 (Tomida *et al.*, 2008), y del NF- κ B (S. Hsu *et al.*, 2012; L. Liang *et al.*, 2018) son importantes en la sobreexpresión de NNMT en los tumores, donde niveles elevados de esta enzima aparecen asociados al programa EMT (L. Liang *et al.*, 2018; W. Zhang *et al.*, 2022).

6.3. Principales rutas metabólicas asociadas a la NNMT

La NNMT es la principal enzima metabolizadora de la NAM, precursora de NAD⁺. El NAD⁺ es el cofactor mejor conocido por donar electrones al complejo mitocondrial I en la cadena de transporte de electrones y un factor de varias enzimas del metabolismo de la glucosa (Rich & Maréchal, 2010). El NAD⁺ también es un sustrato para varias enzimas como sirtuínas y las poli-ADP-ribosiltransferasa (PARP) que desempeñan un papel en la regulación epigenética y el metabolismo energético (Haigis & Guarente, 2006; Wątroba *et al.*, 2017).

En la Figura 22 se resumen las interconexiones entre el ciclo de la metionina, principal productor de SAM (y de capacidad antioxidante en forma de glutatión reducido, GSH), la síntesis de poliaminas, el metabolismo del folato y la biogénesis del NAD^+ a partir de nicotinamida, cofactor esencial para la biosíntesis y energía (Yaku *et al.*, 2018).

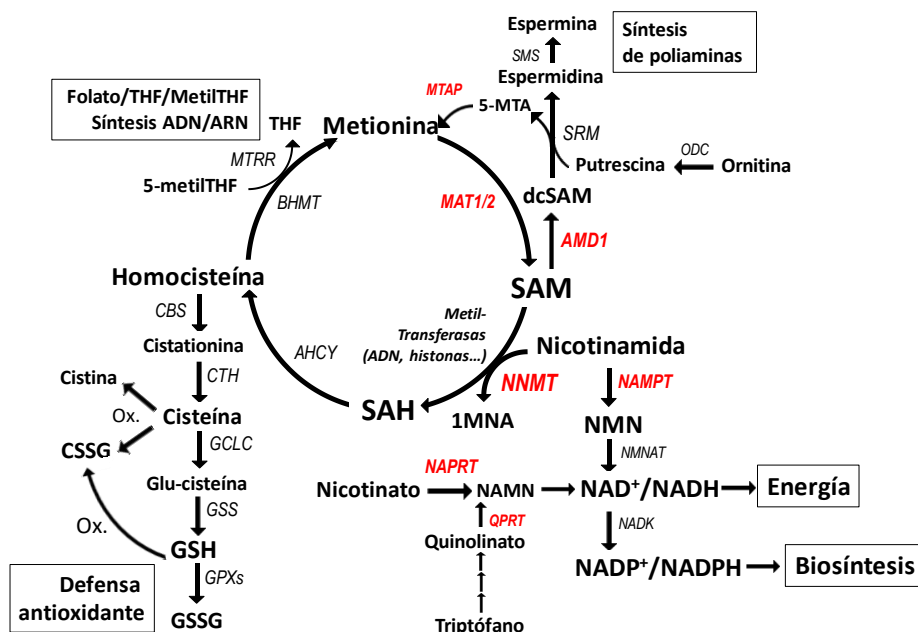


Figura 22: Principales rutas metabólicas en las que está implicada la NNMT. El ciclo de la metionina alimenta importantes rutas metabólicas como la síntesis de ácidos nucleicos (metabolismo del folato), la defensa antioxidante (mediada por el antioxidante GSH o glutatión reducido) o las reacciones de metilación de ADN y proteínas (aportando SAM, principal dador de metilos), y está conectado con el metabolismo del dinucleótido de nicotinamida y adenina NAD^+ , esencial para la producción de NAD^+ (y la biosíntesis de macromoléculas como los lípidos) y energía en las mitocondrias. La NNMT consume SAM para dar 1-MNA, y su hiperactividad depleciona tanto la capacidad metiladora como la nicotinamida, comprometiendo así el pool intracelular de NAD^+ en algunos modelos experimentales. En rojo se han destacado las enzimas que se estudiarán en este proyecto (Figura tomada de la Tesis Doctoral de Inés Pulido “Análisis genómico funcional de la resistencia a las terapias anti-EGFR asociada al fenotipo mesenquimal en el cáncer pulmonar”, Universidad de Valencia, 2017).

Además del metabolismo de NAM y SAM, el 1-MNA puede aumentar directamente la expresión de la proteína Sirt1 (Hong *et al.*, 2015). *SIRT1* es un regulador de la gluconeogénesis y de la síntesis de colesterol y está estrechamente relacionado con el metabolismo del NAD⁺ (Erion *et al.*, 2009). En condiciones fisiológicas, el NAD⁺ se convierte en NAM a través de sirtuinas y la poli-ADP-ribosiltransferasa (PARPs) (Covarrubias *et al.*, 2020). Tanto las sirtuinas como las PARPs rompen el NAD⁺ y liberan NAM que inhibe su actividad enzimática (Bockwoldt *et al.*, 2019). La NNMT previene la acumulación de NAM y su efecto inhibitorio sobre las enzimas dependientes de NAD⁺. Los cambios en la actividad de NNMT podrían influir potencialmente en los niveles intracelulares de NAM y NAD⁺ y en la actividad de múltiples enzimas (Roberti *et al.*, 2021). Por lo tanto, la NNMT interviene en múltiples rutas metabólicas y tiene un papel destacado en el metabolismo del cáncer a través de diferentes vías.

6.3.1. Relación entre el metabolismo y la reprogramación epigenética

Diversos estudios han demostrado que el metabolismo celular presenta un impacto en las vías de señalización que, en última instancia, regulan la expresión génica mediante cambios dinámicos en el estado de la cromatina (Thakur & Chen, 2019). Las células tumorales reprograman las vías de obtención de nutrientes con el fin de satisfacer las demandas de proliferación celular descontrolada (Bose *et al.*, 2020). Algunos metabolitos intermedios obtenidos en la fosforilación glucolítica y oxidativa sirven como cofactores o sustratos de enzimas implicadas en la modificación postraduccional y la expresión génica (Xiao Yu Li *et al.*, 2022). Uno de los principales procesos epigenéticos regulados por los cosustratos generados por el metabolismo celular son las modificaciones post-traduccionales de las histonas, como son

la acetilación y la metilación (Simithy *et al.*, 2017). Al influir en la estructura de la cromatina, se modulan la accesibilidad de los genes y su estado transcripcional, lo que proporciona un vínculo entre el metabolismo y la regulación de la expresión génica (Fan *et al.*, 2015).

En el contexto del cáncer, cuando la actividad NNMT es elevada, la cesión de metilos por parte de la SAM a histonas o ADN está comprometida. Esto provoca un efecto “sumidero de metilos” en forma de 1-MNA, conduciendo al agotamiento de la SAM y reduciendo el potencial de metilación global de las células. El estado de la cromatina depende de la actividad y el nivel de enzimas modificadoras de esta, como son las metiltransferasas de ADN y las desacetilasas de histonas. Esta situación provoca un estado de hipometilación y grandes cambios metabólicos y epigenómicos que regulan la expresión de múltiples genes (Y. Gao *et al.*, 2021; Haws *et al.*, 2020; Kaelin & McKnight, 2013; C. Lu & Thompson, 2012; Song *et al.*, 2020).

Se ha observado que la NNMT controla la actividad de la proteína supresora de tumores fosfatasa 2A (PP2A) al influir en su estado de metilación (Palanichamy *et al.*, 2017). Al disminuir el equilibrio de donantes de metilo, las células que sobreexpresan NNMT muestran una considerable reducción en PP2A metilada, con la consiguiente inactivación de proteínas que, a su vez, promueve la activación basal de la vía ERK y una expresión alterada de varios genes como *SNAI2* o *TGFB2* (Ulanovskaya *et al.*, 2013). Eckert y colaboradores determinaron que la NNMT estromal podría regular transcripcionalmente la expresión génica al afectar a la histona 3 H3K4me3 y H3K27me3 en las regiones promotoras de los genes (Eckert *et al.*, 2019). En el carcinoma escamoso de esófago, la elevada expresión de NNMT conduce a una disminución en la modificación de H3K4me3 en el promotor de *CDH1* así como una inhibición de la modificación m6A del ARNm de *CDH1*. De este

modo, la NNMT promueve la EMT inhibiendo la expresión de la CDH1 a nivel transcripcional y post-transcripcional (Q. Huang *et al.*, 2024). Además, la NNMT actúa como un regulador metabólico que puede ajustar el estado de metilación de las células tumorales (Roberti *et al.*, 2021).

6.4 La NNMT en el estroma tumoral

La revolución en la investigación del MAT ha impulsado el estudio del papel de la NNMT en el estroma tumoral, más concretamente, en los CAFs. En el cáncer de ovario, la NNMT del estroma actúa como un regulador metabólico. Además, parece ser fundamental para impulsar el fenotipo CAF y, por consiguiente, tiene un papel protumorigénico en el estroma tumoral (Eckert *et al.*, 2019). En los cánceres colorrectales y gástricos, la NNMT estromal se postula como un prometedor biomarcador de pronóstico al presentar una correlación positiva con los estadios TNM avanzados (Song *et al.*, 2020; L. Zhang *et al.*, 2021). Todas estas evidencias que relacionan la NNMT del estroma con la progresión tumoral en diferentes tipos de cáncer justifican la necesidad de estudiar esta proteína en el contexto del CPNM, objetivo de esta tesis doctoral.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La heterogeneidad de los CAFs en el CPNM requiere de la identificación de marcadores que permitan su correcta clasificación y caracterización funcional para establecer su papel en la remodelación del MAT, la progresión tumoral y la resistencia a las terapias.

La NNMT de las células tumorales y del estroma de otras neoplasias es importante en el desarrollo tumoral. La hipótesis de este trabajo fue que la NNMT estromal regula el fenotipo miofibroblasto asociado a la progresión tumoral y la resistencia a los ITQs de EGFR en el CPNM dirigido por mutaciones en *EGFR*. Para validar esta hipótesis planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Obtener y caracterizar el fenotipo *in vitro* de una colección de FNs y CAFs aislados de biopsias quirúrgicas procedentes de pacientes con CPNM.
- Evaluar el efecto de la estimulación de estos cultivos primarios de fibroblastos con el factor pro-FMT TGFB1.
- Examinar la expresión y localización de α -SMA y NNMT y el volumen de tumor ocupado por el estroma en las biopsias quirúrgicas obtenidas de pacientes con CPNM mediante técnicas inmunohistoquímicas y su correlación con las covariables clínicas.
- Modular la expresión de NNMT en los CAFs de CPNM mediante vectores lentivirales con secuencias de silenciamiento y analizar su contribución en el fenotipo miofibroblasto.
- Estudiar el MAT *in vitro* utilizando cocultivos bidimensionales y tridimensionales de CAFs con células de CPNM *EGFR* mutantes.

- Evaluar el impacto de la inhibición de la NNMT en la resistencia de las células tumorales de CPNM a los ITQs en los cocultivos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELO EXPERIMENTAL Y MUESTRAS CLÍNICAS

Los estudios se llevaron a cabo en cultivos primarios de fibroblastos aislados de biopsias quirúrgicas de pacientes con CPNM y subtipo adenocarcinoma, en estadios iniciales mayoritariamente (ver sección Resultados y Discusión, Tabla 17). Un total de 39 pacientes fueron sometidos a intervención quirúrgica con la finalidad de extirpar el tumor pulmonar en el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario de La Ribera (Alzira, Valencia). Se obtuvieron muestras pareadas de FNs aislados del tejido normal adyacente al tumor (fibroblastos del grupo control), y CAFs aislados del tejido tumoral de cada uno de los pacientes. Esto permitió establecer comparaciones intrapaciente entre ambos grupos de fibroblastos y permitió contrastar los resultados *in vitro* con los hallazgos o variables clínicas de dichos pacientes.

Cabe destacar que la obtención de las muestras fue anterior a la administración del tratamiento con el agente quimioterápico, ya que en muchos pacientes solo se realizó la cirugía torácica. No obstante, en algunos de los pacientes que sufrieron recaídas se realizó el estudio genético de las biopsias para la clasificación de las mutaciones en *EGFR/KRAS/BRAF/MLL4-ALK* o *ROS* y la posterior administración de la terapia dirigida (ver sección Resultados y Discusión Tabla 17).

El proyecto fue aprobado por el “Comité Ético del Hospital Universitario de la Ribera” y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para su reclutamiento y posterior uso de las muestras biológicas.

También se emplearon las líneas celulares HCC4006 y HEK 293 LTV. Las células HCC4006 son una línea tumoral de adenocarcinoma pulmonar con

EGFR mutado (delección del exón 19 procedentes de la *American Type Culture Collection* (ATCC) (Figura 23). Esta línea celular fue marcada con la molécula fluorescente *mCherry* (roja) para poder identificar las células tumorales y distinguirlas de los fibroblastos en los estudios de cocultivo. HEK 293 LTV es una línea embrionaria de riñón que se utilizó para el empaquetamiento de partículas lentivirales.

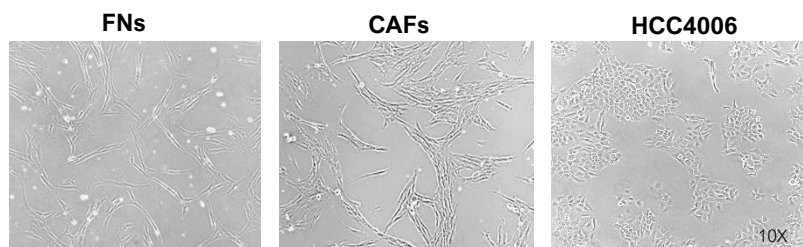


Figura 23: Imágenes de la morfología de las líneas celulares empleadas.

En el estudio inmunohistoquímico se analizaron los bloques de tejido parafinado de 27 pacientes de adenocarcinoma pulmonar, algunos de los cuales también fueron empleados para los estudios *in vitro* (N=20). El análisis se llevó a cabo en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Quirón de Valencia (Patológica Laboratorio S.L.) y contó con la ayuda inestimable del patólogo Dr. Javier Alcácer. A partir de las historias clínicas de los pacientes, se recopilaron las fechas de cirugía y seguimientos de la evolución clínica y se calcularon los siguientes parámetros clínicos: supervivencia libre de progresión (SLP) calculado como el tiempo transcurrido entre la cirugía y la recaída de la enfermedad por progresión local o metastásica; y la supervivencia global (SG), periodo de tiempo entre el diagnóstico y *exitus*.

2. CULTIVOS CELULARES

Los fibroblastos aislados de las biopsias pulmonares humanas y la línea HEK LTV 293 se cultivaron en medio completo compuesto por:

- 90% *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) con L-Glutamina (Biowest)
- 10% de Suero Bovino fetal inactivado (SBF) (Gibco™, Life Technologies).
- 100 U/ml de penicilina (Gibco™, Life Technologies).
- 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco™, Life Technologies).
- 0,25 µg/ml de fungizone (Gibco™, Life Technologies).

Para la línea celular HCC4006 el medio utilizado fue 90% Roswell Park Memorial Institute médium (RPMI, Biowest) con idéntica suplementación que el DMEM.

2.1. Aislamiento de fibroblastos primarios de pulmón humano y congelación

El aislamiento de los CAFs y FNs procedentes de las biopsias quirúrgicas se llevó a cabo mediante digestión enzimática con Liberase™ (Sigma-Aldrich) (compuesta por colagenasa I y II), lo que favoreció favorecer la disgregación y digestión del tejido pulmonar. En primer lugar, se fragmentó el tejido pulmonar en pequeñas porciones en una placa Petri de 10 cm con la ayuda de un bisturí. Los pequeños fragmentos se digirieron con la mezcla de digestión compuesta por DMEM *high glucose* (Biowest) y 0,1 mg/ml Liberase™ en un tubo de 1,5 ml durante toda la noche a 37°C y agitación.

Posteriormente, la solución digerida resultante se filtró mediante un filtro de 100 μm (Falcon™). Tras los lavados por centrifugación a 1500 rpm, 25°C durante 15 minutos, los extractos celulares se cultivaron en medio de cultivo DMEM completo. Cada digestión celular se sembró en placas de 25 cm^2 (Falcon™), incubándose a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO_2 . Las células se incubaron durante 5-7 días hasta alcanzar el 80% de confluencia. En este momento y tras retirar el medio y lavar la monocapa con tampón fosfato salino (PBS) (Gibco™), se empleó una solución de 0,05% tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM pH 8.0 (Gibco™) para despegar las células de la superficie de plástico. A continuación, se realizó un conteo celular de la suspensión de células obtenidas y se sembraron frascos de 75 o 150 cm^2 (Falcon™) en caso de mantenimiento y/o expansión del número de células, o bien otro tipo de placas según el diseño experimental. Tras el tercer pase, las células se congelaron a razón de 2 millones de células por criovial en medio de congelación compuesto por 10% DMSO en SBF durante 24 horas en un congelador de -80°C. Para ello, se empleó un *Mr. Frosty*™ ya que este recipiente está diseñado para conseguir una velocidad de refrigeración muy próxima a -1°C/minuto. Finalmente, los crioviales se depositaron en un tanque de nitrógeno líquido en el Servicio de Cultivos Celulares del SCSIE-UV para su conservación a largo plazo. Los experimentos que se presentan en este trabajo se realizaron entre los pases 3 y 12, ya que pases superiores pueden alterar el fenotipo original del fibroblasto al tratarse de células senescentes. Además, esto permitió comparar los experimentos de forma más sistemática, reduciendo la variabilidad en los resultados obtenidos asociada al número de pases aplicados.

2.2. Caracterización del cultivo

La caracterización de los cultivos de fibroblastos primarios obtenidos de los pacientes se realizó mediante una inmunofluorescencia de α -SMA y VIM, considerados marcadores distintivos de este tipo celular. Con la finalidad de evaluar la pureza de estos cultivos, se examinó la CDH1 como marcador epitelial que no aparece en los fibroblastos e indica la presencia de células epiteliales. Con este fin, se cultivaron los fibroblastos y se realizó la inmunofluorescencia siguiendo el protocolo detallado en el subapartado 9. Como se muestra en la Figura 24, se observó que todos los fibroblastos fueron negativos para CDH1, positivos para VIM (en color amarillo), y una proporción de ellos también fueron positivos para α -SMA (en color verde).

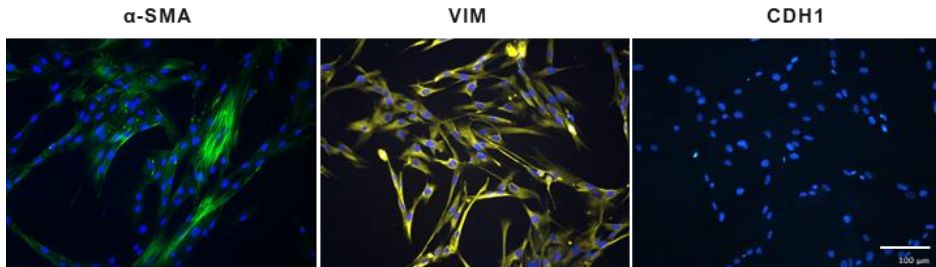


Figura 24: Inmunofluorescencia de marcadores FMT y epiteliales en FNs y CAFs. Los fibroblastos FNs y CAFs se sembraron, y tras 48 horas, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%. Se observan imágenes representativas, en las que los núcleos teñidos con Hoechst-33342 aparecen en azul, α -SMA en verde, VIM en amarillo y CDH1 está ausente. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Leica DM4500B (20X).

3. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR

El número de células y la viabilidad de los cultivos celulares se evaluó mediante el contador automático *Countess*TM (*Cell counting chamber slides*, InvitrogenTM). La técnica de conteo se basa en el método de exclusión del colorante vital azul tripán. Este colorante se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Sin embargo, no puede atravesar las células con membrana intacta, que presentan un aspecto redondeado y transparente. Al entrar el colorante, las células alteradas adquieren un tono azul, aunque conservan una morfología similar a las células viables.

Para la realización del conteo, tras la tripsinización, se recogieron las células con medio completo, se centrifugaron a 1.500 rpm 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el *pellet* de células con medio completo y se preparó una alícuota de la suspensión de células con una solución de azul tripán al 0,4% en una relación 1:1. Posteriormente, se introdujo dicha mezcla en la cámara de conteo específica del contador automático *Countess*TM II (InvitrogenTM) y se obtuvo la relación de células vivas y muertas.

4. ESTUDIOS DE MIGRACIÓN CELULAR. *SCRATCH ASSAY*

El ensayo de herida o *scratch assay* permite la evaluación del cierre de herida *in vitro* como un indicador directo de la capacidad de migración al realizar una herida en la monocapa, ya que las células en el nuevo borde van a migrar hacia la apertura para cerrarla hasta llegar a formar nuevos contactos célula-célula.

Para ello, se sembraron las células a elevada confluencia ($0,5 \times 10^6$ FNs o CAFs por pocillo) en placas de 6 pocillos con DMEM completo. Para que el tamaño del área a analizar fuera el mismo en todos los pocillos, se delimitó la zona de estudio de la herida a 1,4 cm de longitud. A las 24 horas, habiéndose alcanzado una confluencia del 90%, se cambió el medio y se reemplazó por DMEM con un 1% de SBF para evitar efectos del suero en la capacidad migratoria. Pasadas 24 horas con esta nueva condición, se realizó la herida *in vitro* con una punta de pipeta estéril de 1-10 μ L. Para eliminar los restos celulares y limpiar la zona de la herida, se realizaron dos lavados con PBS y posteriormente se añadió DMEM 1% SBF y mitomicina C concentración de 1,5 μ g/ml. La mitomicina C es un citostático inhibidor de la capacidad proliferativa de las células al unirse al ADN, lo que nos permite estudiar de forma más objetiva la capacidad de migración. Además, se incluyó un control por línea celular sin mitomicina C para evaluar su funcionamiento óptimo.

La duración del ensayo fue de 48 horas y se tomaron imágenes en el microscopio invertido (Zeiss Primovert) a 40x a las 0, 24 y 48 horas, observándose así las variaciones en el área de la herida. A continuación, con la ayuda del programa *Adobe Photoshop CS5* se unificaron las imágenes de cada porción de la herida para obtener una sola imagen y finalmente se calculó la variación del área en cada periodo de tiempo con el programa *Image J*.

5. GEL CONTRACCIÓN DE COLÁGENO

El ensayo de contracción del gel de colágeno es considerado como una herramienta clásica en el campo de la mecanobiología para el estudio de la contracción de la matriz extracelular inducida por las células, ya que ejerce un papel importante en la cicatrización de las heridas y en la progresión tumoral.

Para el estudio de contracción, las células se tripsinizaron y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* de células se resuspendió hasta obtener una concentración de $0,2 \times 10^6$ células/ml. En un tubo, se mezclaron 400 μL de la dilución celular con 200 μL de Colágeno *rat tail* (Gibco™) de concentración 3 mg/ml. Se utilizaron 5 μL de NaOH 1M para alcanzar un pH óptimo para la gelificación. Este volumen mínimo de NaOH se optimizó en experimentos previos con la finalidad de obtener un gel con mayor rigidez en el menor tiempo. A continuación, se añadieron 500 μL de la mezcla en cada pocillo en placas de 24 y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos para favorecer la gelificación. Posteriormente, se separó el gel de las paredes de los pocillos con la ayuda de una punta de 1 μL . Finalmente, se añadió el mismo volumen del medio de cultivo con o sin TGFB1, se añadió PBS al resto de los pocillos no utilizados para mantener un ambiente húmedo y se incubó a 37°C. Los cambios fueron observados en el diámetro del gel durante 24 y 48 horas y las imágenes fueron procesadas mediante *ImageJ*. Para cuantificar el grado de contracción celular se calculó el porcentaje de la variación del área del gel en cada periodo de tiempo respecto al área total del pocillo.

6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TGFB1

Los ensayos ELISA (ensayos inmunoabsorción ligado a enzima) son una técnica de inmunoensayo donde un anticuerpo primario que se une específicamente a un antígeno (aquel que se pretende cuantificar) es reconocido por un anticuerpo secundario ligado a una enzima capaz de producir un producto que puede detectarse por espectrofotometría. Para la determinación de los niveles de TGFB1 extracelular en las diferentes poblaciones celulares empleamos el kit *FineTest* EH0287.

Más concretamente, se sembraron $0,2 \times 10^6$ células en placas de 6 pocillos con medio DMEM completo por triplicado. A las 24 horas, se cambió el medio para eliminar el SBF, sustituyéndose por BSA 4% en DMEM. La razón de la sustitución del SBF por BSA se debe a que el suero contiene TGFB1 y podría interferir en los resultados finales del experimento. Así pues, después de 48 horas del cambio de medio, se recogió el sobrenadante, se congeló a -80°C y se lisaron las células, para poder relativizar la cantidad de TGFB1 a la cantidad de proteínas.

Una vez recogidas todas las muestras, se realizó el ensayo. En primer lugar, se activó el TGFB1 mediante la adición de HCl 1 N y se neutralizó con 1,2 N NaOH/HEPES 0,5 M. A continuación, las muestras, patrones y blancos se añadieron a los pocillos cubiertos del anticuerpo primario durante 90 minutos. Se realizaron los lavados pertinentes y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con biotina durante 1 hora. Tras 4 lavados, se añadió el cóctel de revelado para generar el cromóforo y la reacción se detuvo con la solución de parado del kit. Se midió espectrofotométricamente la absorbancia a 450 nm con el *Multiskan® Spectrum* (Thermo Scientific™). Finalmente, se realizaron los cálculos necesarios para ajustar las diluciones empleadas y los valores se extrapolaron en la recta patrón.

Para el modelo tridimensional que describiremos en apartados posteriores, se llevó a cabo siguiendo los mismos pasos con la particularidad de utilizar una mezcla del sobrenadante procedente de 10 esferas por muestra.

7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE *WESTERN BLOT*

La técnica de *Western blot* permite la detección de proteínas específicas procedentes de lisados celulares. Esta técnica consta de diferentes pasos que se explicarán con detalle a continuación.

7.1. Extracción y determinación de la concentración de proteínas

En primer lugar, se cultivaron las células en placas de 90 mm, siendo tratadas según las condiciones del diseño experimental. Posteriormente, una vez alcanzada la confluencia deseada del 90%, se procedió a la obtención del extracto proteico. Para ello, se eliminó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS en frío. A continuación, se procedió al lisado de las células mediante la utilización de un tampón de lisis (20 mM, Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA 1% de Tritón™ X-100 (v/v), 2,5 mM de pirofosfato sódico, 1 mM de β-glicerofosfato, 1 mM de Na₃VO₄ y 1 µg/mL de leupeptina) (Cell Signaling Technology), suplementado con inhibidores frente a un amplio rango de proteasas y fosfatasa (ThermoFisher Scientific) para evitar la degradación de las proteínas. Posteriormente, se sonicaron las muestras durante tres ciclos de 5 segundos de ultrasonidos mediante un sonicador Branson SLPe, al 30% de amplitud con 15 segundos de descansos. A continuación, el homogenado se centrifugó a máxima velocidad (16.900 g), a 4°C durante 15 minutos para separar los restos celulares de la fracción de proteína soluble. Para poder comparar la cantidad de una proteína determinada mediante *Western Blot*, se cuantificó la proteína total de los sobrenadantes mediante el método colorimétrico del reactivo fotosensible denominado Ácido Bicinonínico (BCA) (Fisher Scientific™) medida a 560 nm.

Para ello, se preparó una recta patrón de albúmina de suero bovino (BSA; Roche) de concentración entre 0,01 mg/ml y 2 mg/ml, la cual permitió la obtención de la concentración de proteína en los lisados celulares interpolando los valores de absorbancia en la curva patrón. Finalmente, los extractos proteicos fueron guardados a una temperatura de -80°C hasta su utilización.

7.2. Electroforesis y Transferencia

La separación de las proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), la cual permite separar las proteínas en función del peso molecular. De este modo, el detergente aniónico SDS y agentes reductores de puentes disulfuro (β -mercaptoetanol, dithiothreitol DTT) permiten la desnaturalización de las proteínas y el SDS las envuelve formando micelas. Así pues, se consigue que la relación carga/masa sea la misma para todas las proteínas, pudiéndose desprestigiar la carga propia de las proteínas, quedando enmascarada por la carga negativa del SDS. Al aplicar el voltaje durante la electroforesis, se produce la separación de las proteínas por su peso molecular.

A continuación, se mezclaron 12 μ g de proteína con el volumen adecuado de tampón de carga según el grosor del gel y el número de pocillos de este (Tris 50 mM pH 6,8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v), 0,005% azul de bromofenol (p/v)) y se incubaron en una placa calefactora durante 5 minutos a 98°C. Una vez desnaturalizadas, las muestras se cargaron en los geles. La mayor parte de los geles utilizados eran de poliacrilamida al 10% de 1 mm de grosor cuya concentración de acrilamida dependía del tamaño de las proteínas a determinar (Tabla 3).

Tabla 3: Composición de geles electroforesis SDS-PAGE

GEL SEPARADOR (<i>Resolving</i>) (ml)						
Tamaño de proteínas a separar (KDa)		25-200	15-100	10-70	12-45	4-40
Concentración acrilamida	6%	8%	10%	12%	15%	20%
H ₂ O _d	1,595	1,345	1,095	0,845	0,47	0
Acrilamida-Bisacrilamida (29:1) 40% (Sigma-Aldrich)	0,75	1	1,25	1,5	1,875	2,5
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
SDS 10% (p/v)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
APS 10% (p/v) (Sigma-Aldrich)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED (Sigma-Aldrich)	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
GEL CONCENTRADOR (<i>Stacking</i>) (ml)						
Concentración acrilamida				5%		
H ₂ O _d				3,791		
Acrilamida-Bisacrilamida (29:1) 40%				0,625		

Seguidamente, los geles se introdujeron en una cubeta con tampón de electroforesis pH 8,3 (Tris 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,1% (p/v)). Se cargó el volumen necesario de las muestras en los pocillos correspondientes y se utilizaron los patrones de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Standards Dual Color*, Bio-Rad) para ayudar a la determinación de las proteínas de interés. El voltaje utilizado en un primer momento fue 70 voltios (25-30 mA). Una vez las muestras cargadas alcanzaron el gel separador, se incrementó el voltaje a 150V (25-30 mA) y se controló que las muestras no se saliesen del gel.

A continuación, se realizó una transferencia húmeda a membranas de nitrocelulosa 0,2 µm (Amserham™) durante 1 hora y 30 minutos (90 voltios, 25-30 mA) en un sistema de electroforesis (*Mini Trans-Blot® Electrophoretic*

Transfer Cell, Bio-Rad) usando un tampón de transferencia pH 8,3 (20% metanol v/v, Tris 25 mM, Glicina 192 mM).

7.3. Inmunodetección

Posteriormente, la membrana se incubó con una solución de bloqueo sintético de BSA 5% en TBS-Tween 0,1% (Tris-Cl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) durante 45 minutos en agitación suave para bloquear las posibles uniones inespecíficas. Se incubaron los anticuerpos primarios de elección con una dilución 1:1000 con BSA 5% en TBS-Tween durante toda la noche a 4°C (Tabla 4). Al día siguiente se realizaron varios lavados con TBS-Tween 0,1% para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados durante 90 minutos a temperatura ambiente conjugados con peroxidasa de rábano picante (HPR) (Tabla 5).

Tabla 4: Anticuerpos primarios empleados en la detección de proteínas en *Western blot*.

ANTICUERPOS PRIMARIOS					
Diana	PM (kDa)	Origen	Dilución	Casa comercial	Referencia
NNMT	28	Conejo	1:1000	Sigma	PA059180
SNAI1	29	Conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	3879S
α -SMA	42	Ratón	1:1000	Sigma	A5228
ACTB	45	Conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	4967S
FAP	95	Conejo	1:1000	Abcam	Ab207178
CDH2	140	Conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	131165
FN1	300	Ratón	1:1000	Invitrogen	MA5-11981

Tabla 5: Anticuerpos secundarios empleados en la detección de proteínas en *Western blot*.

ANTICUERPOS SECUNDARIOS				
Especificidad	Conjugado	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti-ratón IgG	HPR	1:1000	Cell Signaling Technology	7076P2
Anti-conejo IgG	HPR	1:1000	Cell Signaling Technology	7074P2

Se realizaron varios lavados durante 5 minutos en agitación fuerte para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Las membranas se revelaron utilizando un kit de detección de quimioluminiscencia (*Pierce Fast Western Blot Kit*, ECL, Thermo Fisher Scientific). El luminol presente en el ECL se oxida por parte del peróxido catalizado por la enzima peroxidasa y se transforma en un dianión excitado, el cual emite luz al volver al estado fundamental. Esta luz emite a 425 nm y puede captarse mediante la cámara de quimioluminiscencia con el sistema *ChemiDoc™* XRS+ (Bio-Rad). Finalmente, la imagen obtenida se analizó mediante densitometría con el programa informático *ImageLab* (Bio-Rad) para evaluar la intensidad de píxeles relativa de mancha y se cuantificó el resultado relativizando a la proteína constitutiva ACTB.

8. AISLAMIENTO DE ARN Y RT-qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite el análisis de la expresión génica al amplificar un fragmento de ADN determinado. En nuestro estudio, se ha llevado a cabo esta técnica para poder estudiar ADN complementario (ADNc) obtenido a partir de ARNm extraído de las muestras mediante la reacción de transcripción inversa. Para la PCR cuantitativa (qPCR), se utiliza ADN como molde, un par de *primers* específicos, un tampón de reacción adecuado y la enzima ADN polimerasa termoestable. De este modo, se pueden estudiar los niveles de ARNm de un gen en concreto y compararlos. Los pasos que se llevaron a cabo se describen a continuación:

8.1. Extracción ARN

Para el cultivo bidimensional, se sembraron $0,2 \times 10^6$ células en placas de 60 mm en DMEM completo hasta alcanzar una confluencia del 80%. En el caso del modelo tridimensional explicado en apartados posteriores, tras el periodo de formación de las esferas, se recogieron 10 esferas por condición para llevar los estudios transcripcionales por PCR.

A continuación, se realizó la extracción de ARN utilizando puntas de pipeta, tubos y columnas libres de ARNasas y conservando en frío las muestras para evitar la degradación del ARN. Se retiró el medio, se realizaron dos lavados con PBS y se procedió al proceso de extracción de ARN siguiendo las indicaciones del protocolo del kit *E.Z.N.A.® FFPE ARN Kit* (Omega BIO-TEK, VWR).

En primer lugar, se lisaron las células con 350 μ L de un tampón de lisis TRK suplementado con un 20% de β -mercaptoetanol (v/v), asegurándose que toda la base de la placa quedara cubierta para poder extraer la mayor cantidad de ARN. Posteriormente, se añadió etanol al 70% en agua libre de ARNasa en el mismo volumen que el tampón de lisis. Se trasvasó la mezcla a las columnas, se realizaron múltiples lavados con tampones específicos del kit para purificar las muestras y se centrifugaron para favorecer la unión del ARN a las columnas, desechándose los líquidos filtrados. Se eluyó el ARN en 30 μ L de agua libre de ARNasas y se cuantificó por medio de un espectrofotómetro *NanoDrop™* (Thermo Scientific). Se midió la absorbancia a 260 nm y su pureza con el coeficiente A_{260}/A_{280} , obteniendo valores mayores a 1,8. Finalmente, las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su futura utilización.

8.2. Retrotranscripción

Una vez cuantificadas las muestras, se realizó la retrotranscripción o reacción de la cadena de polimerasa en transcripción reversa (RT-PCR) para la obtención de ADNc gracias a la acción transcriptasa inversa. Para ello, se utilizó el kit *RNA-PrimeScript™ RT Reagent Kit* (Takara). Los volúmenes empleados para la reacción de retrotranscripción se encuentran recogidos en la Tabla 6. El volumen final en cada reacción de transcripción fue de 20 µL con 500 ng de ARN de las muestras. De este modo, se obtuvo una concentración final de 25 ng/µL de ADNc.

Tabla 6: Lista de reactivos y volúmenes para la retrotranscripción.

RNA-PRIMER SCRIPT RT REAGENT KIT	
Reactivo	Volumen (µl)
<i>5X Prime Script Buffer</i>	4
<i>Prime Script enzyme mix I</i>	1
<i>Oligo dT primer</i> 50 µM	1
<i>Random 6 mers</i> 100 µM	1
Agua libre ARNasas	8
ARN 100 ng/µL	5
VOLUMEN TOTAL	20

Para llevar a cabo la retrotranscripción, se empleó un termociclador *Life Eco* (Bioer) sometiendo las muestras al siguiente proceso:

- Transcripción reversa: 37°C durante 15 minutos.
- Inactivación de la transcriptasa inversa: tratamiento de choque de calor a 85°C durante 5 segundos.
- Estabilización del ADNc: 4°C

Finalmente, se recogieron las muestras y se diluyeron con agua libre de ARNasas hasta una concentración de 5 ng/μL de ADNc y se almacenaron a -20°C hasta su futura utilización.

8.3. Diseño, preparación y optimización de *primers*

El diseño de los *primers* se llevó a cabo utilizando la base de datos *PubMed*. Se procedió a la búsqueda del gen y especie de interés. En nuestro caso, como las muestras proceden de pacientes, se seleccionó la opción *Homo Sapiens*. A continuación, se seleccionó el número de identificación del *ENSEMBL* y se escogió una secuencia consenso (CCDS) para estar seguros de que hibridaban y amplificaban en una región de nuestro gen de interés. Seguidamente, se eligió la secuencia de ADNc exónica (región codificante) del gen y se introdujo en el programa Primer 3. Para ello, se realizaron varias pruebas con diferentes secuencias hasta obtener los *primers* con una secuencia óptima. La temperatura fundente o *melting* (T_m) óptima debía de estar entre 58,5 y 61°C, el tamaño de pares de bases entre 150-250 y el tamaño final del *primer* entre 18 y 24 pares de bases. Además, en una situación idónea, los *primers forward* y *reverse* deben hibridar entre dos exones diferentes. Si esto no fuese posible, los *primers* deben encontrarse cada uno de ellos en dos exones diferentes, separados por una secuencia intrónica. Asimismo, se aconseja que la composición en GC para ambos *primers* sea del 50%.

El *primer forward* coincide directamente con la secuencia de ADNc. Sin embargo, el *primer reverse* no se localiza directamente, para ello debemos obtener la secuencia complementaria e invertida. Una vez obtenidas las secuencias, nos aseguramos de que no hibridaban en otras localizaciones del

ADN genómico. Para ello, se utilizó la herramienta *BLAST* en la ventana *ENSEMBL*. *BLAST* es una aplicación informática que busca homologías de las secuencias de interés con el resto del genoma ya que, si nuestra secuencia hibrida en diferentes cromosomas, se amplificarían regiones que no nos interesarían. Las secuencias de parejas de *primers* empleadas en este trabajo aparecen en la Tabla 7.

Tabla 7: Secuencias de los *primers* utilizados en la RT-PCR

GEN	Secuencia <i>PRIMER</i>
<i>ACTB</i>	<i>Forward:</i> GACCCAGATCATGTTTGAGACC <i>Reverse:</i> AGGGCATACCCCTCGTAGAT
<i>NNMT</i>	<i>Forward:</i> ATTCTGCCTAGACGGTGTGAA <i>Reverse:</i> AGGCCTCTGGCTCTTTCTTC
<i>COL 1A1</i>	<i>Forward:</i> ACGAAGACATCCCACCAATC <i>Reverse:</i> ATGGTACCTGAGGCCGTT
<i>ACTA2</i>	<i>Forward:</i> ACAACTGGCATCGTGCTG <i>Reverse:</i> GAAGGAATAGCCACGCTCAG
<i>FN1</i>	<i>Forward:</i> GAGAGTAAACCTGAAGCTGAAGAGA <i>Reverse:</i> GCGATGGTACAGCTTATTCTCC
<i>FAP</i>	<i>Forward:</i> TGGGCTGGTGGATTCTTTGT <i>Reverse:</i> CTCCCCACTTGCCACTTGTA
<i>mCherry</i>	<i>Forward:</i> ACTACGACGCTGAGGTCAA <i>Reverse:</i> TGTCAGGCAACCGTATTC
<i>CDH1</i>	<i>Forward:</i> GGCCTCCGTTTCTGGAAT <i>Reverse:</i> TGGCCAGTGATGCTGTAGAA
<i>CDH2</i>	<i>Forward:</i> GGTTTCATTTGAGGGCACAT <i>Reverse:</i> ATTGGGATCGTCAGCATCA
<i>VIM</i>	<i>Forward:</i> CAGACAGGATGTTGACAATGC <i>Reverse:</i> TTGGCAGCCACACTTTCATA
<i>SNAI1</i>	<i>Forward:</i> GCTGCAGGACTCTAATCCAGA <i>Reverse:</i> CTGACAGGGAGGTCAGCTCT
<i>TWIST</i>	<i>Forward:</i> CCAGCTTGAGGGTCTGAATC <i>Reverse:</i> GTCCGCAGTCTTACGAGGAG
<i>ZEB1</i>	<i>Forward:</i> GGGAGGATGACACAGGAAAG <i>Reverse:</i> GGTGCCTCAGGAAAATGAC

Se diseñaron un total de tres parejas de *primers* para cada gen y se optimizaron con la intención de identificar la pareja más eficiente para la PCR. En primer lugar, se resuspendieron los *primers* en el volumen de agua libre de ARNasas especificado en la ficha técnica de la casa comercial. A continuación, se preparó el *Primer mix* cuya concentración final era de 1,5 μM de cada uno de los *primers* y para ello, se utilizaron 291 μL de agua libre de ARNasas, 4,5 μL de *primer forward* y 4,5 μL de *primer reverse*. Seguidamente, se preparó una curva de concentraciones de ADNc de una misma muestra (1, 1:4, 1:16 y 1:32). Los números de ciclos (Ct) obtenidos en cada una de las reacciones a diferentes concentraciones permitió calcular la recta de regresión frente al logaritmo de la concentración. La pendiente (m) de esta recta permitió obtener la eficiencia de la pareja de los *primers*:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/m)}$$

8.4. PCR cuantitativa. Reacción en cadena de la polimerasa

El desarrollo de la PCR requirió de una mezcla de reacción empleada con el kit *TB Green PrimeScript™ RT-PCR Kit* (Takara) en placas de 96 pocillos de fondo oscuro (Bio-Rad) con una concentración de ADNc de 5 ng/ μL como dilución de trabajo, especificada en la Tabla 8. Se llevaron a cabo duplicados de las muestras para cada pareja de *primers* del gen correspondiente.

Tabla 8: Lista de los reactivos empleados en la PCR cuantitativa.

REACTIVOS	Volumen (μL)
Dilución de trabajo 9 μL	
<i>TB Green Premix Ex Taq 2x</i>	6 μL
<i>Mix primer</i>	1,2 μL
H ₂ O libre ARNasas	1,8 μL
ADNc 5 ng/ μL	3 μL

Una vez cargada toda la placa, se centrifugó para eliminar posibles burbujas y se introdujo en un amplificador *iQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad) donde se llevó a cabo la PCR. En primer lugar, se fijó un ciclo de desnaturalización del ADNc de 30 segundos a 95°C. Seguidamente, 40 ciclos de 5 segundos a 95°C para la separación de las dos cadenas de ADN. Posteriormente, 30 segundos de hibridación a 60°C para la unión de los *primers*. Después, tuvo lugar un proceso de extensión de cadena a 72°C durante 30 segundos. Finalmente, los datos fueron analizados por el *iQ5 Optical System software 2.1* (Bio-Rad) y el *software Excel* de *Microsoft*. Los resultados se calcularon en función del método $\Delta\Delta C_t$ y se representaron en expresión relativa a las muestras control (t=0h). Los resultados obtenidos se normalizaron respecto a la expresión del gen constitutivo elegido, la β -actina (*ACTB*).

9. INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia es una técnica que permite la localización y cuantificación *in situ* de proteínas previamente marcadas con anticuerpos conjugados con fluorocromos utilizando la microscopía de fluorescencia.

En primer lugar, se colocaron en una placa de 24 pocillos cubreobjetos de 12 mm de diámetro esterilizados y se sembraron entre $0,25-0,50 \times 10^5$ células, según el diseño experimental, para alcanzar una confluencia óptima (alrededor del 60%). Cabe destacar que este experimento requiere de confluencias más bajas a lo habitual ya que, por lo contrario, podrían verse comprometidos el marcaje y la posterior visualización en el microscopio.

Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 30 minutos y se realizaron lavados posteriores con tampón fosfato salino DPBS

(Gibco™). A continuación, se permeabilizaron las células con Tritón™ X-100 al 0,2% (Sigma-Aldrich) durante 2 minutos para facilitar la entrada de los anticuerpos a las células y su unión a los epítomos correspondientes. Posteriormente, se bloquearon las uniones inespecíficas y posibles señales erróneas que pudiesen enmascarar el resultado final con tampón de bloqueo (1% BSA, 0,3% Tritón™ X-100, 5% SBF) durante 30 minutos. Se añadió el anticuerpo primario de interés a 4°C durante toda la noche en una cámara húmeda, evitando de este modo que los cristales con las células fijadas se secasen. Tal y como se observa en la Tabla 9, según el tipo de anticuerpo, los tiempos de incubación, así como las diluciones empleadas pueden variar. La dilución de los anticuerpos se llevó a cabo utilizando un tampón compuesto por 1% BSA, 0,3% Tritón™ X-100 en DPBS. Seguidamente, se realizaron lavados rápidos de 5 minutos cada uno con otro tampón formado por 0,25% BSA y 0,1% Tritón™ X-100 en DPBS. Se incubaron los cubreobjetos con los correspondientes anticuerpos secundarios unidos al fluorocromo durante 1 hora a temperatura ambiente. La dilución empleada siempre fue 1:1000 con 0,25% BSA y 0,1% Tritón™ X-100 en DPBS (Tabla 10). A continuación, se realizaron los lavados correspondientes con el último tampón utilizado y se incubó con Hoechst 33342 (Molecular Probes™, Life Technologies) con una dilución 1:1000 para la tinción de los núcleos al unirse al DNA, observándose una coloración azul en microscopia de fluorescencia. Finalmente, las preparaciones en los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con medio de montaje *ProLong™ Gold Antifade Reagent* (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) y se observaron al microscopio de fluorescencia (Leica Microsystems) con el objetivo de 20x.

Tabla 9: Lista de anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia

ANTICUERPOS PRIMARIOS				
Especificidad	Origen	Dilución	Casa comercial	Referencia
NNMT	Conejo	1:75	Sigma	PA059180
α -SMA	Ratón	1:1000	Sigma	A5228
VIM	Conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	5741
E-cadherina (CDH1)	Conejo	1:100	Cell Signaling Technology	3195

Tabla 10: Lista de anticuerpos secundarios empleados en inmunofluorescencia

ANTICUERPOS SECUNDARIOS				
Especificidad	Fluorocromo	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti-Ratón IgG	Alexa Fluor™ 488 (verde)	1:1000	Fisher Scientific	A21202
Anti-Conejo IgG	Alexa Fluor™ 594 (rojo)	1:1000	Fisher Scientific	A21207

El análisis semicuantitativo a partir de la inmunofluorescencia requirió de la realización de contajes celulares. En primer lugar, se contaron los núcleos teñidos de azul gracias al Hoechst 33342. Con la herramienta informática *ImageJ* se realizó un montaje con la superposición de las imágenes de núcleos, y las tinciones de α -SMA y NNMT.

Se consideraron miofibroblastos las células positivas que presentaban más de 2-3 fibras de α -SMA. Posteriormente, se calculó el porcentaje de células positivas para α -SMA con respecto al total. En referencia a la NNMT, las células se clasificaron en relación con la intensidad de la tinción (intensa o débil), debido a que la mayor parte de los fibroblastos expresan esta proteína a nivel del citoplasma y/o núcleo. Se establecieron los parámetros de exposición e intensidad de la captura de imágenes con las muestras de los fibroblastos normales en condiciones basales. Estos parámetros se emplearon para realizar las capturas en todas las muestras restantes. Esto permitió

comparar la intensidad de tinción entre los pacientes y las condiciones experimentales.

10. ESTUDIO DE TRANSDUCCIÓN GÉNICA CON CONSTRUCCIONES LENTIVIRALES

La utilización de vectores lentivirales permite introducir genes o ARN de interferencia (ARNi) en el interior de las células para expresar/reprimir la expresión de un gen determinado. El fundamento de este proceso consiste en la inclusión del ARN que contiene la construcción de interés mediante vectores lentivirales que se unen a las células dianas utilizando las proteínas de la envuelta. A través de una transcriptasa reversa, el ARN es retrotranscrito a ADNc permitiendo su futura integración en el genoma de la célula diana. Con cada división celular, las modificaciones conseguidas se transmitirán obteniendo la población celular con las características genéticas de interés. En nuestro trabajo se utilizaron estos vehículos para reprimir la expresión de NNMT mediante secuencias de shARN. Además, se dispuso de la línea celular HCC4006, utilizada en nuestros modelos de cocultivo, la cual se marcó previamente con la molécula fluorescente mCherry para distinguir las células tumorales de los fibroblastos.

El protocolo de producción se constituye por varios pasos divididos en dos fases: primero, la producción de partículas virales y segundo, la transducción viral.

10.1. Producción de partículas virales

Durante el desarrollo de esta técnica, el material empleado en contacto con las partículas víricas debe ser correctamente esterilizado con una dilución de hipoclorito sódico al 10%.

Se utilizó el plásmido VSV-G para el gen de la envoltura y el plásmido pCMV-dR8.2 dvpr para el gen de empaquetamiento. En este sistema, las partículas virales son producidas por la cotransfección de tres plásmidos en las células productoras: VSV-G, pCMV-dR8.2 dvpr y el plásmido de interés para el silenciamiento.

Se sembraron las células HEK 293 LTV hasta alcanzar una confluencia del 70%. A continuación, se incubó la mezcla de plásmidos y reactivos para la formación de partículas víricas durante 30 minutos (Tabla 11), se tripsinizaron las células y se sembraron 1×10^6 células en placas de alta adherencia de 60 mm tratadas con colágeno I (Biocoat *Cell Environments*, Corning®). Se utilizó DMEM + 10% SBF sin antibióticos para que las partículas lentivirales que incorporaron el plásmido bacteriano no se vieran afectadas. Pasados los 30 minutos de incubación de los reactivos, se añadió gota a gota y de forma homogénea sobre las células.

Tabla 11: Reactivos empleados para la formación de partículas lentivirales

Valores para placa Petri 60 mm	
Plásmido Diana pLKO.1	4 µg
Plásmido pCMV-dR8.2 dvpr	4 µg
Plásmido VSV-G	0,5 µg
TransIT-LT1	24 µl
<i>Optimem</i>	Hasta 200 µl

Se utilizó la secuencia diana GTGACCTATGTGTGTGATCTT (ID clon TRCN0000035225, Sigma-Aldrich) para el silenciamiento de la NNMT (shNNMT) y MISSION® pLKO.1 (Sigma-Aldrich) para el control shNT.

Una vez transcurridas 24 horas de la transfección, se cambió el medio por un medio de producción viral (DMEM, 10 % SBF y BSA al 1%). Al cabo de 24 horas, se observaron las células y a las 48 horas del cambio de medio, se recogió el sobrenadante en un tubo de 15 ml, se guardó a 4°C y se añadió de nuevo medio de producción viral. 24 horas más tarde, se volvió a recoger el sobrenadante y se congelaron las placas con nitrógeno líquido para recoger con mayor facilidad los restos celulares que podrían permanecer en la placa. Así pues, todo el sobrenadante se centrifugó a 400 g durante 3 minutos y se filtró con un filtro estéril de 0,45 µm. Finalmente, el filtrado se guardó a 4°C (para ser utilizado en una semana) o a -80°C para futuros experimentos.

10.2. Transducción viral o infección de las células diana

Se sembraron $0,5 \times 10^6$ células en placas de 60 mm a las que se deseaba silenciar un gen en concreto. A las 24 horas, habiéndose obtenido una confluencia óptima del 80%, se sometieron a la infección o transducción viral. Para ello, se utilizó el medio vírico filtrado obtenido en pasos anteriores y se añadió el polímero catiónico polibreno a una concentración final de 10 µg/ml (Sigma-Aldrich) para favorecer la infección de las células diana. Pasadas 24 horas, se reemplazó el medio por nuevo medio con virus. Al día siguiente, se retiró dicho medio y se añadió DMEM completo con el antibiótico de selección a una concentración creciente para asegurar la selección de las células infectadas. De esta forma, para nuestras infecciones, se empleó como antibiótico de selección la puromicina. Se utilizaron concentraciones crecientes

hasta alcanzar una concentración de 2 µg/ml. Para corroborar que la infección era óptima, se utilizó un control de células dianas no infectadas, de forma que, al administrar el antibiótico, estas células murieron por no tener incorporado el gen de resistencia al antibiótico, mientras que las células infectadas crecieron con normalidad. Finalmente, para determinar el grado de represión del gen, se analizaron los niveles de NNMT por ARNm y pudimos distinguir de este modo dos tipos de poblaciones, CAFs shNT (control) y CAFs shNNMT.

11. HISTOLOGÍA: TINCIONES E INMUNOHISTOQUÍMICA

Las muestras de tejido parafinado de las biopsias quirúrgicas procedentes del Hospital Universitario de la Ribera (Alzira) se procesaron en Patológica Laboratorio S.L del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Quirón de Valencia. Esta técnica consiste en cortar con un microtomo láminas de tejido de unos 5 µm en portaobjetos, desparafinar con alcoholes, y posteriormente ser incubados con diferentes anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas de interés o colorantes que tiñen diferentes estructuras celulares. En nuestro estudio se realizaron cuatro tipos de tinciones específicas que se describirán en los apartados siguientes.

11.1. Tinción de Hematoxilina/Eosina

La tinción de hematoxilina-eosina es una de las tinciones más utilizadas en el diagnóstico patológico ya que permite el análisis del citoplasma y los núcleos. De este modo, la hematoxilina por ser básica o catiónica tiñe las estructuras ácidas de color azul y púrpura, como son los núcleos. Por lo contrario, la eosina al ser ácida tiñe los componentes básicos como es el citoplasma, con una coloración rosa.

El procedimiento se basó en desparafinar y rehidratar la muestra. Posteriormente, los excesos de alcohol se eliminaron con diferentes lavados con agua y se sumergió durante 10 minutos en hematoxilina. Se realizaron de nuevo lavados para eliminar el exceso de tinción y se pasó por alcohol ácido. A continuación, se procedió a la segunda tinción, sumergiendo en eosina durante 30 segundos. Finalmente, se pasó la muestra por diferentes soluciones crecientes de etanol para realizar su deshidratación y montaje final. Al observar las tinciones bajo el microscopio, se identificaron los siguientes colores: el colágeno en tono rosa pálido, el músculo en rosa intenso, la queratina en rojo brillante, el citoplasma rosado, los núcleos en un tono azul oscuro o morado, y los eritrocitos en un color cereza.

11.2. Tinción del tricrómico de Masson

La tinción tricrómica es una técnica que resalta las fibras del colágeno de tipo I en el estroma y los espacios extracelulares con una coloración azulada. Asimismo, el citoplasma se tiñe de rojo y el núcleo celular de morado. Los colorantes utilizados permiten diferenciar las fibras de colágeno, el núcleo celular y el citoplasma. A continuación, en la Tabla 12 se detallan las soluciones de trabajo utilizadas.

Tabla 12: Soluciones de trabajo en la tinción de Masson**Solución de trabajo A (20 minutos):****Solución 1:**

Fucsina ácida 0,33 g
Ácido acético 0,33 ml
Agua destilada 33 ml

Solución 2:

Ponceau de Xilidine 0,66 g
Ácido acético 0,66 ml
Agua destilada 33 ml

Solución de trabajo B (5 minutos):

Ácido Fosfomolibdico 2,5 g
Ácido Fosfotúngtico 2,5 g
Agua destilada 100 ml

Solución de trabajo C (3 minutos):

Azul de anilina 2,5 g
Ácido acético 2 ml
Agua destilada 98 ml

Una vez preparadas las soluciones de trabajo, las muestras se desparafinaron y se hidrataron. A continuación, se incubaron durante 10 minutos con hematoxilina férrica de *Weigert*. Se eliminó el exceso con HCl 4% y con ayuda de agua se obtuvo el color azul. Posteriormente, se incubaron las preparaciones con las diferentes soluciones de trabajo con tiempos distintos intercalando con lavados en agua acética al 0,5%. Finalmente, las muestras se lavaron con agua destilada, se utilizó etanol para deshidratar y se montaron. La visualización en el microscopio mostró los núcleos teñidos de azul oscuro; citoplasmas, queratina, fibras musculares y eritrocitos en morado/rojo y el colágeno y la reticulina en azul.

11.3. Inmunohistoquímica. Tinción con DAB

Esta tinción permite estudiar la localización de moléculas de interés al utilizar 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Esta técnica se basa en la utilización de anticuerpos primarios de ratón o conejo y un anticuerpo secundario asociado a un complejo de avidina-biotina. De esta forma, al añadir H₂O₂ y peroxidasa se produce un depósito marrón.

Para ello, en primer lugar, se desparafinaron los cortes de las muestras utilizando lavados de xileno, etanol al 100%, etanol 79%, etanol 50% y finalmente agua desionizada. Se lavaron dos veces con PBS y GS-PBS-T (1% suero de cabra y 0,4% de Tritón™ X-100 en PBS) y se bloquearon con PBS-T con suero de cabra al 3,5% durante 45 minutos. Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario en la cámara húmeda durante 16 horas (Tabla 13). Al día siguiente se volvieron a realizar los lavados con PBS y GS-PBS-T y se incubaron con el complejo avidina-biotina durante 45 minutos. Finalmente, se incubó con DAB durante 2 minutos y se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de DAB (*DAB Enhanced Liquid Substrate System for Immunohistochemistry*, Sigma Aldrich).

Tabla 13: Lista de anticuerpos empleados en la tinción DAB

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia
ACTA	Dako Agilent	IS61130-2
NNMT	Sigma	PA059180
Anti-Conejo	Dako Agilent	P021702-2
Anti-Ratón	Dako Agilent	P026002-2

En todas las tinciones se realizaron fotografías a diferentes aumentos (5x, 10x, 20x y 40x) mediante el microscopio Leica DFC 300 FX acoplada a un microscopio invertido Nikon Diaphot 300. El *software* utilizado para tomar las imágenes fue Leica *application suite* v. 2.3.1.

12. COCULTIVOS BIDIMENSIONALES Y TRIDIMENSIONALES

Para estudiar las interacciones fibroblasto-célula tumoral, cultivamos la línea celular de CPNM EGFR mutante HCC4006 ampliamente utilizada como modelo para estudiar el efecto de los ITQs de EGFR, junto con las poblaciones de CAF shNT y CAF shNNMT, que mostraban las mayores diferencias de expresión en cuanto a niveles de NNMT tras la represión mediante agentes lentivirales. Estos cocultivos se reprodujeron tanto en cultivo bidimensional como en estructuras tridimensionales, denominadas esferas. Ambos modelos se basaron en construir las siguientes condiciones: homocultivo HCC4006, CAF shNT, CAF shNNMT y heterocultivos HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT. La ratio célula tumoral: CAF fue 1:10 en el momento del cultivo. Tras cuatro días de cocultivo, se determinó la muerte celular en respuesta al ITQ de EGFR de tercera generación osimertinib.

12.1. Cocultivo bidimensional

12.1.1. Estudio de la citotoxicidad celular: Método sulforodamina B

El método de la sulforodamina B se utiliza para la determinación indirecta del número de células. La sulforodamina B es un colorante rosado brillante capaz de unirse a cationes. En condiciones básicas, aumenta la afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas y se fija selectivamente a estos. La unión de la sulforodamina B a las proteínas es estequiométrica, por tanto, la cantidad de colorante es directamente proporcional al número de células (Skehan *et al.*, 1990).

Para ello, se sembraron 6 réplicas por condición de $3,5 \times 10^3$ células por pocillo en placas de 96 pocillos en 100 μ l de medio completo. Tras 4 días de

cocultivo, se añadió el fármaco disuelto en RPMI para construir una escala creciente de concentraciones. Tras 72 horas de tratamiento, las células se fijaron mediante PFA 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las placas fueron lavadas con agua y se dejaron secar. Las placas fijadas fueron teñidas con 50 µl de una solución de sulforodamina B (Sigma-Aldrich) al 0.4% (p/v) en ácido acético al 1%, durante 20 minutos. El exceso de colorante se eliminó con lavados de ácido acético al 1%, para eliminar el exceso de tinción y se dejaron secar. El colorante retenido por las células se solubilizó con 200 µl de tampón Trizma® Base (Sigma-Aldrich) 10 mM. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (*Multiskan® Spectrum* (Thermo Scientific™)) y se le restó el ruido de fondo medido a 620 nm. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad celular respecto a cada condición control, tal y como se indica en la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{Absorbancia problema}}{\text{Absorbancia control}} \times 100$$

12.1.2. Análisis de la apoptosis celular por citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que posibilita el análisis individual de las células de una muestra y agruparlas en distintas poblaciones según su tamaño y complejidad interna. Además, permite la detección de biomarcadores a través de inmunotinciones con anticuerpos conjugados a fluorocromos o con tinciones biológicas usando moléculas fluorescentes.

La apoptosis es un proceso de muerte programada caracterizado por la pérdida de adhesividad, condensación del citoplasma y núcleo y degradación del ADN intranuclear. Para determinar el grado de apoptosis se utilizó el ensayo de la Anexina V. La anexina V es una proteína que, en presencia de calcio,

tiene la capacidad de unirse a la fosfatidilserina (PS), un fosfolípido de membrana. En las células sanas, la PS se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática. Sin embargo, durante las primeras fases de la apoptosis, la membrana sufre cambios estructurales como la translocación de PS hacia la cara externa, permitiendo que la anexina V pueda unirse. La Anexina V está conjugada a un fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC). Junto con la anexina V se utilizó DAPI, un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones ricas en adenina y timina del ADN. De forma habitual, para el estudio de la necrosis, se utiliza una contratinción nuclear fluorescente roja conocida como yoduro de propidio (PI). Sin embargo, al emplear en nuestro modelo células tumorales mCherry, ambos marcadores se solapan en el espectro fluorescente y el yoduro de propidio fue reemplazado por DAPI. Del mismo modo, el DAPI atraviesa de forma ineficaz una membrana intacta, por tanto, tiñe preferente a las células muertas (Figura 25).

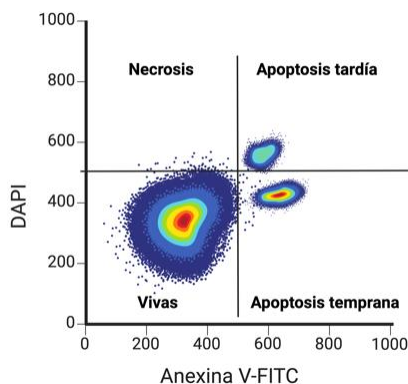


Figura 25: Tipos de muerte celular en función de los marcajes con Anexina V-FITC y DAPI.

En primer lugar, se sembraron en placa de 6 pocillos $0,2 \times 10^6$ fibroblastos junto con células tumorales HCC4006 mCherry en ratio 1:10. 24

horas después, se añadió osimertinib a 250 y 500 nM. Pasadas 72 horas, se recogió en un tubo el sobrenadante de los pocillos con las células muertas, el PBS de los lavados realizados y las células tripsinizadas correspondientes. A continuación, se centrifugó a 300 g durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante. Seguidamente, se resuspendió la fracción de células con 200 µl de tampón de unión de anexina (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4) y se incubaron 0,1 x10⁶ células en 100 µl de este tampón junto con 3,5 µl de anexina V - FITC (Invitrogen) y 1 µl de DAPI 1 µg/ml durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añadió tampón de unión de anexina hasta una cantidad suficiente de 500 µl. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta analizarse en un citómetro BD LSRFortessa X-20 (BD Bioscience). El *software* utilizado para el análisis fue el *FlowJo*TM (FlowJo LLC).

12.2. Cocultivo tridimensional

12.2.1. Técnica para la formación de esferas

La técnica de cocultivos tridimensionales se basa en la obtención de esferas utilizando fibroblastos modificados mediante construcciones lentivirales (shNT, shNNMT), y la línea celular tumoral *EGFR*mutante HCC4006 donde la proporción establecida fue la misma que en los cocultivos en bidimensional (1 tumoral: 10 CAFs). Para la formación de las esferas, se utilizó la técnica de *hanging drop*. Para ello, se tripsinizaron las células, se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos y se preparó el cóctel de células en un tubo en la ratio establecida. Se utilizó una placa de 96 pocillos y para mantener un ambiente húmedo, se añadieron 120 µl de PBS en los pocillos laterales y 60 µl en los internos ya que las esferas se sembraron en la tapa de esta misma placa. A continuación, se sembró una gota de 20 µl por cada pocillo

con una concentración de $0,5 \times 10^5$ células. Una vez completada la siembra, invertimos la tapa rápidamente observando cómo las gotas quedaban en suspensión (Figura 26).

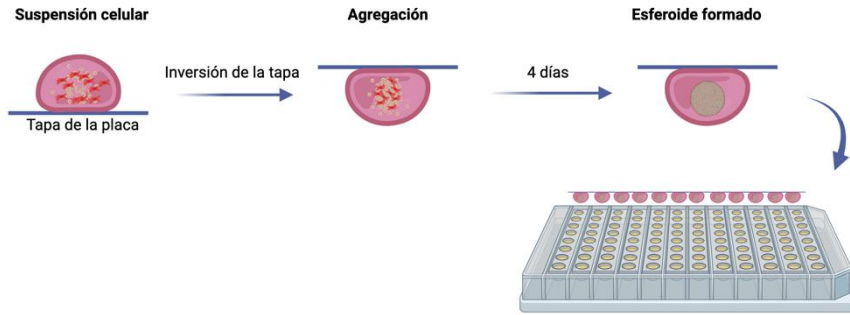


Figura 26: Representación esquemática de la formación de esferas a través de la técnica *hanging drop*.

12.2.2. Caracterización del modelo tridimensional

a) Estudio del tamaño de las esferas

Para caracterizar el cocultivo tridimensional, se estudió el tamaño de las esferas a diferentes tiempos. Las esferas se cultivaron según el método descrito anteriormente. Tras cuatro días de formación, se realizaron fotografías a 0, 3, 7, 10 y 14 días con el objetivo de 10x en el microscopio invertido (*Zeiss Primovert*). Las áreas de las esferas se procesaron con el programa *ImageJ* y se relativizó cada una de las áreas a su control a tiempo 0.

b) Inmunofluorescencia de las esferas

Otro de los estudios que se llevó a cabo fue la inmunofluorescencia en las esferas. El procedimiento empleado fue muy similar al del cultivo bidimensional descrito en la sección 9. Se juntaron en un pocillo 5 esferas de

la misma condición. Se realizaron dos lavados con DPBS y se fijó con PFA 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se permeabilizó con Tritón™ X-100 (v/v) al 0,5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras los lavados con DPBS, se bloqueó con BSA al 4% durante 1 hora y se procedió a incubar con los anticuerpos primarios y secundarios tal y como se ha descrito en el apartado 9. Para la elección de los anticuerpos secundarios y con el objetivo de evitar el solapamiento de las señales, se tuvo en cuenta que las células tumorales estaban marcadas con la molécula mCherry (absorción entre 540-590 nm; emisión entre 550-650 nm) (Tabla 14 y 15).

Tabla 14: Lista de anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia

ANTICUERPOS PRIMARIOS				
Especificidad	Origen	Dilución	Casa comercial	Referencia
E-cadherina (CDH1)	Conejo	1:100	Cell Signaling Technology	3195
Vimentina (VIM)	Conejo	1:500	Cell Signaling Technology	5741

Tabla 15: Lista de anticuerpos secundarios empleados en inmunofluorescencia

ANTICUERPOS SECUNDARIOS				
Especificidad	Fluorocromo	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti-Conejo IgG	Alexa Fluor™ 488 (verde)	1:1000	Fisher Scientific	A11008

Para la CDH1/VIM se utilizó un láser de excitación de 488 nm (fluorescencia verde). Para mCherry se excitó con un láser de 594 nm y para el Hoechst 33342 se utilizó un láser de 405 nm (fluorescencia azul).

Finalmente, se cuantificó la intensidad y número de células positivas a estas tinciones respecto al total de células. Además, se estudió el área, perímetro y la distancia entre los núcleos a través del *software Qupath*.

c) Estudio de la apoptosis en el modelo tridimensional mediante inmunofluorescencia

De forma paralela al estudio de viabilidad celular basada en los niveles de ATP, se procedió a analizar el grado de apoptosis mediante la Anexina V por inmunofluorescencia. Para ello, se recogieron 5 esferas en un pocillo, se realizaron lavados con DPBS y se incubó con Hoechst 33342 (1:1000) y Anexina V-FITC (2,5 µl) en 100 µl de tampón de unión de anexina durante 30 minutos. Posteriormente, se visualizó mediante microscopia confocal para el modelo tridimensional (Olympus FV1000) con los objetivos de 10x o 20x. Para la Anexina V-FITC, se utilizó un láser de excitación de 488 nm (fluorescencia verde). Para mCherry, se excitó con un láser de 594 nm y para el Hoechst 33342 se utilizó un láser de 405 nm (fluorescencia azul).

12.2.3. Medida de la viabilidad celular mediante ensayo de luminiscencia

CellTiter-Glo[®] (Promega) o ensayo de viabilidad celular en cultivo celular tridimensional se basa en la cuantificación de ATP, un biomarcador de células metabólicamente activas. Al producirse la lisis celular, se genera una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente, la cual es directamente proporcional al número de células viables (Figura 27).

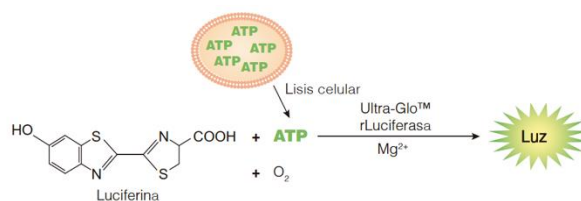


Figura 27: Reacción de la luciferasa utilizada en la medida de viabilidad celular. Las células se lisan, al añadirse la luciferasa, el ATP presente produce luz. A mayor número de células vivas, mayor es la luz producida.

Tras 4 días de incubación, se observó que las esferas ya estaban formadas. En este momento, las esferas que se encontraban en suspensión se trasladaron a placas de ultra baja adherencia (ULA) (Costar, Corning®). Se añadió osimertinib disuelto en RPMI para construir una escala creciente de concentraciones (0-10 μ M). Se colocó una esfera por pocillo, utilizando un total de 5 esferas por concentración. Tras 72 horas postratamiento, se recogieron las 5 esferas por concentración en un mismo tubo y se centrifugaron a 300 g durante 3 minutos. Seguidamente, en una placa blanca de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) se añadieron las 5 esferas de cada condición por pocillo, junto con un volumen de 100 μ l de sobrenadante. Posteriormente, se añadió el mismo volumen del componente *CellTiter-Glo*® (Promega) que de medio con las esferas y se agitó orbitalmente durante 5 min a 500 g para inducir la lisis. Finalmente, se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia y se midió mediante luminiscencia (VICTOR3 V Multilabel Reader- Perkin Elmer).

12.2.4. Estudio de la resistencia tumoral a través de medios condicionados

El uso de los medios condicionados es una herramienta útil para comprender cómo las células tumorales interactúan con su entorno tumoral y cómo dicha interacción contribuye a la progresión y agresividad tumoral.

Para ello, se sembraron las esferas tal y como se ha descrito anteriormente. Tras su formación, se recogió el medio de cultivo de las heteroesferas HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT y se centrifugó para eliminar cualquier resto celular. A continuación, las homoesferas HCC4006 fueron tratadas con el medio condicionado de las heteroesferas en una proporción 1:2 con medio fresco RPMI y osimertinib a la concentración IC_{50} previamente calculada (10 nM). Tras 72 horas de tratamiento, se

recogieron las esferas y determinamos la viabilidad celular mediante el ensayo de *CellTiter-Glo*[®].

12.2.5. Estudio de secreción de múltiples citoquinas

La detección simultánea de múltiples citoquinas es una herramienta poderosa para el estudio de la regulación de procesos celulares donde están implicadas múltiples proteínas. Este experimento se llevó a cabo a través de un kit compuesto por 41 factores de crecimiento (Abcam[®]) (Tabla 16).

Tabla 16: Tabla resumen de las citoquinas analizadas mediante un *array* de anticuerpos

Citoquinas											
POS	POS	NEG	NEG	AR	bFGF	b-NGF	EGF	EGFR	FGF-4	FGF-6	FGF-7
POS	POS	NEG	NEG	AR	bFGF	b-NGF	EGF	EGFR	FGF-4	FGF-6	FGF-7
CSF	GDNF	GMCSF	HB-EGF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-6	IGF-I	IGF-ISR
CSF	GDNF	GMCSF	HB-EGF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-6	IGF-I	IGF-ISR
IGF-II	MCSF	MCSF-R	NT-3	NT-4	PDGF-R α	PDGF-R β	PDGF-AA	PDGF-AB	PDGFBB	PIGF	SCF
IGF-II	MCSF	MCSF-R	NT-3	NT-4	PDGF-R α	PDGF-R β	PDGF-AA	PDGF-AB	PDGFBB	PIGF	SCF
SCFR	TGF- α	TGF- β	TGF- β 2	TGF- β 3	VEGF	VEGF-R2	VEGF-R3	VEGF-D	BLANK	BLANK	POS
SCFR	TGF- α	TGF- β	TGF- β 2	TGF- β 3	VEGF	VEGF-R2	VEGF-R3	VEGF-D	BLANK	BLANK	POS

Tras los días de formación de las heteroesferas, se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron para eliminar cualquier resto celular. A continuación, las membranas se bloquearon con la solución tampón de bloqueo del kit durante 30 minutos. Después, se retiró el bloqueo y se incubaron con 1 ml de muestra de los sobrenadantes de interés a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se llevaron a cabo los lavados necesarios durante 5 minutos y se incubaron las membranas con el conjugado de biotina a 4°C durante toda la noche. Tras nuevos lavados, las membranas se incubaron con el conjugado HRP Estreptavidina durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, tras los lavados finales, se incubaron las membranas

con la solución de revelado y se procedió a la lectura de las imágenes mediante el sistema *ChemiDoc*TM XRS+ (Bio-Rad). Finalmente, la imagen obtenida se analizó mediante densitometría con el programa informático *ImageLab* (Bio-Rad).

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y ELABORACIÓN DE FIGURAS

El análisis estadístico y las figuras de los datos generados en los diferentes experimentos *in vitro* se realizaron a través del *software* Excel, *GraphPad Prism* versión 9.5, *Qupath* y la plataforma BioRender.com.

Los datos se expresaron como la media $\pm$ DS. Para realizar comparaciones entre los grupos FN-CAF, CAF shNT-shNNMT, se utilizaron los tests estadísticos *t-student*, un análisis de varianza *one-way* ANOVA (comparaciones entre tratamientos dentro de cada grupo (comparaciones múltiples)) o correlaciones de Pearson según correspondiese. En el estudio de correlación entre los datos histológicos e inmunohistoquímicos y la progresión y supervivencia de los pacientes, se llevó a cabo un estudio de *Kaplan-Meier* como estimador no paramétrico de la función de supervivencia. En este caso se utilizó el test de *Log-rank*.

En todas las situaciones se rechazó la hipótesis nula cuando los valores del test presentaban un valor p superior a 0,05, aceptándose la hipótesis alternativa. Las significancias con un p valor inferior a 0,01 se englobaron conjuntamente (**) para favorecer la simplificación de las figuras.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS CAFs Y FNs AISLADOS DE BIOPSIAS DE CPNM

En el desarrollo de cualquier investigación experimental *in vitro* surge el dilema entre modelizar la enfermedad mediante el uso de cultivos celulares primarios o de líneas celulares comerciales. Ambas opciones son válidas, siendo la mejor opción aquella que mejor se adapte a los objetivos, teniendo en cuenta sus limitaciones. En nuestro caso, el estudio del impacto del estroma en el CPNM se llevó a cabo mediante el análisis fenotípico y funcional de cultivos primarios de fibroblastos procedentes de las biopsias quirúrgicas de pacientes afectados por esta enfermedad. Los cultivos primarios constituyen una herramienta valiosa para abordar la heterogeneidad real entre diferentes pacientes y permiten comparar los resultados *in vitro* con las biopsias de tejido parafinado y sus historiales clínicos, permitiendo obtener una visión contextualizada de las evidencias experimentales que no se puede obtener utilizando líneas celulares comerciales. Además, para identificar marcadores específicos de CAFs utilizamos como controles los cultivos primarios de fibroblastos aislados de tejido normal adyacente a la biopsia tumoral (y que denominamos fibroblastos normales, FNs) que, a su vez, nos permiten minimizar el impacto de las diferencias interindividuales.

Otro aspecto a tener en cuenta es que, a diferencia de las líneas celulares, los cultivos primarios procedentes de biopsias tisulares presentan una diversidad celular más amplia, crucial para estudiar las complejas interacciones celulares que se producen en el MAT. Además, la mayoría de las líneas comerciales de fibroblastos suelen ser células inmortalizadas, lo cual puede conducir a cambios en el fenotipo e inestabilidad genética que acaban

alterando su funcionamiento normal. Por tanto, los cultivos celulares primarios permiten obtener resultados más relevantes para comprender la compleja biología de los tejidos. No obstante, tal y como se observará a lo largo de esta sección, la principal limitación del cultivo primario es la gran variabilidad entre los pacientes, pudiendo dificultar la interpretación de los resultados en algunos casos. Esta heterogeneidad inter e intraindividual constituye una característica remarcable de los CAFs y también se observa en los fibroblastos controles (Sun *et al.*, 2022; Wong *et al.*, 2022). De hecho, los fibroblastos alejados de la zona tumoral procedentes de pacientes con CPNM pueden estar expuestos, en cierta medida, a señales protumorales, con lo cual, podrían no ser totalmente “normales” (D. Hu *et al.*, 2023). Sin embargo, su utilización permite disminuir, si cabe, la brecha entre la investigación clínica y básica ya que son las propias células de los pacientes las que actúan como controles en cada experimento.

Al establecer un cultivo primario mediante la digestión enzimática del tejido pulmonar, es necesario controlar la obtención de cultivos mixtos o diferentes estirpes celulares, como células epiteliales, inmunitarias o endoteliales. Con el fin de verificar la pureza de nuestras poblaciones celulares, se realizó una caracterización de dichas células a pase 4, utilizando marcadores distintivos del linaje mesenquimal (VIM, α -SMA) comparándolo con otros marcadores epiteliales (como CDH1) por inmunofluorescencia tal y como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos (Figura 24) (Sahadevan & Allen, 2022). Estos análisis revelaron que todos los cultivos utilizados en este trabajo fueron positivos para VIM, con un bajo porcentaje para α -SMA y negativos para CDH1 y, por tanto, confirman que se encuentran libres de células epiteliales (ver sección Material y Métodos). Además, el análisis mediante microscopía de campo claro mostró una clara morfología de

fibroblasto en todos los cultivos, reforzando la consistencia de los resultados obtenidos.

Otro de los desafíos a la hora de utilizar cultivos primarios radica en el conocido límite de Hayflick (Hayflick, 1965). Este principio establece que las células somáticas humanas presentan un límite finito en el número de veces que pueden dividirse antes de entrar en un estado de senescencia y desarrollar cambios fenotípicos que pueden condicionar la continuidad de los experimentos. Por tanto, se precisa congelar un gran *stock* de células durante los primeros pases. En esta línea, los experimentos se llevaron a cabo en el rango de pases 4 a 12, siendo fundamental el uso de pases equivalentes entre líneas celulares procedentes de distintos individuos para reducir la variabilidad en los resultados (Parker *et al.*, 2023).

Una vez realizado el aislamiento de los fibroblastos procedentes de pacientes con CPNM, tal y como se describe en la sección de Material y Métodos, se procedió a caracterizar las poblaciones clasificadas como FNs y CAFs. Para ello, se estudiaron características funcionales y se identificaron marcadores asociados al proceso fibrótico y al fenotipo mesenquimal mediante diferentes técnicas celulares y moleculares.

1.1. Proliferación y cierre de herida *in vitro* en FNs y CAFs

La activación de los fibroblastos del estroma tumoral afecta a su capacidad de proliferar, migrar, secretar y contraerse para facilitar el cierre de heridas, lo que ocurre en procesos como la embriogénesis, la cicatrización de heridas o la fibrosis asociada al MAT (Kalluri & Zeisberg, 2006; Tomasek *et al.*, 2002). Para analizar la proliferación de FNs y CAFs, se realizaron contajes mediante el método de exclusión y contaje con azul tripán. En la Figura 28

podemos observar que, a las 72 horas, los CAFs presentaron una ligera disminución en la tasa de crecimiento respecto a los FNs. Tradicionalmente, los CAFs han sido conocidos por su papel en la remodelación de la MEC, así como por presentar mayor capacidad proliferativa (Itoh *et al.*, 2022; Peng *et al.*, 2013). Estos resultados, aparentemente contradictorios, podrían ser explicados teniendo en cuenta que existen múltiples subtipos de CAFs con diferentes tasas proliferativas y funciones dentro del tumor (Davidson *et al.*, 2020; Simon & Salhia, 2022). Esta gran diversidad nos obliga a profundizar en el estudio de las rutas moleculares que regulan las características funcionales de los CAFs del CPNM.

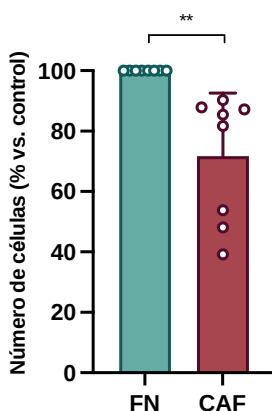
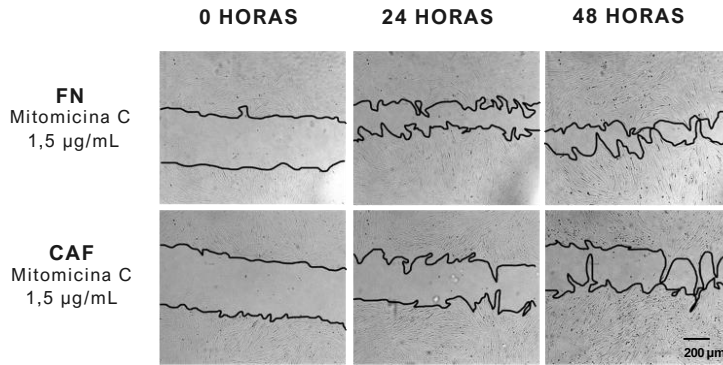


Figura 28: Crecimiento celular en las poblaciones de FNs y CAFs. Las ratios se calcularon considerando el crecimiento de los CAFs respecto a sus FNs. N=8 FNs y N=8 CAFs. ** $p \leq 0,01$.

A continuación, estudiamos la migración de los FNs y CAFs mediante un ensayo de cierre de herida *in vitro* a las 0, 24 y 48 horas, también conocido en inglés como *wound healing* o *scratch assay* (Figura 29).

A



B

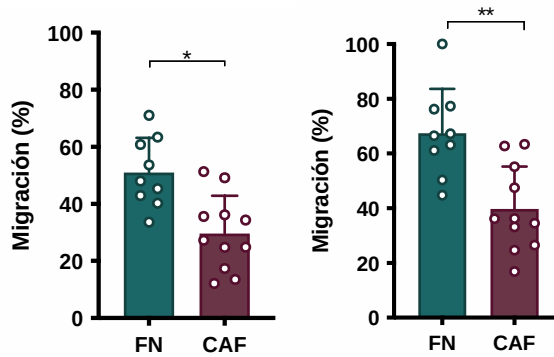


Figura 29: Ensayo de cierre de herida por FNs y CAFs en presencia de mitomicina C a 0, 24 y 48 horas. (A) Imágenes representativas de campo claro del cierre de una herida *in vitro* a 0, 24, 48 horas (x5). (B) Cálculo del área cerrada por las células a 24 y 48 horas. N=11 FNs y N=11 CAFs. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$

En la Figura 29A, B, se puede observar que el área cerrada de los FNs fue significativamente superior a la de los CAFs. Por tanto, podemos concluir que los FNs, que en principio presentan una menor proporción de miofibroblastos, mostraron una mayor capacidad migratoria.

De nuevo, estos resultados plantean cuestiones sobre la compleja dinámica celular de las distintas subpoblaciones de CAFs. Algunos autores

afirman que la capacidad migratoria de los CAFs está incrementada respecto a la de los FNs (Itoh *et al.*, 2022; J. Li *et al.*, 2016). De hecho, se ha demostrado que el cultivo de los FNs con el medio condicionado de los CAFs aumenta su capacidad migratoria (Itoh *et al.*, 2022). Sin embargo, el estudio de los miofibroblastos de otras patologías como la enfermedad de Crohn, ha caracterizado una menor capacidad migratoria y mayor componente secretor en el cierre de las heridas y fibrosis (Klingberg *et al.*, 2013; C. Li & Kuemmerle, 2014). En un primer paso, los fibroblastos migran y proliferan para ocupar el espacio en una herida. Los CAFs, una vez activados, se transforman a un fenotipo miofibroblasto, tal y como sugieren nuestros resultados (Shinde *et al.*, 2017). De hecho, en la literatura se ha descrito un mayor contenido en fibras de α -SMA en ciertas subpoblaciones de CAFs, catalogados como mioCAFes (Öhlund *et al.*, 2017). Este proceso, también conocido como FMT y descrito en la Introducción, permite a los fibroblastos adquirir cambios morfológicos y funcionales los cuales se relaciona mayoritariamente con el papel de la remodelación de la MEC (Shinde *et al.*, 2017). De este modo, nuestra cohorte de CAFs presentaría características secretoras parcialmente similares a las del fenotipo miofibroblasto de otras enfermedades, como la fibrosis pulmonar idiopática, caracterizada por un proceso de remodelación fibrótica dirigida por la FMT (Doolin *et al.*, 2021).

1.2. Capacidad contráctil y secreción de colágeno

Para estudiar la capacidad remodeladora de los fibroblastos en la MEC, realizamos un ensayo de contracción de colágeno (Figura 30). Las células se cultivaron sumergidas en una matriz de colágeno a una concentración de 3 mg/ml. Posteriormente, se estudió el grado de contracción de esta matriz a las 24 y 48 horas.

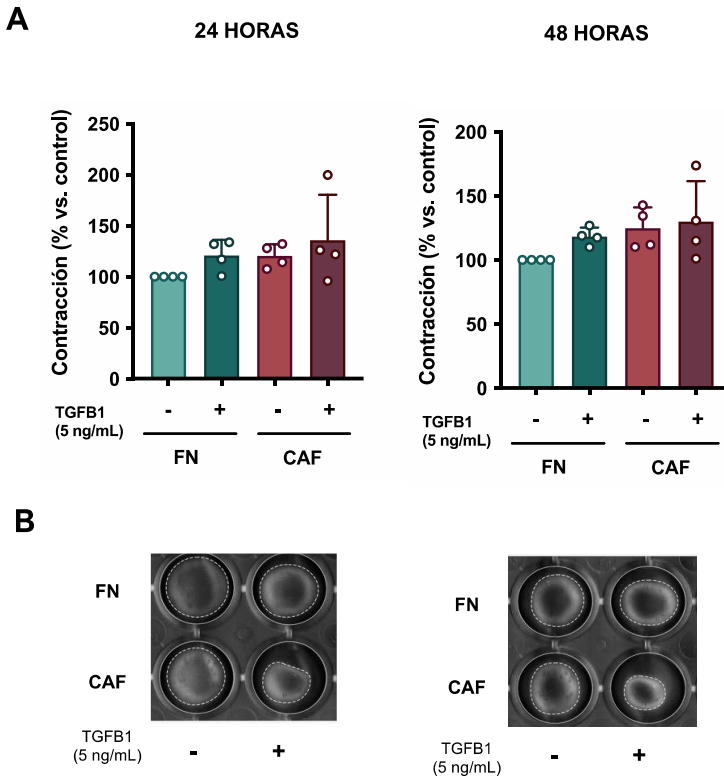


Figura 30: Contracción de colágeno de FNs y CAFs. (A) Cálculo de la variación del área de colágeno a las 24 y 48h con y sin TGFβ1 (5 ng/ml). (B) Imagen representativa de la variación del área de colágeno a las 24 y 48 horas. Se midió la diferencia de área de las imágenes capturadas mediante el programa *ImageJ* a las 24h y 48h. N=4 FN y N=4 CAF.

Como se puede observar en la Figura 30, los CAFs presentaron un ligero aumento de su capacidad contráctil respecto a sus parejas control. En este sentido, los CAFs contribuyen a generar fuerzas directas a través de la MEC, estirando los espacios preexistentes y generando una membrana basal permisiva a la invasión celular (Torok, 2018).

Los fibroblastos del estroma son los principales responsables de la deposición de colágeno en el MAT (Cox & Erler, 2014). Es por ello que

completamos el estudio de la capacidad remodeladora de la MEC por parte de nuestros CAFs analizando la expresión de *COL 1A1* por RT-PCR. Tal y como se muestra en la Figura 31, los CAFs presentaron un incremento significativo de la expresión del gen respecto a los FNs. Además, el TGFB1 fue capaz de inducir significativamente la expresión del *COL 1A1* tanto en FNs como en CAFs.

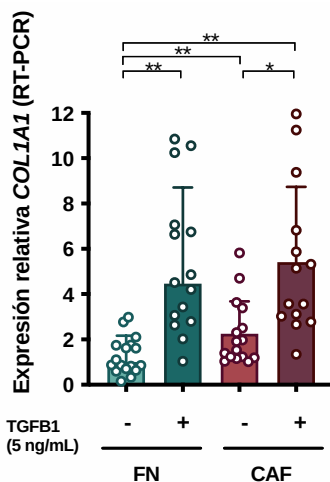


Figura 31: Niveles de *COL 1A1* extracelular en los FNs y CAFs tratados con TGFB1. RT-PCR. Tras sembrar las células, se trataron con TGFB1 (5 ng/ml) durante 72 h. La expresión del gen se normalizó a la expresión del gen constitutivo *ACTB*. Los resultados están relativizados todos al control no tratado. N=17 FNs y N=16 CAFs. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$ en comparación con el grupo control FNs.

Estos resultados coinciden con lo descrito por otros autores (Ma *et al.*, 2023). El colágeno no solo proporciona un soporte estructural sino también modula señales celulares y participa en la regulación de la inflamación y la respuesta inmunitaria (Kaur *et al.*, 2019). Así, la transformación hacia el fenotipo miofibroblasto podría implicar una priorización en la síntesis y secreción de componentes de la MEC y la disminución aparente de la tasa de proliferación y migración, tal y como indican nuestros resultados. En conjunto,

podemos concluir que los CAFs de CPNM se caracterizan por una mayor plasticidad y capacidad de remodelación del MAT que va más allá de la fase inicial de la migración y proliferación celular, presentando un fenotipo eminentemente hipersecretor de MEC (Erdogan & Webb, 2017).

1.3. Secreción de TGFB1 en los cultivos primarios de CAFs y FNs

El factor de crecimiento TGFB1 es uno de los activadores de la EMT mejor conocidos, siendo un potente promotor de la invasión, las metástasis, la resistencia a terapias dirigidas, y un inhibidor de la inmunidad antitumoral (Jakowlew, 2006; Neel *et al.*, 2012; E. J. Walker *et al.*, 2019; M. Zhang *et al.*, 2021). A lo largo de los años también se ha descrito como una citoquina profibrótica al regular la FMT, induciendo el fenotipo miofibroblasto (Shen *et al.*, 2016). En definitiva, niveles elevados de TGFB1 proporcionan un microambiente tumoral profibrótico (Shi *et al.*, 2020). Por ello, nos propusimos determinar sus niveles de secreción en nuestros cultivos primarios de FNs y CAFs. En la Figura 32 podemos observar que los cultivos de CAFs tienen incrementada significativamente la secreción de TGFB1 al medio de cultivo comparados con los FNs. Este hecho nos lleva a afirmar que existe una correlación entre el TGFB1 y la activación del fenotipo EMT/FMT en los CAFs.

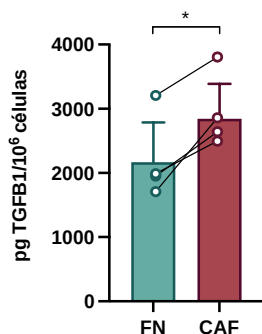


Figura 32: Secreción de TGFβ1 en los FNs y CAFs. Concentración de TGFβ1 medido por ELISA en los sobrenadantes de los cultivos tras 48 horas. Los resultados se normalizaron respecto al número de células de cada condición. N=4 FNs y N=4 CAFs * $p \leq 0,05$ en comparación con el grupo control FNs.

En la literatura, se describe al TGFβ1 como un factor que interviene en el arresto del ciclo celular y la migración. De hecho, el TGFβ1 se considera un factor profibrótico al inducir el fenotipo miofibroblasto hipersecretor responsable de la deposición excesiva de componentes de la MEC como el colágeno (Melzer *et al.*, 2017; Salvarani *et al.*, 2017). Nuestros resultados muestran que los CAFs aislados de CPNM parecen activar cambios funcionales como la contracción del citoesqueleto (Figura 30) y la secreción de la MEC (Figura 31), en lugar de adoptar fenotipos hiperproliferativos o migratorios (Figura 28 y 29) y, además, se caracterizan por presentar mayor secreción de TGFβ1 (Figura 32) (Belhabib *et al.*, 2021).

En definitiva, los resultados obtenidos muestran que existe una cierta uniformidad funcional en nuestra colección de CAFs pulmonares. Sin embargo, es evidente que existe una marcada heterogeneidad interindividual e intratumoral, lo que sugiere la presencia de diferentes fenotipos de CAFs *in vitro*, como de hecho existen en diferentes tipos de cáncer (Elyada *et al.*, 2019; Irvine *et al.*, 2021; Lambrechts *et al.*, 2018; Öhlund *et al.*, 2017). Además, no

podemos olvidar que los cultivos primarios de fibroblastos se encuentran en un entorno artificial, cultivados en un modelo bidimensional sin matriz ni un microambiente enriquecido. Todo ello, junto con los pases consecutivos *in vitro*, podría alterar su fenotipo y, por tanto, explicar parte de dicha heterogeneidad, como se ha evidenciado en estudios previos (Hinz, 2012; Luo *et al.*, 2022). De este modo, es crucial considerar las condiciones de cultivo celular para poder interpretar los resultados sobre la contribución de los CAFs en el desarrollo tumoral.

2. NNMT COMO MARCADOR DE LOS CAFs

Durante años, numerosas investigaciones se han centrado en la búsqueda e identificación de marcadores canónicos y distintivos para los CAFs, especialmente de aquellos que se relacionan con el subtipo miofibroblasto (C. Han *et al.*, 2020). Sin embargo, esta perspectiva ha sido cuestionada con el uso de técnicas *scRNA-seq* y la comparativa entre distintos tipos de cánceres, que han identificado diferentes subpoblaciones de CAFs con características propias diferenciadas (Cords *et al.*, 2023; Irvine *et al.*, 2021; Lambrechts *et al.*, 2018; Nurmik *et al.*, 2020; Öhlund *et al.*, 2017). Además, el carácter inespecífico y el papel controvertido de los marcadores clásicos en el manejo clínico del CPNM, como α -SMA, FAP, PDGFR o FSP1, entre otros, precisa explorar otras alternativas que nos ayuden a comprender el papel de los CAFs en esta enfermedad marcada por la gran heterogeneidad.

En la Introducción hemos comentado el especial interés que ha cobrado NNMT en los últimos años. Esta enzima es una reguladora metabólica que contribuye a la homeostasis de la metilación celular catalizando la transferencia de grupos metilo a partir de la SAM (Hong *et al.*, 2015). En el contexto del estroma tumoral, Eckert y colaboradores demostraron que NNMT juega un papel fundamental en la inducción del fenotipo CAF en el carcinoma ovárico (Eckert *et al.*, 2019). Además, la expresión de esta enzima en el estroma del carcinoma oral de las células escamosas contribuye al crecimiento tumoral (H. Zhao *et al.*, 2023). Por lo que respecta a las células de carcinoma, se ha implicado a NNMT con la resistencia a los ITQs en el CPNM (J. Wang *et al.*, 2022). Consecuentemente, la inhibición de NNMT es capaz de revertir a las células hacia un fenotipo más epitelial, menos invasivo y con mayor sensibilidad a la respuesta de los ITQs (J. Wang *et al.*, 2022; Y. Wang *et al.*, 2022). Por

tanto, nos planteamos si la expresión de NNMT esta alterada en nuestros cultivos primarios y, lo que es más importante, regula de alguna manera la activación de los CAFs del CPNM.

Los CAFs presentaron un incremento significativo en la expresión de proteínas implicadas en la FMT y características de fenotipo miofibroblasto, como α -SMA, FN1 y FAP (Eckert *et al.*, 2019; L. Wang *et al.*, 2017). Por otra parte, también se observó un incremento de marcadores mesenquimales implicados en el proceso EMT, como CDH2 y SNAI1 (Stanisavljevic *et al.*, 2015; J. You *et al.*, 2019; Jia You *et al.*, 2017). A su vez, se observó un aumento significativo de la expresión de NNMT, erigiéndola como un posible marcador de los CAFs asociado al estroma tumoral del CPNM (Eckert *et al.*, 2019) (Figura 33). Los factores de transcripción de la EMT, como SNAI1, regulan los programas de plasticidad celular y juegan un papel importante en la promoción del crecimiento tumoral y metástasis, así como en la progresión de la enfermedad (Jouppila-Mättö *et al.*, 2011). Algunos trabajos señalan que estos factores también se expresan en los CAFs, dotándolos de propiedades adicionales. Así, la sobreexpresión de SNAI1 en los CAFs conduce a un incremento de las zonas desmoplásicas, lo que influye en la reorganización de la MEC, además de potenciar la activación del programa EMT en las propias células tumorales epiteliales (Masugi, 2022; Stanisavljevic *et al.*, 2015; J. You *et al.*, 2019; Jia You *et al.*, 2017).

Completamos esta parte del estudio determinando los niveles de expresión de estos genes (Figura 34). Para la normalización de cada uno de ellos, se utilizó el gen de expresión constitutiva *ACTB*. De este modo, se observó una mayor expresión de *NNMT*, *ACTA2*, *CDH2* y *SNAI1* en los CAFs respecto a los FNs.

Con el fin de activar la FMT, los fibroblastos se trataron con TGF β 1 (5 ng/ml) durante 72 horas (Figura 33 y 34) incrementando de forma significativa todos los marcadores en los FNs, y de FAP, FN1, CDH2 y SNAI1 en los CAFs.

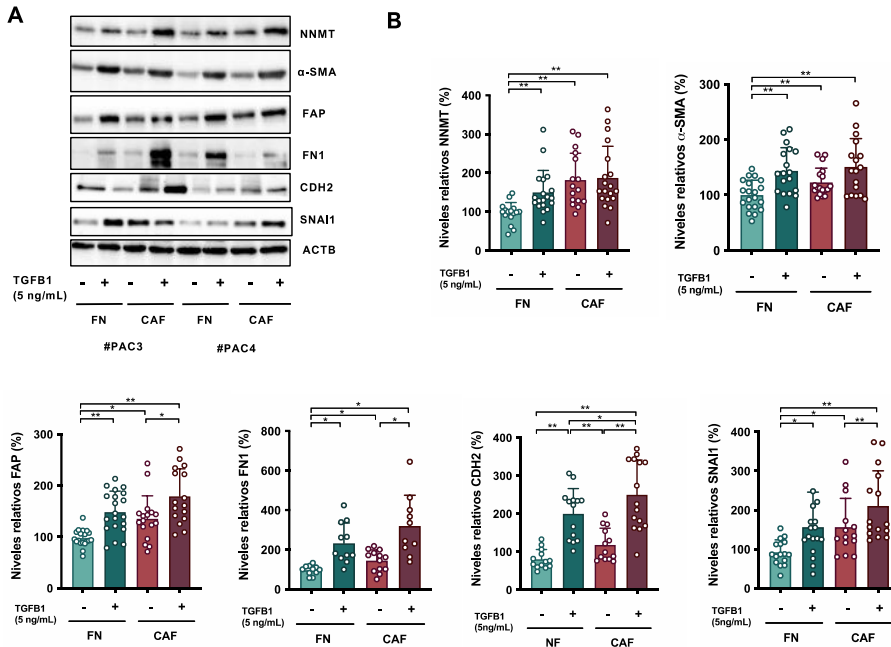


Figura 33: Inducción de la FMT y NNMT en los FNs y CAFs incubados con y sin TGF β 1. *Western blotting.* Los fibroblastos se sembraron y se trataron con y sin TGF β 1 (5 ng/ml). Tras 72 horas de incubación, se lisaron y se cuantificaron las proteínas NNMT, α -SMA, FN1, FAP, CDH2 y SNAI1. Las expresiones de dichas proteínas fueron normalizadas con la expresión de la proteína constitutiva ACTB. (A) Densitometrías de los resultados obtenidos en los FNs y CAFs. (B) Imágenes representativas de los niveles expresión de dichas proteínas en FNs y CAFs. Los resultados se muestran como porcentaje de expresión relativa al control no tratado. N=20 FN y N=20 CAF. * p $\leq$ 0,05 y ** p $\leq$ 0,01.

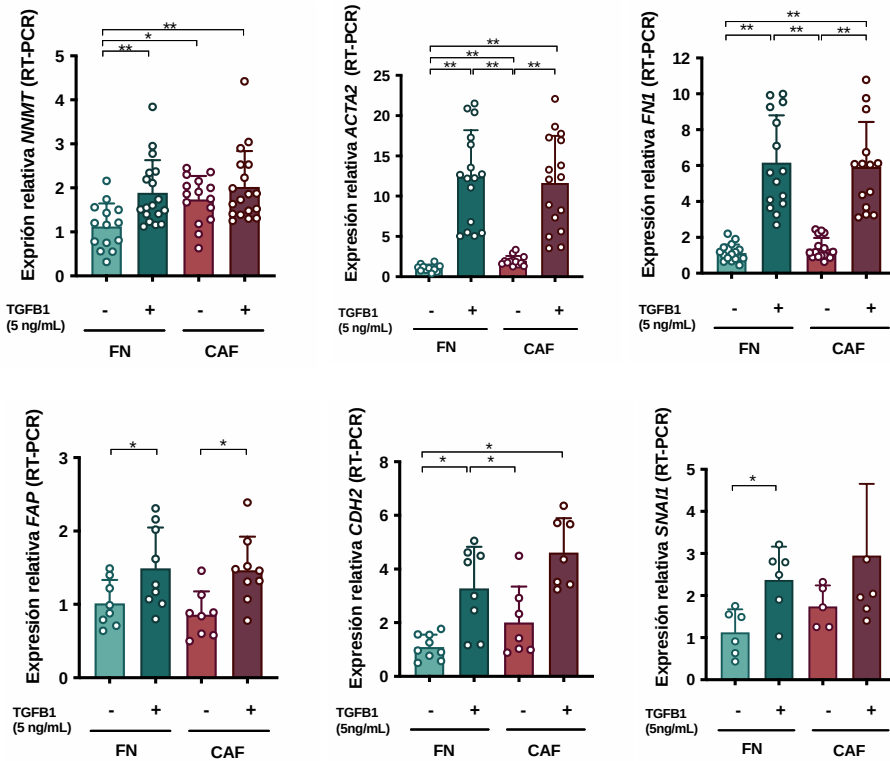


Figura 34: Inducción de la FMT en los FNs y CAFs tratados con y sin TGFB1. RT-PCR. Las células fueron tratadas con y sin TGFB1 (5 ng/ml). Tras 72 horas de incubación se extrajo el RNA, se cuantificó y se llevó a cabo la RT-PCR para medir la expresión de los genes *NNMT*, *ACTA2*, *FN1*, *FAP*, *CDH2* y *SNAI1*. Las expresiones de dichos genes fueron normalizados a la expresión del gen constitutivo *ACTB*. Los resultados están relativizados todos al control no tratado. N=18 FN y N=18 CAF. * p ≤ 0,05 y ** p ≤ 0,01

El aumento significativo de los marcadores de α -SMA, FAP, junto con los estudios funcionales, corroboran la hipótesis de que la mayoría de nuestros CAFs de CPNM presentan un fenotipo miofibroblasto (Eckert *et al.*, 2019; Jenkins *et al.*, 2022). Algunos autores los clasifican como mioCAF, caracterizados por elevada expresión de α -SMA y capacidad contráctil mediada por el TGFB1 (Öhlund *et al.*, 2017). Además, en respuesta al TGFB1, el aumento de los marcadores característicos de mioCAF responde a la

activación del proceso de la FMT (Öhlund *et al.*, 2017; Rockey *et al.*, 2013; P. Yang *et al.*, 2023).

A continuación, estudiamos de manera más detallada la posible correlación entre la expresión del marcador canónico del fenotipo miofibroblasto α -SMA y la de NNMT. Para ello, se analizó mediante inmunofluorescencia la presencia de fibras de α -SMA en cultivos de FNs y CAFs con y sin tratamiento con TGFB1 (5 ng/ml) durante 72 horas. Como se observa en la Figura 35A, C el porcentaje de fibroblastos α -SMA positivos fue mayor en los CAFs respecto a los controles. A su vez, tanto los FNs como los CAFs cultivados con TGFB1 presentaron un aumento significativo en el número de fibras de α -SMA, eso es, aumentó significativamente la población de miofibroblastos en ambos tipos celulares. Al analizar la expresión NNMT, comprobamos que esta proteína se localiza en el citoplasma (Figura 35A, B). En concordancia con los resultados de expresión proteica y génica, se observó un incremento en la expresión de NNMT basal en los CAFs respecto a los FNs, así como una mayor respuesta al estimular con TGFB1. Por tanto, estos resultados sugieren una posible coexpresión de α -SMA y NNMT, ya que en un fenotipo miofibroblasto inducido por TGFB1 ambos marcadores seguían un patrón de cambio similar (Figura 36). De hecho, los FNs en condiciones basales presentaron un menor porcentaje de coexpresión α -SMA/NNMT, con una tasa del 40%. En cambio, las otras tres condiciones (FNs tratados con TGFB1, CAFs basales y tratados con TGFB1) mostraron una elevada coexpresión entre ambas proteínas, 70, 74 y 74% respectivamente.

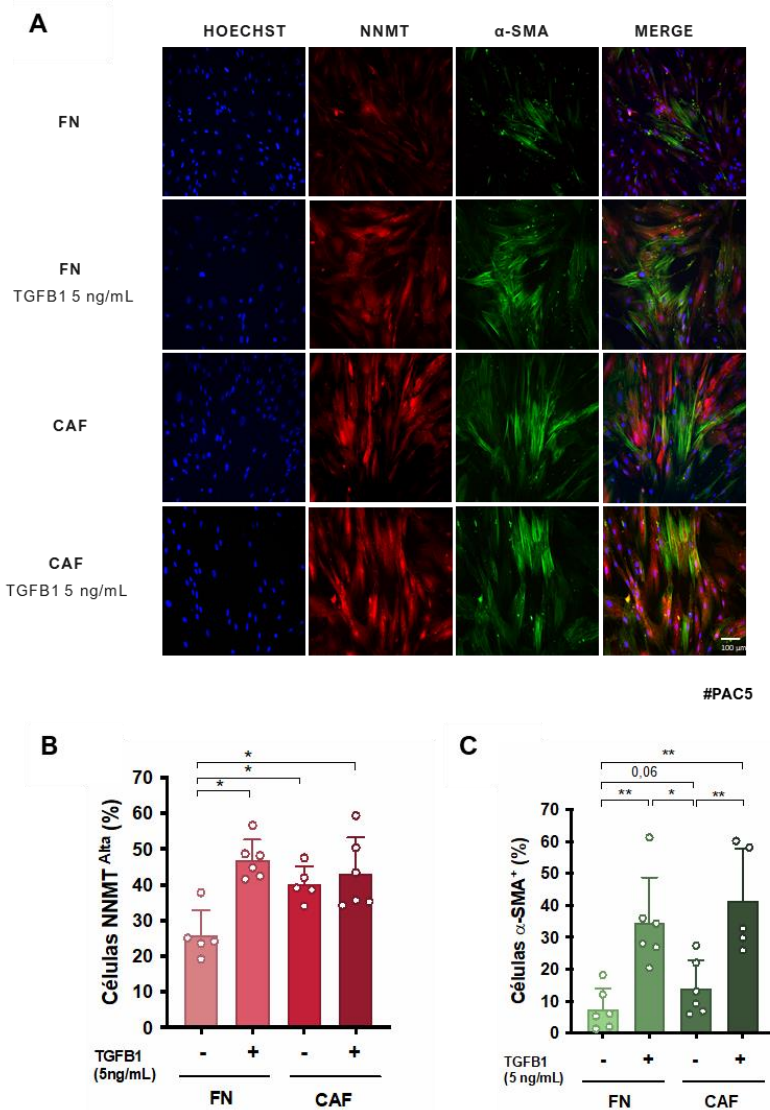


Figura 35: Inmunofluorescencia representativa de la expresión de α -SMA y NNMT en cultivos FNs y CAFs tras ser incubados en presencia o ausencia de TGFB1. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia visualizadas por microscopía. Los núcleos se tiñeron con Hoechst-33342 (en azul), NNMT en rojo y α -SMA en verde. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Leica Microsystems (20x). (B) Expresión del porcentaje de intensidad de NNMT en los FNs y CAFs incubados o no con TGFB1 respecto al control no tratado. (C) Expresión el porcentaje de células positivas a α -SMA en los FNs y CAFs incubados o no con TGFB1 respecto al control no tratado. N=6 FN y N=6 CAF. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$

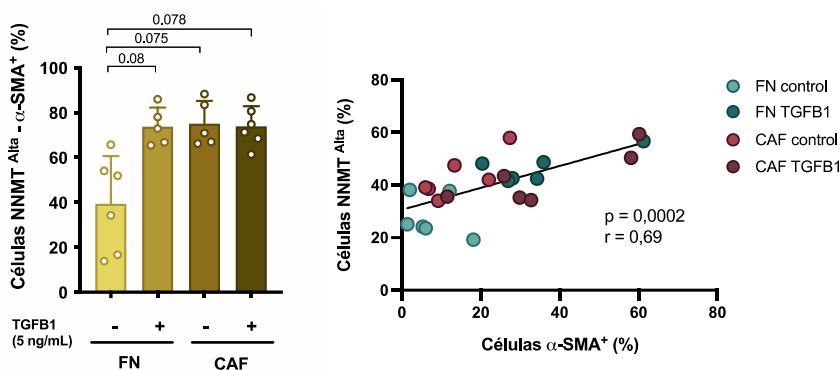


Figura 36: Porcentaje de coexpresión entre α -SMA y NNMT en cultivos FNs y CAFs tras ser incubados en presencia o ausencia de TGF β 1 mediante inmunofluorescencia. Coexpresión α -SMA-NNMT expresada como el porcentaje de células α -SMA positivas y expresión elevada de NNMT. N=6 FN y N=6 FAC.

En definitiva, estas determinaciones complementan los resultados observados en el análisis de expresión de proteínas mediante *Western blotting* o RT-PCR. La localización intracelular de las proteínas α -SMA y NNMT, así como los niveles de expresión en los lisados celulares, sugieren que nuestros CAFs se comportan como miofibroblastos en respuesta a la citoquina profibrótica y pro-EMT TGF β 1, sobreexpresando el marcador canónico α -SMA y la proteína NNMT. Asimismo, nuestros resultados señalan la posible existencia de diferentes subpoblaciones con metaestados parciales del fenotipo miofibroblasto. Este escenario para el CPNM es compatible con el descrito en otros estudios que avalan tanto el aumento del marcador característico de los miofibroblastos (α -SMA) como la NNMT en los CAFs de otros tipos de cáncer (Eckert *et al.*, 2019; H. Zhao *et al.*, 2023). En línea con estas observaciones, en el carcinoma oral escamoso también se ha observado una colocalización entre la NNMT y α -SMA medidas por inmunofluorescencia en la mayoría de los CAFs (H. Zhao *et al.*, 2023).

Con estos antecedentes y dadas las similitudes moleculares entre la FMT y EMT (Dongre & Weinberg, 2018; D'Urso & Kurniawan, 2020), planteamos la NNMT como un posible biomarcador del fenotipo CAF del estroma asociado al CPNM. Tal y como se evidencia en las Figuras 33 y 34, encontramos diferencias significativas tanto en la expresión de la proteína como a nivel de ARNm de la NNMT entre los CAFs y los FNs.

3. LA NNMT DEL ESTROMA TUMORAL COMO BIOMARCADOR DE PRONÓSTICO EN EL CPNM

Para explorar el impacto traslacional de nuestro estudio, se llevó a cabo un estudio inmunohistoquímico con las muestras de tejido parafinado de AC pulmonar almacenadas en el Hospital Universitario de la Ribera (Alzira). El objetivo concreto de este análisis consistió en establecer una correlación entre la cantidad de estroma en el tumor, la expresión de α -SMA y NNMT, y la evolución clínica de los pacientes de CPNM reclutados en nuestro estudio. Para ello, se recopilaron los datos clínicos de los pacientes que se describen en la Tabla 17.

Tabla 17: Datos demográficos de los pacientes con AC pulmonar estudiados por inmunohistoquímica. Pacientes intervenidos quirúrgicamente entre 2015 y 2019. N=27. SLP (0 = sin recaída; 1= con recaída); SG (0 = supervivencia; 1=*exitus*). Última revisión de los datos: 23 de febrero de 2023.

Características demográficas	
Número de pacientes	27
Edad diagnóstica (Años)	
Media	64
Rango	46-72
Sexo (n., %)	
Hombre	17 (63)
Mujer	10 (37)
Hábito tabáquico (n., %)	
Actual	8 (30)
Ex-fumador	12 (44)
No fumador	4 (15)
N/D	3 (11)
Estadio (n., %)	
IA	16 (59)
IB	3 (11)
IIA	5 (19)
IIIA	3 (11)

Mutaciones (n., %)	
<i>EGFR</i>	3 (11)
<i>KRAS</i>	7 (26)
<i>WT</i>	17 (63)
Supervivencia Libre Progresión (SLP) (n., %)	
0	13 (48)
1	14 (52)
Supervivencia Global (SG) (n., %)	
0	15 (56)
1	12 (44)

Las muestras de tejido tumoral fijado y parafinado fueron procesadas y teñidas con hematoxilina/eosina (HE), tinción tricrómica y con los anticuerpos contra α -SMA y NNMT. Las microfotografías de 4 pacientes representativos se muestran en la Figura 37 (ver Material Suplementario Figura S1: Imágenes de la colección completa de muestras procesadas).

La tinción tricrómica permite estudiar el estroma tumoral y, más concretamente, la contribución del componente mayoritario de la MEC, el colágeno, que aparece teñido de color azul. En la década de los 80, Flier *et al.* observó una similitud entre el estroma de las heridas y el de los tumores (Flier *et al.*, 1986). En ambas situaciones se evidencia una activación de la angiogénesis y de la respuesta inflamatoria, así como la presencia de fibroblastos hipersecretores de componentes de la MEC, pasando a denominarse estroma activado o reactivo (Bremnes *et al.*, 2011; Nissen *et al.*, 2019). En el contexto del cáncer, la reacción desmoplásica inicialmente se determinó como un mecanismo de defensa contra el crecimiento tumoral. No obstante, estudios recientes revelaron que el papel de la desmoplasia es mucho más complejo, apoyando la hipótesis de que estos elementos estromales favorecen la secreción de componentes y moléculas beneficiosas para la proliferación, supervivencia, invasión y metástasis tumoral (Ferrara *et al.*, 2021; Leask, 2020; Masugi, 2022; Morita *et al.*, 2020).

La positividad para α -SMA no sólo se atribuye a los fibroblastos-miofibroblastos del estroma, ya que también aparece en las paredes de los vasos y capilares sanguíneos, los cuales se encuentran de forma inevitable en nuestras muestras. Por otro lado, la tinción de NNMT mostró un patrón heterogéneo, siendo muy positiva en algunos tumores e inexistente o muy débil en otros (Figura 37).

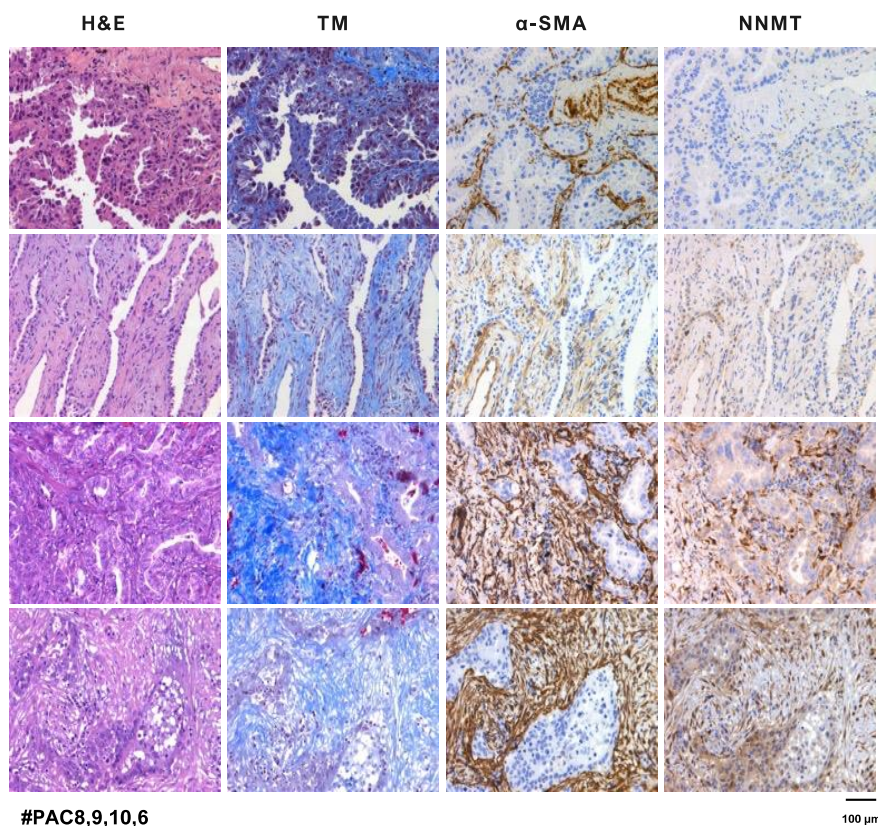


Figura 37: Análisis inmunohistoquímico de Hematoxilina/Eosina, Tricrómico de Masson y tinciones de α -SMA y NNMT en cortes pulmonares procedentes de pacientes con CPNM. Tras el montaje y desparafinado de las biopsias pulmonares de pacientes con CPNM, se hicieron tinciones de Hematoxilina (morado=núcleos celulares; rosa=citoplasma), Tricrómico (azul=fibras de colágeno, morado=núcleo celular, rojo=estructuras oxidadas y citoplasma), α -SMA (marrón=fibras de α -SMA) y NNMT (marrón=proteína NNMT en citoplasma y núcleos) (20x).

Se evaluó el porcentaje de volumen ocupado por el estroma a partir de las tinciones HE y tricrómica, y se establecieron dos grados de tinción para NNMT (tinción negativa-baja y elevada) y estroma (porcentaje ocupado por estroma elevado o reducido). El total de muestras analizadas (N=27) fueron clasificadas en N=10 con estroma bajo y N=17 con elevada proporción de estroma; y respecto a la NNMT, N=11 con baja expresión y N=16 con elevada positividad.

El análisis de esta colección revela una notable heterogeneidad inter e intraindividual, tanto a nivel morfológico como en porcentaje de tumor ocupado por el estroma, así como en cuanto a la expresión de α -SMA y NNMT. Además, se observó cómo aquellos tumores con un porcentaje de estroma menor tendían a expresar bajos niveles de α -SMA y NNMT, mientras que los tumores con una intensa coexpresión de α -SMA y NNMT presentaban una mayor área ocupada por el estroma. Podríamos hipotetizar una posible correlación de estos resultados con el estatus mutacional de oncogenes frecuentemente activados en el CPNM como *EGFR* o *KRAS* (Aramini *et al.*, 2020; S. E. Park *et al.*, 2019). Sin embargo, sería necesario incrementar el tamaño muestral para obtener una representación adecuada del 30% de pacientes con mutaciones en *KRAS* y del 10% con mutaciones en *EGFR* para establecer conclusiones firmes, además de asegurar que todos los pacientes fueran objeto de diagnóstico molecular, algo que no ocurrió en nuestro estudio.

En los últimos años se ha estudiado el papel de la NNMT como potencial biomarcador de pronóstico clínico asociado a las células tumorales de diversos tipos de cáncer como gástrico, cerebral, pancreático y carcinoma oral escamoso, entre otros (S. Li *et al.*, 2018; W. Liu *et al.*, 2023; W. Zhang *et al.*, 2022). Sin embargo, al analizar nuestras biopsias de pacientes con CPNM se pudo apreciar cómo la NNMT era positiva principalmente en los

fibroblastos/miofibroblastos del estroma tumoral. Únicamente se observaron células tumorales positivas a NNMT en algunos casos donde la tinción en el estroma era más intensa. Estos resultados están en la línea de lo descrito en otros tipos de cáncer, como el colorrectal, el de ovario, o el gástrico. (Eckert *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2020; L. Zhang *et al.*, 2021). Además, la sobreexpresión de este marcador en el estroma se ha relacionado con una supervivencia desfavorable, estadios avanzados, así como una respuesta negativa ante el tratamiento quimioterápico (Song *et al.*, 2020).

A continuación, mediante un análisis de Kaplan-Meier, se evaluó la posible relación entre el porcentaje de estroma reactivo, la expresión de α -SMA y NNMT, y la evolución clínica de los pacientes utilizando la supervivencia libre de progresión (SLP). Las curvas de supervivencia que se representan en la Figura 38 muestran una correlación estadísticamente significativa entre la SLP y el volumen ocupado por el estroma tumoral (Figura 38A izquierda) y el grado de expresión de NNMT (Figura 38A derecha). Por tanto, y pese al limitado tamaño muestral (N=27), podemos afirmar que aquellos pacientes de CPNM con un mayor porcentaje de estroma reactivo y, sobre todo, expresando este estroma niveles elevados de la proteína NNMT, tienen un peor pronóstico clínico y una recaída más temprana en la enfermedad.

Por último, se realizó el mismo análisis de Kaplan-Meier utilizando la supervivencia global (SG), calculada como el tiempo transcurrido entre la cirugía y la *exitus* (Figura 38B). Por lo que respecta al volumen ocupado por el estroma, los resultados no alcanzaron significación estadística (Figura 38B izquierda), si bien existe una tendencia similar al análisis con el SLP a diferencia del grado de expresión de NNMT que la alcanza (Figura 38B derecha). De este modo, aquellos pacientes con tumores cuyo estroma presenta una expresión elevada de NNMT tienen una peor evolución clínica. No obstante, el análisis de

la SG requiere de estudios más prolongados en el tiempo para establecer conclusiones definitivas.

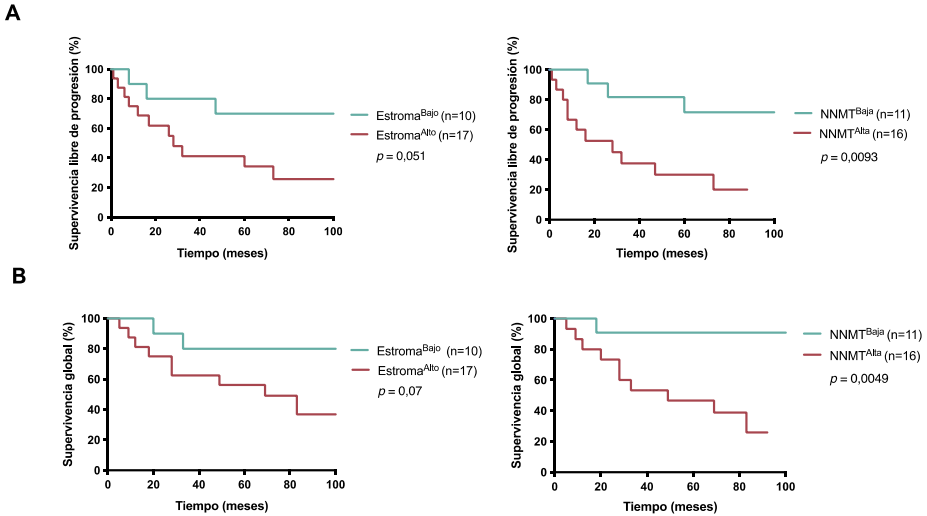


Figura 38: Estudio de la correlación entre el tiempo libre de progresión y supervivencia global de los pacientes con CPNM, el estroma tumoral y la NNMT. A) Porcentaje de pacientes libres de progresión en función del tiempo según el volumen de estroma ocupado y según el grado de tinción de NNMT. **B)** Kaplan Meier de la supervivencia global en función del tiempo según el volumen de estroma ocupado y grado de tinción de NNMT. Los P valores se muestran en las figuras.

En nuestra cohorte de pacientes de AC pulmonar, se establecieron como parámetros indicadores del pronóstico clínico tanto el estroma como la expresión de NNMT. A pesar de que tradicionalmente el porcentaje de estroma se ha considerado como un predictor de mala supervivencia (Smit *et al.*, 2020), el análisis con la NNMT mostró mejores resultados. Nuestros datos sugieren que los marcadores α -SMA y NNMT siguen un patrón de coexpresión similar al obtenido en las inmunofluorescencias de los fibroblastos de nuestra cohorte *in vitro* (Figura 35). Esta observación se relaciona con la desmoplasia caracterizada por una expansión del estroma tumoral causada por la deposición de componentes de la MEC por los CAFs con un fenotipo

miofibroblasto (Masugi, 2022). Con todas estas evidencias, los esfuerzos actuales están dirigidos a comprender mejor la comunicación entre el estroma reactivo (en nuestro caso, aquel que sobreexpresa NNMT) y las células tumorales para dilucidar su papel en la progresión tumoral.

En resumen, los resultados demuestran que una evolución desfavorable de los pacientes de CPNM se correlaciona con un mayor volumen de estroma y con los niveles de expresión de la NNMT. Los resultados *in vitro* indican que los CAFs del CPNM presentan un fenotipo miofibroblasto, hipersecretor y remodelador de la MEC. En consecuencia, podemos concluir que los CAFs de CPNM constituyen un papel fundamental en la desmoplasia asociada al tumor y que la NNMT podría ser un prometedor marcador de pronóstico clínico y potencial diana terapéutica dado el papel protumoral del estroma asociado al CPNM. Este aspecto será abordado en los siguientes apartados de esta sección.

4. IMPACTO FUNCIONAL DE LA MODULACIÓN DE NNMT EN LOS CAFs DEL ESTROMA ASOCIADO AL CPNM

Tras demostrar la estrecha relación entre NNMT y el fenotipo miofibroblasto en nuestros CAFs pulmonares y teniendo en cuenta las evidencias recientes citadas anteriormente, nos planteamos una serie de experimentos funcionales para demostrar si NNMT pudiera modular este fenotipo (Eckert *et al.*, 2019; H. Zhao *et al.*, 2023) y, por tanto, constituir una diana terapéutica específica dirigida contra el estroma asociado al CPNM. Con este propósito, reprimimos de manera estable NNMT mediante vectores lentivirales con secuencias de silenciamiento y estudiamos la expresión de marcadores moleculares y celulares del fenotipo miofibroblasto.

La represión de la NNMT se llevó a cabo en CAFs aislados de cinco pacientes de CPNM. De cada uno de ellos establecimos dos variantes, el control (shNT) y el subcultivo con NNMT reprimida (shNNMT), tal y como se describe en el apartado 10 de Material y Métodos. Tras la infección y posterior selección con el antibiótico puromicina, se determinaron los niveles de expresión de NNMT para comprobar el grado de eficacia de la represión. En la Figura 39 se observa cómo se logró una reducción de la expresión de NNMT del 50% tanto a nivel de ARNm como de proteína.

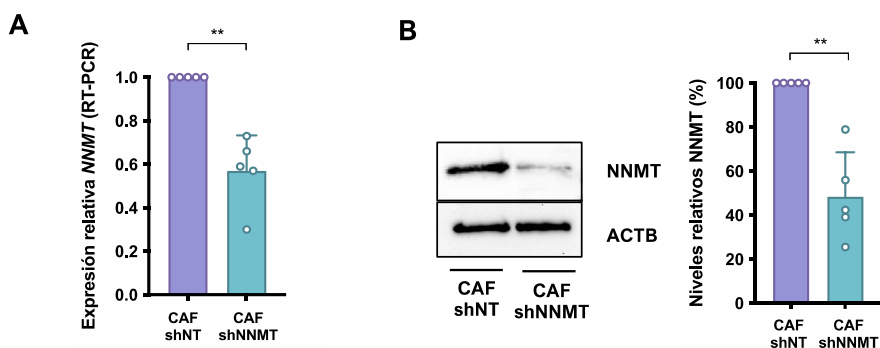


Figura 39: Silenciamiento de la NNMT en CAFs de CPNM tras la modulación génica mediante infección lentiviral de partículas shARN. (A) Niveles de ARNm de *NNMT* en CAFs shNT y shNNMT medido por RT-PCR. Los resultados se relativizaron a *ACTB* como gen constitutivo. (B izquierda) Densitometrías de los resultados obtenidos en los shNT y shNNMT. (B derecha) Imagen representativas de los niveles expresión proteica de NNMT. Los resultados se muestran como porcentaje de expresión relativa al control shNT. N=5 shNT y N=5 shNNMT. ** $p \leq 0,01$

4.1. NNMT modula el fenotipo miofibroblasto en los CAFs de CPNM

A continuación, determinamos la expresión génica y proteica de los marcadores fibróticos y mesenquimales analizados en los apartados anteriores. Como se observa en la Figura 40 y 41, la represión de NNMT dio lugar a una reducción significativa de los marcadores α -SMA, FAP y FN1, en línea con los resultados de Eckert *et al.*, que demostraron que la sobreexpresión o inhibición de la NNMT del estroma en el cáncer de ovario inducía un aumento o disminución, respectivamente, de la expresión de los marcadores característicos del fenotipo miofibroblasto, α -SMA y FN1. Además, en el contexto del estroma del carcinoma escamoso oral, el tratamiento de los CAFs con inhibidores de la NNMT condujo, a su vez, a una reducción de los niveles de expresión de α -SMA y COL1A1 (H. Zhao *et al.*, 2023). Estas evidencias, junto con nuestros resultados, demuestran que la expresión de la NNMT contribuye al mantenimiento del fenotipo miofibroblasto.

Por otra parte, nos planteamos si la actividad NNMT podría modular el efecto del TGFB1 sobre la expresión de estos marcadores. En la Figura 40 podemos observar cómo la respuesta al TGFB1 fue mucho más intensa en los CAFs shNT con respecto a los shNNMT. Más concretamente, el tratamiento con TGFB1 en los shNT incrementó en 0,5, 2,2, 1,7 y 1,4 en *NNMT*, *ACTA2*, *FAP* y *FN1* respectivamente; y en los shNNMT 0,1, 0,2, 0,5 y 0,8, en comparación con sus cultivos basales. Del mismo modo, se observaron resultados similares en el estudio de expresión proteica (Figura 41). Con todo, concluimos que la inhibición de NNMT no solo disminuye los marcadores fibróticos, sino que es capaz de atenuar la inducción del fenotipo FMT mediado por TGFB1.

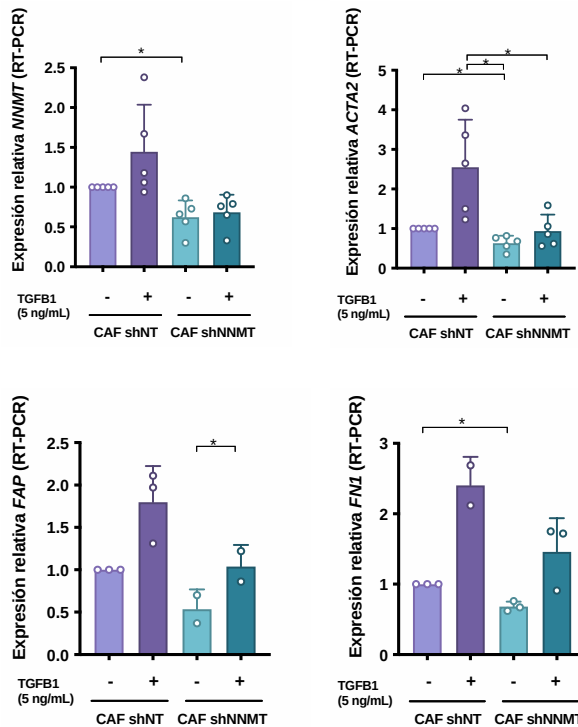


Figura 40: Expresión génica de los marcadores fibróticos en CAFs de CPNM con diferentes niveles de NNMT y en respuesta al TGFB1. Las células fueron tratadas con

y sin TGFB1 (5 ng/ml). Tras 72 horas se midió la expresión de los genes *ACTA2*, *FN1* y *FAP*. Las expresiones de dichos genes fueron normalizados a la expresión del gen constitutivo *ACTB*. Los resultados se muestran como porcentaje de expresión relativa al control shNT. N=5 shNT y N=5 shNNMT. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$

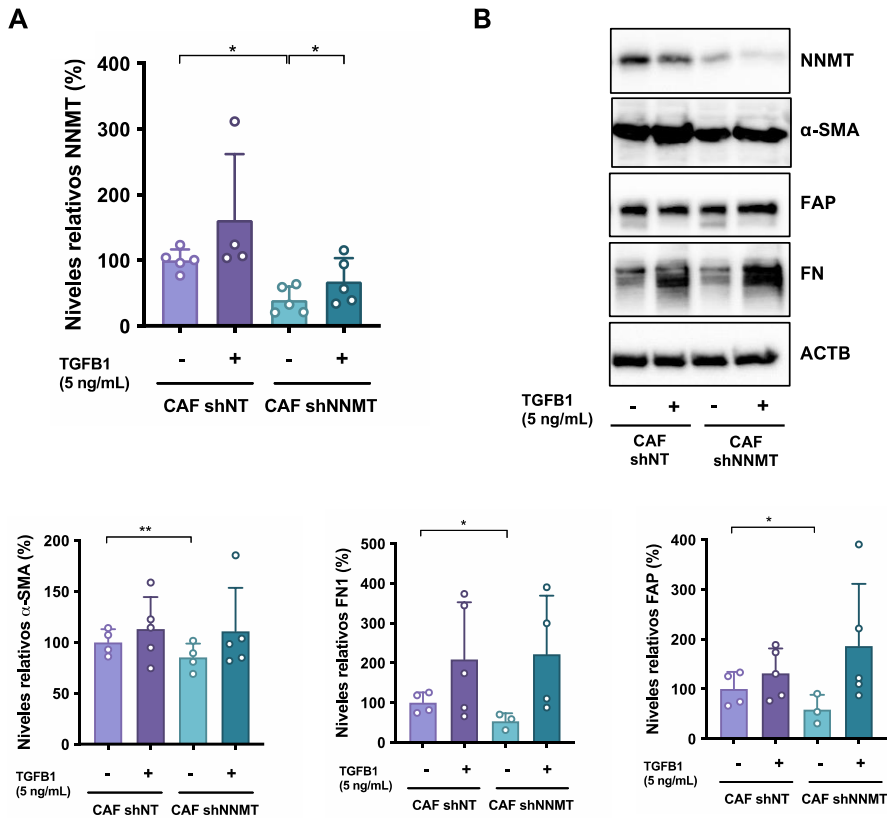


Figura 41: Niveles proteicos de los marcadores fibróticos en CAFs de CPNM con diferentes niveles de NNMT y en respuesta al TGFB1. Las células fueron tratadas con y sin TGFB1 (5 ng/ml) durante 72h. Se utilizaron anticuerpos específicos frente a las proteínas α -SMA, FN1 y FAP. La expresión de estas proteínas se normalizó a la expresión de la proteína constitutiva ACTB. (A) Densitometrías de los resultados obtenidos en los CAFs shNT y shNNMT. (B) Imagen representativa de los niveles expresión de dichas proteínas. Los resultados se muestran como porcentaje de expresión relativa al control shNT. N=5 shNT y N=5 shNNMT. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$

La represión de NNMT revierte la EMT de las células tumorales en modelos experimentales de cáncer gástrico, carcinoma escamoso cutáneo y endometrio, entre otros (Hah *et al.*, 2019; L. Liang *et al.*, 2018; Tahara *et al.*, 2021; W. Wang *et al.*, 2022). Dadas las similitudes entre la EMT y la FMT, y los resultados descritos en la sección 2, nos propusimos estudiar el impacto de la represión de NNMT sobre la expresión génica de marcadores característicos del fenotipo mesenquimal, así como de factores de transcripción reguladores del mismo en los CAFs de CPNM. Como podemos observar en la Figura 42, la represión de NNMT disminuyó la expresión de los marcadores mesenquimales *CDH2* y *VIM*, y también la de los factores de transcripción *SNAI1*, *TWIST1* y *ZEB1*. Tal y como indicábamos anteriormente, el factor de transcripción *SNAI1* modula la expresión de marcadores de miofibroblastos y la actividad en la MEC, así como la comunicación paracrina con las células tumorales (Alba-Castellón *et al.*, 2016; Stanisavljevic *et al.*, 2015). Por otro lado, *TWIST1* promueve la activación de los CAFs en el cáncer colorrectal, estimulando la migración, la formación de colonias por parte de las células tumorales, además de ser un potencial marcador de mal pronóstico en el carcinoma escamoso de esófago (García-Palmero *et al.*, 2016). *ZEB1* aumenta en el estroma de varios tipos de cáncer (Bronsert *et al.*, 2014; Chaffer *et al.*, 2013; Soini *et al.*, 2011), y en pacientes de cáncer de mama se ha correlacionado con un mayor número de recaídas, donde su inactivación disminuye la capacidad remodeladora de la MEC, la angiogénesis y provoca una mayor infiltración inmunitaria (Fu *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta todas estas evidencias, y el hecho de que los niveles elevados de NNMT activan los factores de transcripción EMT en el estroma de cáncer ovárico (Eckert *et al.*, 2019), podemos concluir que la actividad NNMT del estroma asociado al CPNM podría tener una función crucial en este tipo de cáncer.

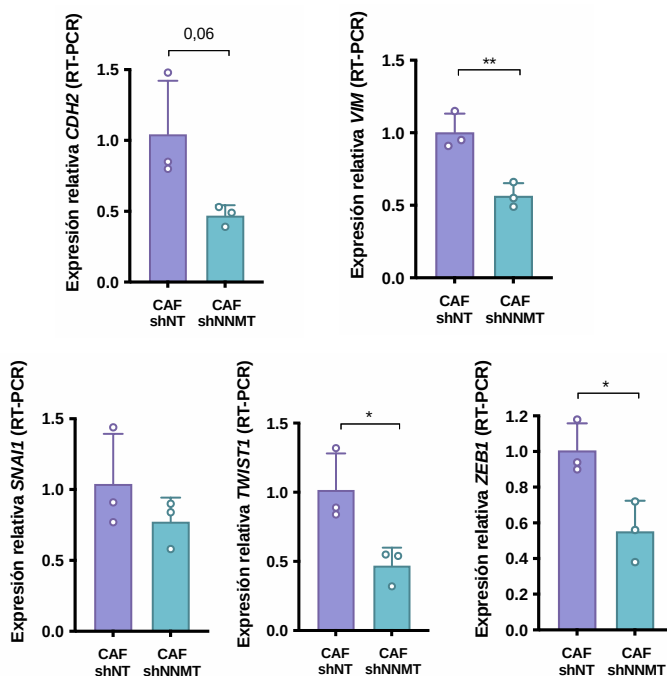


Figura 42: Expresión de los marcadores EMT en los CAFs de CPNM tras la modulación de la expresión génica de la NNMT silenciada medido por RT-PCR. Expresión de los genes *CDH2*, *VIM*, *SNAI1*, *TWIST1* y *ZEB1*. Las expresiones de dichos genes fueron normalizados a la expresión del gen constitutivo *ACTB*. Los resultados se muestran como porcentaje de expresión relativa al control shNT. Las imágenes son representativas de 3 experimentos distintos. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$.

A continuación, estudiamos el efecto de la represión de NNMT sobre los niveles y localización de esta proteína y el marcador α -SMA en los CAFs, mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Como era de esperar, en las imágenes de la Figura 43A (cuantificadas en 43B, C y D) observamos de nuevo cómo los CAFs shNNMT presentaban una disminución significativa de la proteína NNMT respecto a sus controles shNT y, lo que es más importante, presentaban un menor porcentaje de miofibroblastos α -SMA positivos. En respuesta al tratamiento con TGFB1, los CAFs shNT aumentaron los niveles de NNMT y α -SMA; no obstante, la represión de NNMT bloqueó este

efecto de manera significativa. Con todo, estos resultados demuestran que la NNMT no solo coexpresa con el marcador de miofibroblastos α -SMA, sino que además es capaz de modular la FMT de los CAFs en el CPNM (Figura 43D).

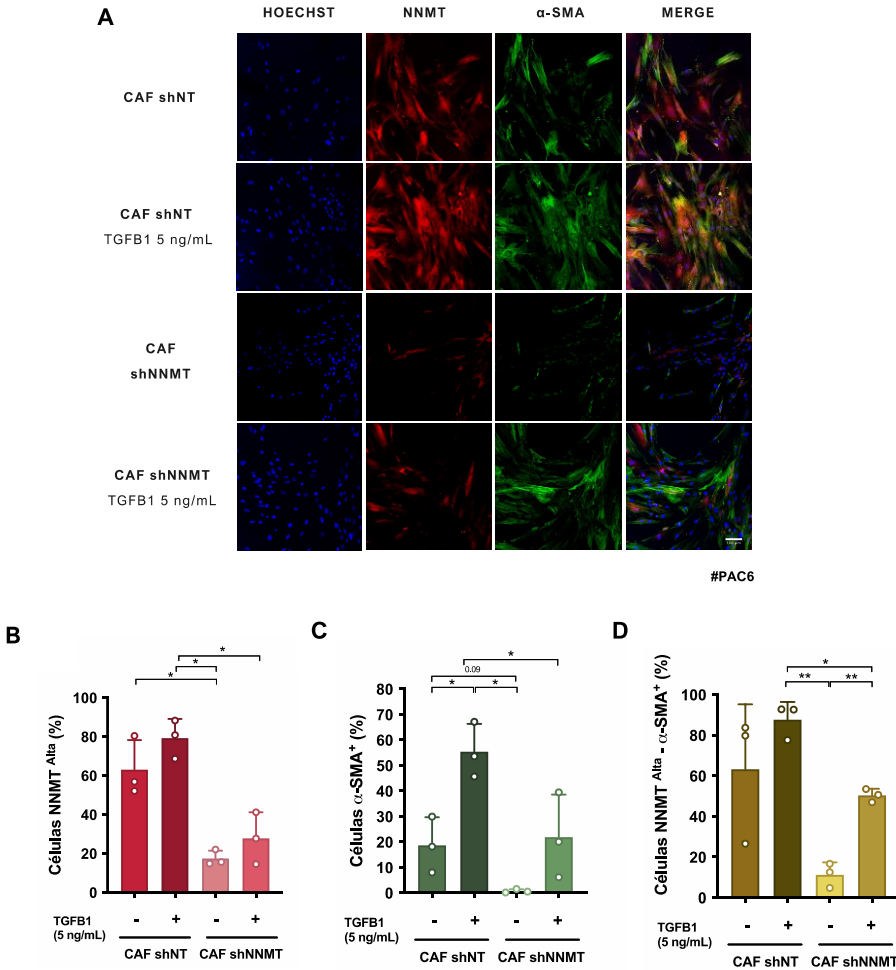


Figura 43: Localización y niveles de expresión de α -SMA y NNMT en cultivos de fibroblastos shNT y shNNMT en respuesta al TGFB1. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia visualizadas por microscopía. Los núcleos se tiñeron con Hoechst-33342 (en azul), NNMT en rojo y α -SMA en verde. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Leica Microsystems (20x). (B) Expresión del porcentaje de intensidad de NNMT en los cultivos shNT y shNNMT incubados o no con TGFB1 respecto al control no tratado. (C) Expresión del porcentaje de células positivas a α -SMA en los fibroblastos

shNT y shNNMT respecto al control shNT. (C) Porcentaje de coexpresión entre α -SMA y NNMT en cultivos shNT y shNNMT. N=3 shNT y N=3 shNNMT. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$.

4.2. NNMT modula la funcionalidad de los CAFs de CPNM

A continuación, estudiamos el impacto funcional de la represión de NNMT en los CAFs del estroma asociado al CPNM sobre las capacidades de proliferación y migración celulares y la contracción del colágeno. Tal y como muestran los resultados de la Figura 44, los CAFs shNNMT presentaron una mayor tasa de proliferación, resultados que coinciden con la mayor capacidad proliferativa de los FNs que, recordemos, presentaban una menor expresión de NNMT y un menor porcentaje de miofibroblastos (Figura 28).

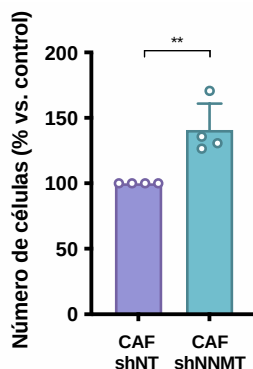


Figura 44: Crecimiento celular en las poblaciones de shNT y shNNMT. Las ratios se calcularon considerando el crecimiento de los shNNMT respecto a sus shNT. N=4 shNT y N=4 shNNMT. ** $p \leq 0,01$

En cuanto a la capacidad migratoria, las imágenes de la Figura 45A (cuantificadas en la Figura 45B) demuestran cómo los CAFs con NNMT reprimida fueron capaces de cerrar una mayor área de herida que sus correspondientes controles shNT (62% *versus* 50%, respectivamente). Por tanto, la represión de NNMT en los CAFs de CPNM aumentó la capacidad de

cierre de heridas *in vitro*, evidencia que replica la mayor capacidad migratoria de los FNs (Figura 29).

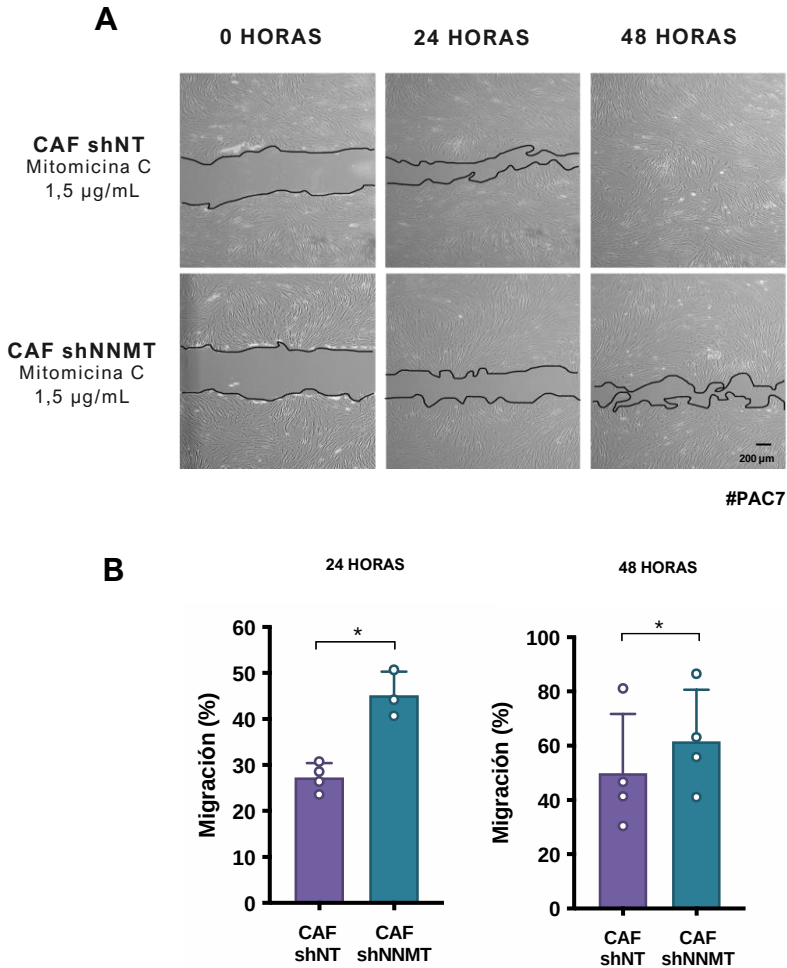


Figura 45: Ensayo de cierre de herida por fibroblastos shNT y shNNMT en presencia de mitomicina C a 0, 24 y 48 horas. (A) Imágenes representativas de campo claro del cierre de una herida *in vitro* a 0, 24, 48 horas (x5). (B) Gráfica que representa el porcentaje de disminución del área a las 24 y 48 horas medida mediante programa *ImageJ*. N=4 shNT y N=4 shNNMT. * $p \leq 0,05$ en comparación con el grupo control.

Con el fin de extender estas observaciones funcionales, se llevaron a cabo los experimentos de contracción del gel de colágeno. En la Figura 46 se puede observar cómo la represión de la NNMT disminuyó la capacidad contráctil en comparación con la población control shNT. Una vez más, la inhibición de la NNMT reprogramó el fenotipo de los CAFs, haciéndolos funcionalmente similares a los FNs (Figura 30).

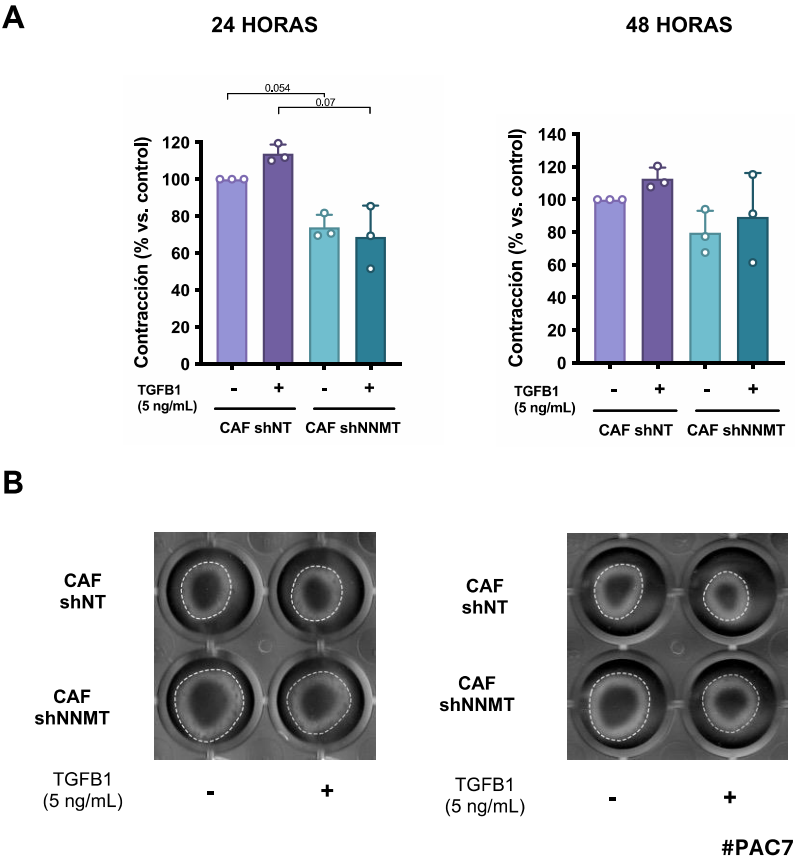


Figura 46: Contracción de colágeno de CAFs shNT y shNNMT. (A) Cálculo de la variación del área de colágeno a las 24 y 48h con y sin TGFβ1 (5 ng/ml). (B) Imagen representativa de la variación del área de colágeno a las 24 y 48 horas. Se midió la diferencia de área de las imágenes capturadas mediante el programa *ImageJ* a las 24h y 48h. N=3 shNT y N=4 shNNMT.

Como última pieza del estudio funcional, observamos que la secreción de TGFB1 medida por ELISA se encontraba disminuida significativamente en una de las poblaciones CAF con la represión de la NNMT, identificando una tendencia a la baja en el resto (Figura 47). Los autores relacionan la disminución de la secreción del TGFB1 con una menor capacidad de deposición de los componentes de la MEC, lo que se correlaciona con la menor proporción de miofibroblastos en la población CAF shNNMT (Chakravarthy *et al.*, 2018).

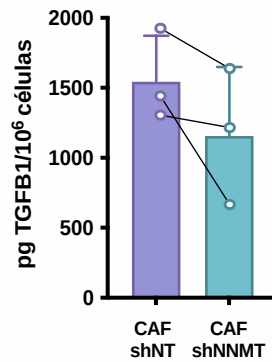


Figura 47: Secreción de TGFB1 en los CAFs shNT y CAFs shNNMT. Concentración de TGFB1 medida por ELISA en los sobrenadantes de los cultivos tras 48 horas. Los resultados se normalizaron respecto al número de células de cada condición. N=3 shNT y N=3 shNNMT.

Los CAFs juegan un papel crucial en la progresión del cáncer consecuencia, al menos en parte, de las adaptaciones funcionales relacionadas con sus capacidades proliferativas, migratorias y contráctiles (Glabman *et al.*, 2022). Nuestros resultados indican que la inhibición de NNMT en los CAFs procedentes de CPNM revierte parcialmente el fenotipo miofibroblasto disminuyendo marcadores fibróticos, mesenquimales, de migración y contracción celulares y, en definitiva, haciéndolos más parecidos a los FNs, en línea con los dos estudios de referencia para este trabajo de investigación. En el cáncer oral escamoso, Zhao H, *et al.* determinaron que la

inhibición de NNMT revierte el fenotipo miofibroblasto a través de la disminución de la expresión de α -SMA y de colágeno (H. Zhao *et al.*, 2023). En los CAFs cáncer de ovario, NNMT no solo regula la expresión de biomarcadores del fenotipo miofibroblasto, sino también su capacidad contráctil (Eckert *et al.*, 2019).

En último término, todas estas adaptaciones fenotípicas se deben a cambios en los patrones de expresión génica regulados a nivel epigenético por la maquinaria de la remodelación de la cromatina. La relación entre metabolismo y reprogramación epigenética es recíproca, ya que los metabolitos actúan como cofactores para las enzimas remodeladoras de la cromatina (X. Xu *et al.*, 2023; X. Yu *et al.*, 2018). En este contexto, NNMT influye en la disponibilidad de cofactores epigenéticos esenciales como el NAD⁺ o la SAM, modulando la metilación del ADN y las modificaciones de histonas, y, por ende, impactando en la reprogramación epigenética y la expresión génica (Y. Gao *et al.*, 2021; Kaelin & McKnight, 2013; Xiao Yu Li *et al.*, 2022; C. Lu & Thompson, 2012). Así pues, la expresión aberrante de NNMT desencadenaría profundos cambios en los patrones de expresión génica que podrían dirigir la adquisición del fenotipo miofibroblasto en los CAFs de CPNM, si bien los mecanismos concretos todavía no se conocen en su totalidad (Hong *et al.*, 2015). En este sentido, la regulación del fenotipo CAF a través de la NNMT podría estar mediada por la hipometilación del ADN, ARN o histonas, tal y como sugieren Eckert y colaboradores en el cáncer de ovario. En su trabajo, la sobreexpresión de NNMT en el estroma tumoral ovárico provoca un agotamiento de SAM, el donante universal de metilo para las histonas, lo que reduce el potencial de metilación en las regiones promotoras de los genes, incrementando aquellos implicados en la secreción de colágeno y la contractibilidad regulada por la miosina (Eckert *et al.*, 2019). Más

recientemente, Kay *et al.* demostraron cómo la regulación epigenética y metabólica interviene en la capacidad de secreción de colágeno de la MEC regulando la síntesis del aminoácido prolina a través de la pirrolina-5-carboxilato reductasa 1 (PYCR1) en modelos de carcinoma mamario (Kay *et al.*, 2022). En esta línea, se ha observado que la inhibición de la metilación del ADN aumenta la expresión de marcadores característicos de los CAFs, así como sus características funcionales, por lo que refuerza el papel directo de la hipometilación del ADN en la regulación de los CAFs. Sin embargo, se requiere de más evidencias experimentales para comprender los mecanismos subyacentes y las implicaciones de estos hallazgos en las funciones protumorales de los CAFs.

5. PAPEL DE LA NNMT ESTROMAL EN LA RESISTENCIA ADQUIRIDA A LOS ITQs DE EGFR

Una vez demostrada la mayor expresión de NNMT en los CAFs de CPNM, y que su silenciamiento revierte, en mayor o menor medida, el fenotipo miofibroblasto, nos planteamos determinar si la modulación de su actividad tendría efectos sobre la sensibilidad a las terapias dirigidas contra las células tumorales. Dada la experiencia de nuestro laboratorio en el estudio de la resistencia adquirida a los ITQs de EGFR en el contexto del CPNM dirigido por mutaciones activadoras de EGFR (Becker *et al.*, 2019; Pulido *et al.*, 2020; Soucheray *et al.*, 2015), utilizamos una línea celular comercial conocida por su adicción oncogénica a la forma mutada de *EGFR* y elevada sensibilidad innata a estos inhibidores. Así, las células HCC4006-*EGFR*^{ex19del} se cocultivaron con CAFs shNT y CAFs shNNMT en modelos bidimensionales y tridimensionales, con el fin de mimetizar con mayor fidelidad el MAT. Además, las células HCC4006 fueron modificadas genéticamente con el fin de que expresaran la proteína fluorescente mCherry y así poder identificarlas con mayor facilidad.

5.1. Caracterización del cocultivo bidimensional

5.1.1. Sensibilidad tumoral a los ITQs de EGFR

Las células HCC4006 en monocultivo y los cocultivos de HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT, se incubaron con concentraciones crecientes (de 0 a 10 μ M) de un ITQ de tercera generación, el osimertinib, que actualmente se utiliza como primera línea de tratamiento para los pacientes de CPNM avanzado con mutaciones activadoras en *EGFR* (Cho *et al.*, 2020). Tras 72 horas de exposición al tratamiento, se analizó la

viabilidad celular mediante el ensayo de sulforodamina B. Como se muestra en la Figura 48A, el monocultivo de HCC4006 presentó una elevada sensibilidad al osimertinib con una IC_{50} en el rango nanomolar, tal y como está descrito para esta línea celular (Soucheray *et al.*, 2015). Sin embargo, al cocultivarla con los CAFs, se observó un aumento notable en la resistencia al ITQ, independientemente de los niveles de expresión de NNMT, si bien el cocultivo con CAFs shNNMT mostraba una cierta tendencia a la resensibilización comparado con el CAFs shNT. Cabe señalar que todos los monocultivos de CAFs mostraron una elevada resistencia al osimertinib y su viabilidad solo se vio comprometida a concentraciones muy elevadas del ITQ. Por tanto, los cambios en las curvas de proliferación de los cocultivos se deben a un efecto selectivo del osimertinib sobre las células tumorales *EGFR* mutantes y no sobre los CAFs. Aunque los fibroblastos expresan *EGFR WT*, no son adictos a la actividad de este receptor y, por tanto, no son sensibles a su inhibición (Garvey *et al.*, 2020).

A continuación, llevamos a cabo un estudio más detallado del tipo de muerte celular (apoptosis *versus* necrosis) mediante el ensayo de Anexina V-DAPI y citometría de flujo en los cocultivos bidimensionales de HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT tratados con osimertinib a 250 y 500 nM durante 72 horas (Figura 48B). Es importante resaltar que el porcentaje de apoptosis y necrosis mostrados corresponden específicamente a las células tumorales mCherry positivas. A ambas concentraciones se observó una mayor tasa de apoptosis temprana y tardía en el monocultivo de HCC4006 respecto a los cocultivos. El cocultivo de HCC4006/CAFshNNMT presentó una mayor proporción de células apoptóticas respecto al cocultivo con CAFs shNT, (19,5% y 13,8%, respectivamente) (Figura 48B, C). Estos resultados no alcanzan las diferencias estadísticamente significativas, por

tanto, se precisaría de un estudio más detallado. No obstante, podemos confirmar el efecto selectivo del osimertinib sobre las células tumorales.

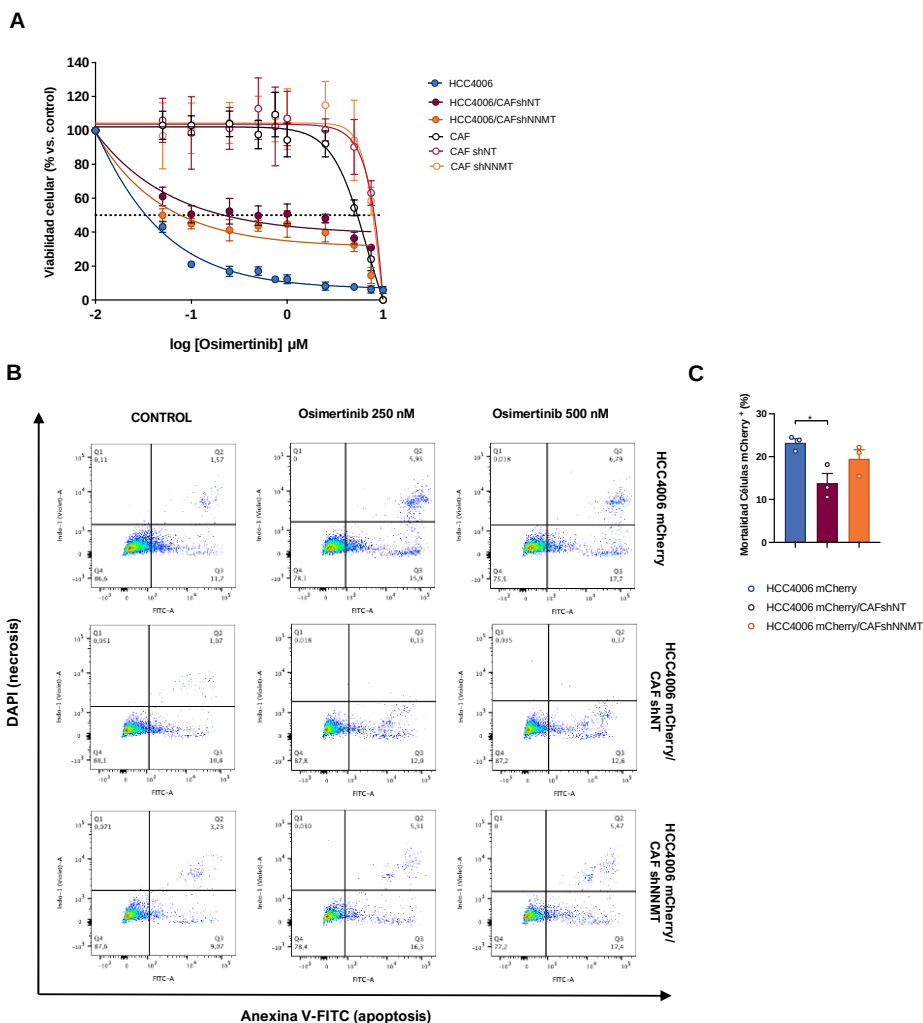


Figura 48: Análisis de la muerte celular inducida por el osimertinib en cocultivos bidimensionales de HCC4006, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT. (A) Ensayo de citotoxicidad a diferentes concentraciones de osimertinib (0-10 μM) durante 72 horas en células sembradas en placas de 96 pocillos. La viabilidad celular fue determinada indirectamente por el método de la sulforodamina B. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control. (B) Ensayo de apoptosis/necrosis

mediante citometría de flujo de las células HCC4006 mCherry positivas incubadas con osimertinib a 250 y 500 nM durante 72 horas. (C) Mortalidad de células HCC4006 mCherry positivas (apoptosis más necrosis) a 500 nM. Las imágenes son representativas de 3 experimentos distintos. * $p \leq 0,05$.

Es un hecho establecido en la literatura que los CAFs contribuyen a la adquisición de resistencia a los tratamientos antitumorales de diversas maneras. Por ejemplo, la comunicación paracrina entre los CAFs y las células tumorales puede promover el crecimiento y supervivencia tumorales (Mink *et al.*, 2010). Algunos autores han evaluado la resistencia inducida por los CAFs a los ITQs de EGFR de 1ª generación, como el erlotinib, en el CPNM, postulando que las proteínas secretadas por los CAFs actúan como mecanismo subyacente a través de la regulación del programa EMT en las células tumorales (Choe *et al.*, 2015). Otros afirman que los CAFs son capaces de secretar VEGFA, promoviendo la angiogénesis y facilitando la oxigenación y el flujo de nutrientes al tumor, lo que proporciona un microambiente favorable para la supervivencia frente a tratamientos (Santi *et al.*, 2018). Por otra parte, gracias a la capacidad remodeladora de la MEC, los CAFs pueden conferir una barrera física que dificulta la penetración de los fármacos en el tejido tumoral (Glentis *et al.*, 2017). En este sentido, algunos autores proponen una mayor expresión de metaloproteinasas como la MMP1, como principal causa de la resistencia a cetuximab en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Johansson *et al.*, 2012). En esa misma línea, Choe *et al.* hipotetizan que la resistencia adquirida al erlotinib podría deberse a una reorganización del citoesqueleto de actina de las células de CPNM (Choe *et al.*, 2015). Estos hallazgos sugieren que los CAFs, a través de diferentes mecanismos, podrían considerarse una diana terapéutica para evitar las resistencias a las terapias antitumorales en el CPNM.

5.1.2. Expresión de marcadores EMT en el cocultivo bidimensional

Como se ha descrito en la Introducción, la adquisición de resistencia a los ITQs de EGFR puede deberse a varias causas, como son la aparición de la segunda mutación en *EGFR*^{T790M}, la amplificación de otros oncogenes como *MET*, el cambio de histología a CPM o la activación del programa EMT (Koulouris *et al.*, 2022; Mok *et al.*, 2017; Pasquini & Giaccone, 2018). De hecho, el modelo celular HCC4006 adquiere la resistencia a los ITQs de EGFR de primera generación a través de la activación aberrante de la EMT (Soucheray *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2019). Por tanto, nos preguntamos si la interacción de las células tumorales con los CAFs shNNT y shNNMT podía variar la expresión de marcadores EMT.

En primer lugar, se determinaron los niveles de expresión génica de *NNMT*. Como era de esperar, en el cocultivo de HCC4006 con CAFs shNNMT encontramos un descenso significativo de NNMT con respecto al cocultivo con CAFs shNT (Figura 49). El monocultivo de células HCC4006 presentaba unos niveles bajos o indetectables, en línea con lo descrito en la literatura (J. Wang *et al.*, 2022). En cuanto a la expresión de marcadores EMT, observamos que en el cocultivo de HCC4006 con CAFs shNNMT descendieron los niveles de expresión de *CDH2*, *SNAI1* y *ZEB1* respecto al cocultivo con CAFs shNT. No obstante, no se encontraron diferencias entre los niveles de expresión de *CDH1*, *VIM* ni el factor de transcripción *TWIST1*.

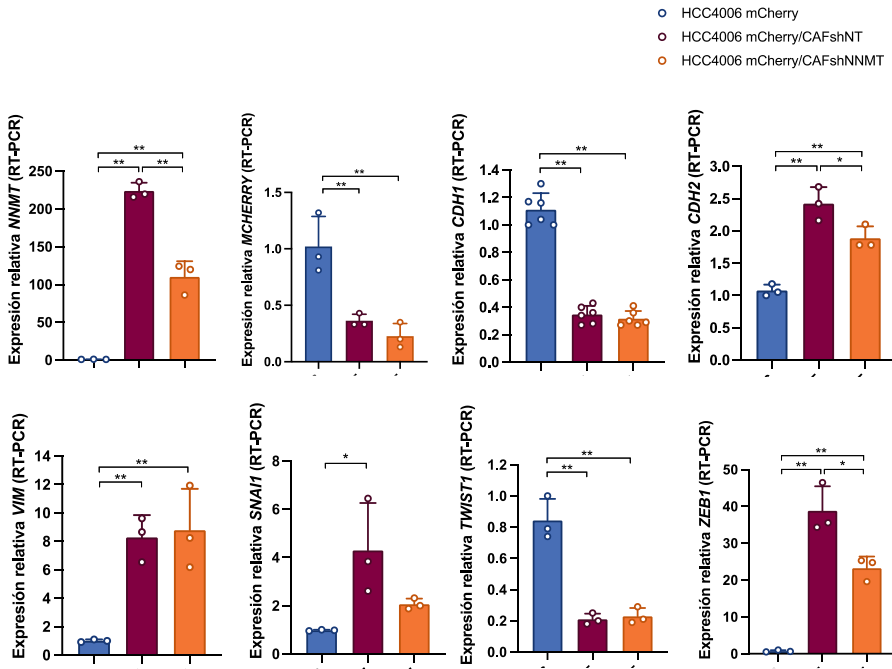


Figura 49: Expresión de *NNMT* y marcadores EMT en los cultivos bidimensionales de HCC4006, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT. Tas 4 días de cultivo, se extrajo el RNA, se cuantificó y se llevó a cabo la RT-PCR para medir la expresión de los genes *NNMT*, *mCherry*, *CDH1*, *CDH2*, *VIM*, *SNAI1*, *TWIST1*, *ZEB1*. Las expresiones de dichos genes fueron normalizados a la expresión del gen constitutivo *ACTB*. Los resultados se muestran como porcentaje de expresión relativa al control HCC4006. Las imágenes son representativas de 3 experimentos distintos. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$.

Numerosos estudios describen la activación aberrante de la EMT en carcinomas como un proceso complejo, dinámico y reversible, caracterizado por múltiples meta-estados fenotípicos intermedios. De este modo, en nuestro modelo experimental, la reversión parcial en lugar de completa de todos los marcadores tanto epiteliales como mesenquimales resulta plausible (Chaturvedi *et al.*, 2019; Dongre & Weinberg, 2018; Gonzalez & Medici, 2014). No obstante, hemos de tener en cuentas las limitaciones de este estudio, donde hemos determinado la expresión de los marcadores EMT en una mezcla de ARNs de células tumorales y de CAFs, por lo que no podemos atribuir un

cambio concreto a un solo tipo celular, a excepción de la CDH1 que tiene una expresión exclusivamente epitelial. Además, debemos recordar que los CAFs expresan de manera constitutiva marcadores mesenquimales como la VIM, la CDH2 o el factor de transcripción raSNAI1 (Dwivedi *et al.*, 2023; Jiffar *et al.*, 2017; Jia You *et al.*, 2017). Para obtener resultados concluyentes sería necesario el uso de técnicas adecuadas que permitan la separación celular como la citometría de flujo acoplada a *cell sorting* (Dwivedi *et al.*, 2023; Jiffar *et al.*, 2017; Jia You *et al.*, 2017).

5.1.3. Secreción de TGFB1 en los cultivos bidimensionales

Tal y como hemos señalado en varias ocasiones, el TGFB1 es el inductor de la EMT mejor conocido en múltiples tipos de carcinomas, además de un potente promotor de la resistencia a terapias dirigidas contra EGFR (Soucheray *et al.*, 2015; C. Wang *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta que nuestros CAFs hipersecretan TGFB1 con respecto a los FNs y que la represión de NNMT disminuye sus niveles (Figura 32), nos propusimos determinar la concentración de esa citoquina en los cocultivos bidimensionales con células tumorales.

En la Figura 50 se observa una mayor secreción de TGFB1 en los sobrenadantes del cocultivo junto con los CAFs, independientemente de los niveles de NNMT, con respecto al monocultivo de células HCC4006. Cabe señalar que la represión de NNMT en el cocultivo de HCC4006/CAFshNNMT podría revertir este aumento, aunque las diferencias con respecto al cocultivo de HCC4006/CAFshNT no fueron estadísticamente significativas.

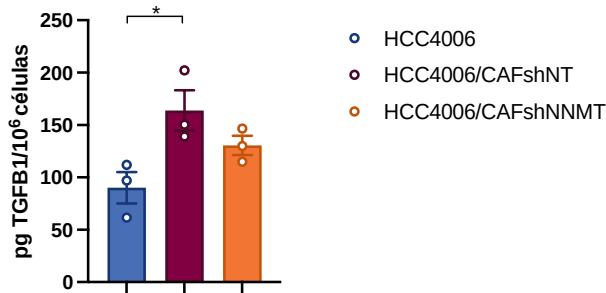


Figura 50: Secreción de TGFβ1 en el monocultivo de HCC4006 y cocultivo de HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT. Concentración de TGFβ1 medido por ELISA en los sobrenadantes de los cultivos y cocultivos tras 48 horas. Imagen representativa de 3 experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ respecto al control HCC4006.

En su conjunto, los resultados de los cocultivos bidimensionales no nos permiten concluir si la interacción entre los CAFs y las células tumorales modula el fenotipo EMT y la resistencia a los ITQs de EGFR de una manera NNMT-dependiente. Por tanto, consideramos que este diseño experimental no es el más apropiado y, en consecuencia, nos propusimos desarrollar un cocultivo tridimensional que reflejara de forma más precisa la estructura y función del MAT, como veremos en la siguiente sección.

5.2. Caracterización del cocultivo tridimensional

En los últimos años cada vez son más los trabajos de investigación *in vitro* que utilizan cocultivos celulares tridimensionales (también conocidos como organoides) con el fin de reproducir la arquitectura, organización celular, interacción célula-célula y célula-MEC de los tejidos y órganos en condiciones fisiológicas y patológicas (Abbas *et al.*, 2023; Kapalczyńska *et al.*, 2018) y así, avanzar en nuestra comprensión del MAT y el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas (Jacobi *et al.*, 2017; Samimi *et al.*, 2021). El principal inconveniente de los cultivos bidimensionales es la disminución de la heterogeneidad celular original (con los pases, el cultivo se hace más uniforme) y la ausencia de las interacciones con la MEC, una limitación si cabe más importante dado el papel de los CAFs como productores de esta matriz (Conti *et al.*, 2021; Millet *et al.*, 2022).

Motivados por los resultados no concluyentes del cultivo bidimensional y con la finalidad principal de reproducir de manera más fiel al MAT, pusimos a punto un modelo de formación de esferas, que en adelante denominaremos homosferas en el caso de cultivo 3D puro de HCC4006 o CAFs, o heterosferas en el de cocultivos de estos dos tipos celulares. Para ello, utilizamos la técnica del *hanging drop* durante 4 días para preparar los cocultivos de las células HCC4006 mCherry con los CAFs shNT o shNNMT, utilizando una proporción célula tumoral:CAF de 1:10 tal y como se describe en el apartado 12.2.1 de Material y Métodos.

5.2.1. Estudio morfológico de las esferas

En primer lugar, estudiamos la morfología y tamaño de las esferas tras 3, 7, 10 y 14 días después de su formación. En la Figura 51A, B podemos

observar cómo el área de las homoesferas HCC4006 disminuyó significativamente entre los días 7 y 14, al contrario de lo que ocurrió cuando las células tumorales fueron cocultivadas con CAFs. Además, encontramos que las heteroesferas con CAFs shNT eran mayores que las cocultivadas con CAFs shNNMT, con un incremento del 31% y 14% a los 14 días, respectivamente. Por otro lado, observamos una pérdida de la estructura tridimensional en las heteroesferas HCC4006/CAFshNNMT. Para determinar el grado de viabilidad celular llevamos a cabo un análisis de inmunofluorescencia con Anexina V-FITC tras 10 días después de la formación de las esferas (Figura 51C). Las homoesferas tumorales presentaron una mayor tasa de apoptosis basal, la cual disminuyó al cocultivar con CAFs shNT. Este efecto revirtió parcialmente con los CAFshNNMT, lo que sugiere que la NNMT estromal podría jugar un papel importante en el mantenimiento de la estructura tridimensional y de la viabilidad celular tumoral.

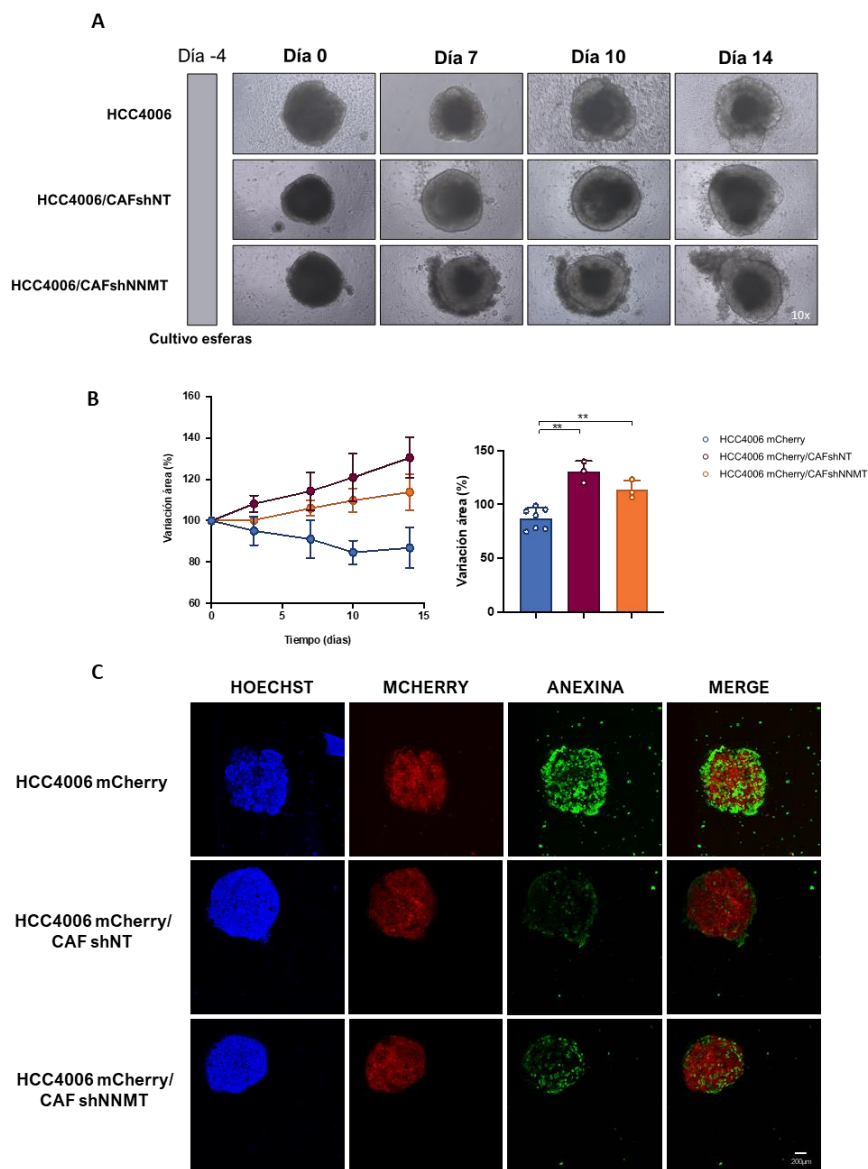


Figura 51: Caracterización de los cultivos tridimensionales de HCC4006, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT. (A) Imagen representativa de campo claro de las esferas a 7, 10 y 14 días tras su formación. (B) Cálculo de la variación del área de las esferas a 3, 7, 10 y 14 días (izquierda) y porcentaje de variación del área a 14 días (derecha). (C) Inmunofluorescencia representativa de la viabilidad celular del cultivo tridimensional tras 10 días de cultivo mediante análisis de apoptosis Anexina V-FITC. Los núcleos se tiñeron con Hoechst-33342 (en azul), las células HCC4006 mCherry (en rojo),

y la apoptosis (en verde). Las imágenes fueron tomadas a 10x mediante microscopía confocal. Imagen representativa de 3 experimentos independientes donde cada experimento contiene 10 esferas. ** $p \leq 0,01$

Estos resultados coinciden con numerosos estudios que han demostrado una mayor viabilidad y proliferación tumorales en cocultivos con CAFs en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Melissaridou *et al.*, 2019). Algunos autores postulan que este efecto podría deberse a factores solubles liberados por los CAFs al medio extracelular capaces de estimular la proliferación tumoral (Johansson *et al.*, 2012), mientras que otros han demostrado que el contacto directo entre las células del cáncer de próstata, páncreas, mama o pulmón actúa como promotor de la proliferación (Majety *et al.*, 2015; Neuwirt *et al.*, 2020). Estos mecanismos no son excluyentes, dado que los CAFs proporcionan un soporte más favorable para el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales secretando factores de crecimiento o citoquinas capaces de activar vías de señalización que inhiben la apoptosis, a la vez que producen los componentes de la MEC que proporcionan un entorno físico que apoya la integridad estructural y viabilidad de las esferas, facilitando la adhesión celular y la transmisión de las señales (Melissaridou *et al.*, 2019).

Así pues, la NNMT de los CAFs de CPNM podría contribuir tanto a la viabilidad celular como al mantenimiento de la estructura tridimensional, imprescindible en la promoción y desarrollo tumorales. Estos resultados están en línea con el estudio de Hui Zhao y colaboradores en el cáncer oral escamoso, donde la inhibición de la NNMT impactaba de manera negativa en la formación de esferas, provocando una reducción del diámetro de estas (H. Zhao *et al.*, 2023). Además, en el modelo *in vivo*, el bloqueo de la NNMT de los CAFs redujo la expresión de CD44 y Ki67, marcadores de células madre tumorales y de proliferación, respectivamente. Los autores hipotetizaron que la

inhibición de NNMT reduce la capacidad de formación de esferas debido a la interrupción de la cascada de señalización LOX-FAK (Cox *et al.*, 2013; Q. Xiao & Ge, 2012; H. Zhao *et al.*, 2023). En sus CAFs, la sobreactivación de NNMT disminuye los niveles de la marca epigenética represiva H3K27me3 (histona H3 trimetilada en la lisina 27) en el promotor del gen que codifica LOX, una enzima que regula la reticulación del colágeno I en la MEC. Esto aumenta la actividad tirosina quinasa de FAK de las células tumorales, un transductor de señales involucrado en la interacción con la MEC, promoviendo, en última instancia, el desarrollo de las esferas (Dawson *et al.*, 2021; Ohta *et al.*, 2022). En definitiva, estas evidencias indican que la expresión estromal de NNMT promueve la supervivencia y proliferación de células tumorales en otro tipo de cáncer, y señalan que el mecanismo NNMT-LOX-FAK podría también jugar un papel importante en nuestros CAFs de CPNM.

A continuación, realizamos un análisis más detallado de la estructura tridimensional y disposición de las células que formaban parte de las heteroesferas a los 4 días de siembra, para evitar en la medida de lo posible la apoptosis asociada al cultivo durante tiempos prologados. Para ello, los núcleos de las células se tiñeron con Hoechst-33342 y se tomaron imágenes mediante el microscopio confocal. En la Figura 52A podemos observar que a estos tiempos cortos no existen diferencias significativas en cuanto al área o tamaño de las estructuras. Sin embargo, el número de células totales que ocupaban la superficie de las homoesferas es mayor que en las heteroesferas, no observándose diferencias entre CAFs shNT y CAFs shNNMT. Al analizar la distancia entre las células, detectamos un aumento significativo en las heteroesferas de HCC4006/CAFshNT respecto a las homoesferas de HCC4006, diferencia que revirtió al cocultivar con los CAFshNNMT (Figura 52B).

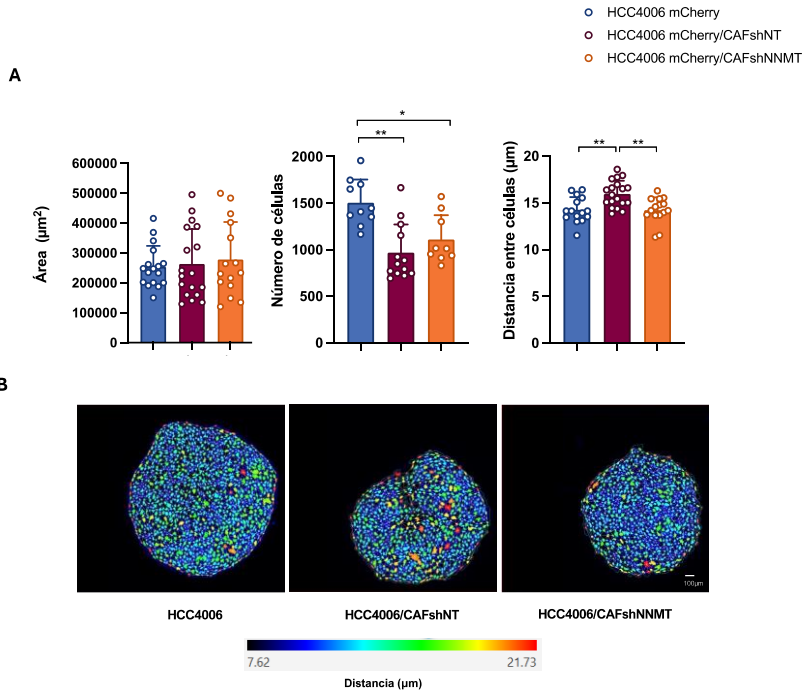


Figura 52: Análisis del tamaño, número de células y distancia intercelular en el cultivo tridimensional de HCC4006, HCC4006/CAFshNT, HCC4006/CAFshNNMT. (A) Cálculo del área, número de células totales de la superficie de la esfera y distancia entre las células. (B) Imagen representativa del estudio de la distancia entre los núcleos medida mediante *Qupath*. Los núcleos más separados aparecen en rojo, mientras que las menores distancias celulares se representan en azul. Las imágenes fueron tomadas por microscopía a 20x. Para cada parámetro se evaluaron entre 10 y 18 esferas. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$.

Podríamos hipotetizar que la mayor distancia entre las células de las heteroesferas de HCC4006/CAFshNT podría ser consecuencia de una activación de la EMT; en dicho proceso, las células tumorales adquieren capacidades migratorias, invasivas, con pérdida de las uniones intercelulares y uniones adherentes (Craene & Berx, 2013). De hecho, en modelos de CPNM se ha determinado un enriquecimiento de células con fenotipo mesenquimal en la región periférica de las esferas que aumentó la dispersión e invasión celulares (Q. Zhang *et al.*, 2022). Este fenómeno, que permitiría a las células

tumorales disociarse de la masa primaria y moverse hacia el microambiente circundante, podría explicar la mayor separación observada entre las células tumorales al cocultivarlas con CAFs shNT. Consecuentemente, el siguiente paso fue analizar los niveles y localización de marcadores característicos de la EMT en nuestras estructuras tridimensionales.

5.2.2. Expresión de marcadores EMT en el cocultivo tridimensional

Dada la importancia de la proteína de adhesión intercelular epitelial CDH1 en el mantenimiento de la arquitectura de los epitelios, podríamos pensar que una reducción en su expresión debilitaría las interacciones célula-célula en los cocultivos de las células tumorales con los CAFs con elevada actividad NNMT (L. Liang *et al.*, 2018; D. Xiao & He, 2010). Para ello, se analizaron mediante inmunofluorescencia y microscopio confocal, los niveles y localización no solo de CDH1, sino también del marcador mesenquimal VIM (Figuras 53 y 54). La expresión de CDH1 se limita a las células epiteliales, siendo negativa en los fibroblastos de linaje mesenquimal (Bruner & Derksen, 2018). Además, tal y como se ha mencionado anteriormente, las células HCC4006 expresan de manera ectópica la proteína fluorescente mCherry, lo que nos permitió estudiar su disposición en el modelo tridimensional tal y como se muestra en las imágenes representativas de las Figuras 53 y 54. Las homoesferas de HCC4006 mCherry presentaban una elevada expresión de CDH1, con evidencia clara de las uniones intercelulares (Figura 53A). El cocultivo con CAFs condujo a una menor intensidad del marcaje de CDH1 en las células tumorales, especialmente en las heteroesferas de HCC4006/CAFshNT. A continuación, cuantificamos el porcentaje de células CDH1 positivas, así como la intensidad de su marcaje fluorescente (Figura 53B). En las homoesferas se observó un porcentaje de células CDH1 positivas

del 86%, similar al cocultivo con CAFs shNNMT (82%). Sin embargo, en el cocultivo con CAFs shNT este porcentaje disminuyó al 48%. Por tanto, estos hallazgos refuerzan la hipótesis de la activación de EMT mediante la represión del marcador epitelial CDH1 en las heteroesferas, fenómeno que se revierte de manera significativa al reprimir la NNMT estromal.

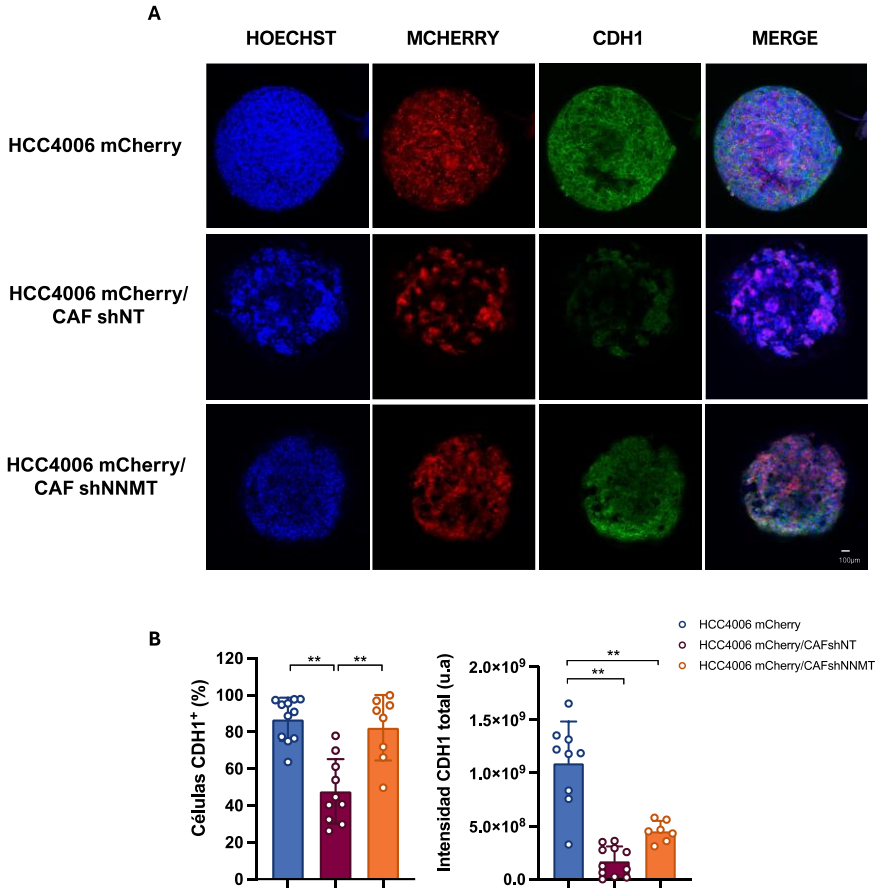


Figura 53: Localización y niveles de CDH1 en los cultivos tridimensionales de HCC4006, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT. (A) Imagen representativa de la expresión de CDH1 en las diferentes esferas. Los núcleos se tiñeron con Hoechst-33342 (en azul), las células HCC4006 mCherry (en rojo), CDH1 (en verde). Las imágenes fueron tomadas mediante microscopía confocal a 20x. (B) Porcentaje de células CDH1 positivas (izquierda) e intensidad de tinción CDH1 (derecha). N= 10. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$.

En cuanto a la expresión y localización del marcador mesenquimal VIM, en la Figura 54 podemos observar cómo sus niveles son muy bajos en las homoesferas tumorales, como era de esperar dado el marcado carácter epitelial de la línea celular HCC4006. En las heterosferas con CAFs shNT los niveles de VIM aumentan dramáticamente, si bien parece que las fibras compuestas por esta proteína de los filamentos intermedios se localizan preferentemente en los CAFs (negativos para el marcador mCherry), sin descartar la positividad en el compartimento tumoral. Resulta notable la disminución de los niveles de VIM en las heterosferas con CAFshNNMT, una evidencia en línea con la reexpresión del marcador epitelial CDH1 de la Figura 53 y que reafirma la hipótesis de que los CAFs de CPNM inducen parcialmente la EMT tumoral y, lo que es más importante, que esta activación depende de la NNMT estromal.

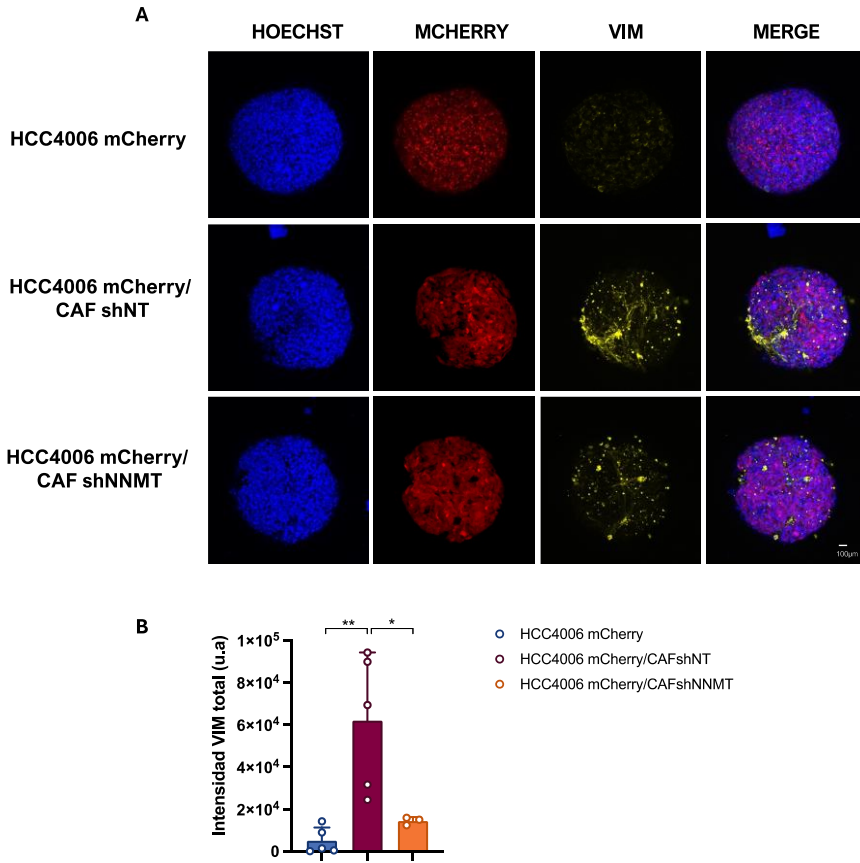


Figura 54: Localización y niveles de expresión de VIM en los cultivos tridimensionales de HCC4006, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT. (A) Imagen representativa de la expresión de VIM en las diferentes esferas. Los núcleos se tiñeron con Hoechst-33342 (color azul), las células HCC4006 mCherry (color rojo), VIM (color amarillo). Las imágenes fueron tomadas a 20x mediante microscopía confocal. (B) Intensidad de tinción de VIM. N= 5. * $p \leq 0,05$.

Con el fin de completar esta parte del estudio relacionada con la activación de la EMT, analizamos mediante RT-PCR la expresión de *CDH1* y de diferentes marcadores mesenquimales, así como factores de transcripción que intervienen en la regulación de dicho proceso (Figura 55).

En primer lugar, con el objetivo de evaluar el contenido de células tumorales en las diferentes heteroesferas, determinamos la expresión del marcador *mCherry*, exclusivo de las células tumorales epiteliales. En este sentido, no observamos diferencias entre las condiciones estudiadas, resultados que concuerdan con las inmunofluorescencias, donde la mayor parte de la corteza del cultivo tridimensional estaba ocupada por células tumorales (Figuras 53 y 54). Si bien podríamos pensar que el cocultivo no afecta a la capacidad proliferativa tumoral, hemos de tener en cuenta que el número de células tumorales sembradas en las homoesferas fue 10 veces mayor que en las heteroesferas. Por tanto, debemos concluir que la presencia de CAFs estimula de forma muy significativa el crecimiento de las células tumorales, hasta alcanzar niveles similares de expresión *mCherry* a los presentes en las homoesferas HCC4006. De este modo, los CAFs podrían estar favoreciendo la integridad de las estructuras tridimensionales (Figura 51C) (Majety *et al.*, 2015; Melissaridou *et al.*, 2019; Neuwirt *et al.*, 2020). Sin embargo, también deberíamos concluir que la represión de NNMT estromal no fue suficiente para modificar la capacidad proliferativa de las células tumorales.

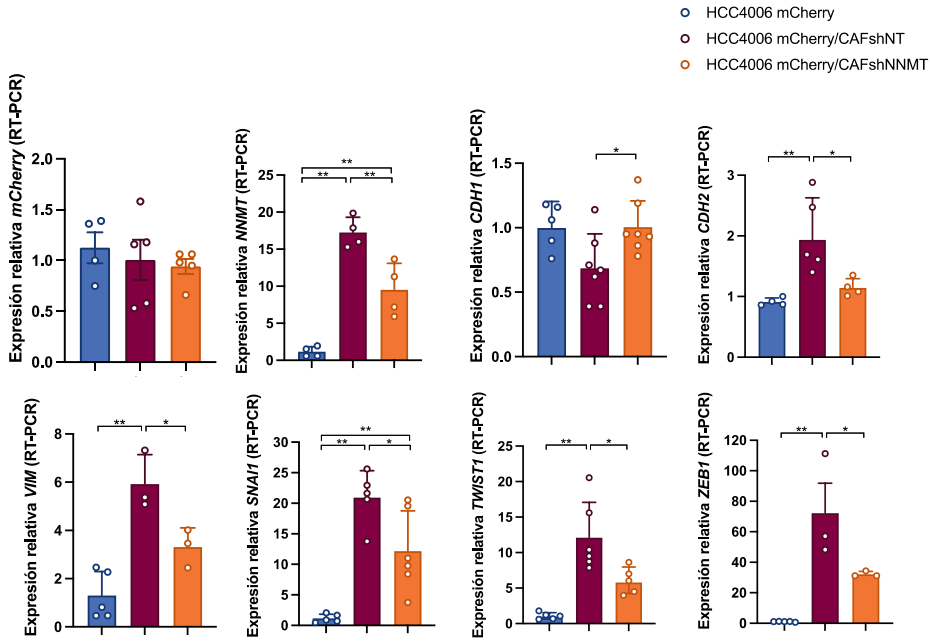


Figura 55: Expresión de marcadores EMT en los cultivos tridimensionales de HCC4006, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT. Las esferas se sembraron mediante la técnica *hanging drop* y tras 4 días de cultivo, se extrajo el ARN, se cuantificó y se llevó a cabo la RT-PCR para medir la expresión de los genes *NNMT*, *mCherry*, *CDH1*, *CDH2*, *VIM*, *SNAI1*, *TWIST1*, *ZEB1*. Las expresiones de dichos genes fueron normalizados a la expresión del gen constitutivo *ACTB*. Los resultados se muestran como porcentaje de expresión relativa al control HCC4006. Las gráficas son representativas de 5 experimentos independientes, donde cada experimento contiene 10 esferas. *p ≤ 0,05 y ** p ≤ 0,01.

En cuanto a los marcadores EMT propiamente dichos, las heteroesferas de HCC4006/CAFshNT con mayor expresión de *NNMT* presentaron menores niveles de *CDH1* y un incremento en los niveles de ARNm de varios factores de transcripción que regulan el promotor del gen *CDH1* y lo reprimen, tales como *ZEB1*, *SNAI1* y *TWIST1*, y también de otros marcadores mesenquimales *VIM* y *CDH2*. En mayor o menor medida, el cocultivo con CAFshNNMT revirtió de manera significativa todas estas diferencias.

La EMT se ha relacionado con la adquisición de capacidades migratorias e invasivas propias de las células metastásicas (Crosas-Molist *et al.*, 2016; Emad *et al.*, 2020; Nieto *et al.*, 2016). Como se ha descrito anteriormente, los estudios describen cambios parciales en el programa EMT al cocultivar los CAFs junto con células tumorales (Shan *et al.*, 2017). Además del cambio en los marcadores mesenquimales, también se han descrito los cambios morfológicos en las células tumorales característicos de la activación EMT (Xuefeng *et al.*, 2020). Respecto al papel de la NNMT del estroma, nuestros resultados están en línea con evidencias publicadas que correlacionan NNMT con los marcadores asociados al proceso EMT en modelos experimentales de cáncer escamoso de esófago, cutáneo y gástrico, entre otros (Hah *et al.*, 2019; Q. Huang *et al.*, 2024; L. Liang *et al.*, 2018). Algunos autores han determinado el impacto de la NNMT en la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales (Xiao Yu Li *et al.*, 2022). En nuestros resultados, tanto la menor expresión de CDH1 como la mayor distancia entre las células tumorales en las heteroesferas HCC4006/CAFshNT sugieren que la NNMT del estroma del CPNM podría modular la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales mediada por la activación de la EMT. Por tanto, la inhibición de la NNMT estromal podría bloquear la cascada metastásica y constituir una diana terapéutica de gran interés. Sin embargo, serán necesarios más experimentos para poder validar esta hipótesis en modelos tridimensionales *in vitro* e *in vivo*.

En definitiva, podemos concluir que el cultivo tridimensional, pese a su complejidad técnica y mayor coste, debería ser el modelo de referencia para este tipo de estudios. Además, en los cultivos bidimensionales no observamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los marcadores EMT (Figura 49) que sí se perciben en el cultivo tridimensional (Figura 55). La disposición de las células en las heteroesferas, las interacciones entre ellas o

la producción de MEC generarían un entorno fisiopatológico más realista (Fontoura *et al.*, 2020). Aún con sus limitaciones (pues no pudimos disgregar las estructuras para separar mediante *cell sorting* los CAFs de las células tumorales mCherry positivas), nuestros resultados indican que el cocultivo de células de CPNM con los CAFs pulmonares activa el programa EMT y apuntan a que el cocultivo tridimensional (y la actividad NNMT estromal) podría afectar la respuesta a los ITQs de EGFR, nuestro objetivo en los siguientes apartados.

5.3. Análisis de la sensibilidad a los ITQs de EGFR en los cultivos 3D

En una primera aproximación tratamos las homoesferas de células HCC4006 y las heteroesferas HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT con concentraciones crecientes del ITQ de EGFR osimertinib durante 72 horas (Figura 56). También cultivamos homoesferas de CAFs en las mismas condiciones para comprobar si efectivamente mostraban una resistencia innata al osimertinib. De hecho, los CAFs no presentaron respuesta al ITQ de EGFR salvo a concentraciones elevadas, reproduciendo los resultados obtenidos en el modelo bidimensional (Figura 48).

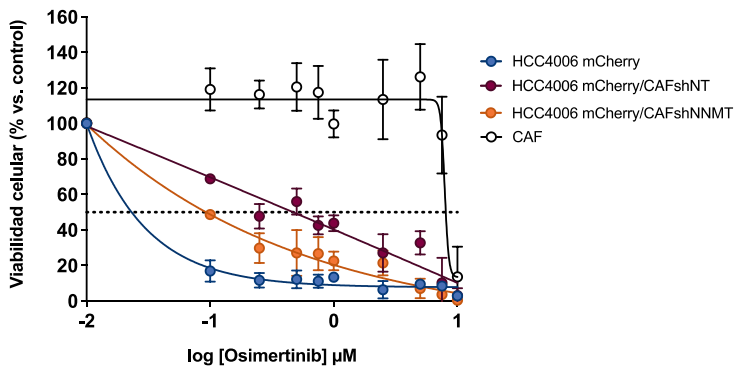


Figura 56: Estudio de la viabilidad celular en respuesta al osimertinib de los cultivos tridimensionales de HCC4006, CAFs, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT.

Ensayo de citotoxicidad donde se incubaron las diferentes condiciones de esferas a diferentes concentraciones de osimertinib (0-10 μM) durante 72 horas. La viabilidad celular fue determinada por cuantificación de ATP utilizando *Cell Titer-Glo*. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control. La gráfica es representativa de 5 experimentos distintos donde cada experimento contiene 5 esferas.

Como era de esperar, las homoesferas de células HCC4006 fueron altamente sensibles al osimertinib (IC_{50} de 10 nM), mientras que las curvas de citotoxicidad de las heteroesferas mostraron un claro desplazamiento hacia la derecha. Así, las heteroesferas HCC4006/CAFshNT aumentaron la IC_{50} del ITQ hasta aproximadamente 500 nM, pero el incremento en las heteroesferas HCC4006/CAFshNNMT fue mucho más moderado, rondando 100 nM. Estos resultados permiten afirmar que la NNMT de los CAFs juega un papel importante en la resistencia a los ITQs de EGFR en los cultivos tridimensionales.

En la Figura 57 profundizamos en este efecto con el ensayo de apoptosis con Anexina V-FITC mediante microscopía confocal. Del mismo modo, las esferas se sembraron durante 4 días y posteriormente, fueron tratadas con osimertinib a 500 nM durante 72 horas. Como era de esperar, las homoesferas HCC4006 presentaron una mayor tasa de apoptosis tanto basal como en respuesta al osimertinib, porcentajes que disminuyeron en las heteroesferas HCC4006/CAFshNT y volvieron a aumentar de manera significativa en las heteroesferas HCC4006/CAFshNNMT (Figuras 57 y 51C).

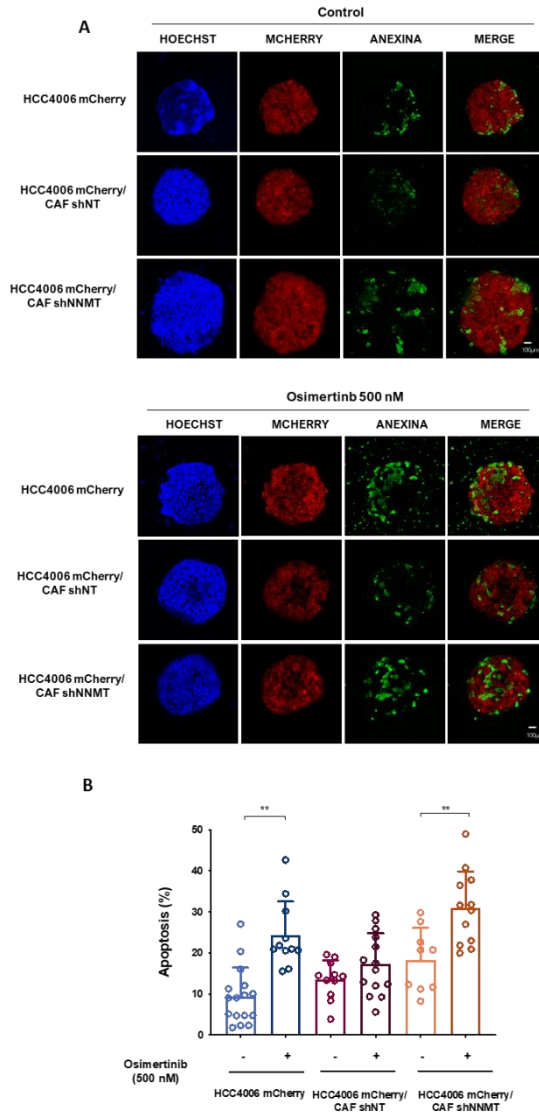


Figura 57: Evaluación de la apoptosis del cultivo tridimensional de HCC4006, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT en respuesta al tratamiento con osimertinib. (A) Inmunofluorescencia representativa de la viabilidad celular de las esferas tras el tratamiento con osimertinib a 500 nM durante 72 horas mediante análisis de apoptosis Anexina V-FITC. Los núcleos se tiñeron con Hoechst-33342 (en azul), las células HCC4006 mCherry (en rojo), apoptosis (en verde). Las imágenes fueron tomadas a 20x mediante microscopía confocal. (B) Representación del porcentaje de apoptosis respecto al total de células en cada esfera. Para cada condición se estudiaron entre 7 y 14 esferas de experimentos diferentes. ** $p \leq 0,01$.

En resumen, el cocultivo de las células de CPNM con los CAFs pulmonares aumenta la resistencia al tratamiento con osimertinib, que revierte parcialmente al disminuir la NNMT estromal. Numerosos autores han estudiado el efecto del cultivo tridimensional sobre la resistencia a terapias antitumorales (Fontoura *et al.*, 2020; Melissaridou *et al.*, 2019). Imamura *et al.* estudiaron cómo la densidad de las esferas de carcinoma mamario condicionaba la resistencia al tratamiento con paclitaxel y doxorrubicina en comparación con los cultivos tridimensionales más laxos o con el modelo bidimensional. De este modo, las esferas de mayor densidad mostraban un menor grado de apoptosis y mayor proliferación, así como centros hipóxicos (Imamura *et al.*, 2015). En línea con estas evidencias, la conocida capacidad de deposición de componentes de la MEC y grado de compactación en los CAFs podría explicar, al menos en parte, el aumento de la resistencia a osimertinib por una cuestión física. No obstante, se requerirían ensayos específicos para comprobar si la mayor sensibilidad obtenida al inhibir la NNMT de los CAFs se encuentra condiciona por la densidad de las esferas.

Dados nuestros resultados anteriores, donde demostramos que la represión de NNMT estromal revierte parcialmente el fenotipo EMT en las células tumorales, nos planteamos resolver si este efecto se debe a las interacciones directas entre las células, a la comunicación paracrina mediada por factores solubles de presentes los medios de cultivo, o más bien, a una combinación de ambos mecanismos.

5.3.1 Papel de los factores solubles liberados por los CAFs en la resistencia a los ITQs de EGFR

El estudio de H. Hu y colaboradores es especialmente relevante para este trabajo de investigación. Utilizando cocultivos, concluyeron que la eficacia de los ITQs de EGFR en el CPNM depende de la heterogeneidad fenotípica de los CAFs (H. Hu *et al.*, 2021). También demostraron que aquellos CAFs capaces de inducir resistencia a los ITQs lo hacen, en mayor o menor medida, a través de un mecanismo basado en la secreción de factores solubles. Es un hecho reconocido en multitud de trabajos de investigación que el medio de cultivo procedente de los CAFs (también conocido medio condicionado), contiene factores de crecimiento, citoquinas, y hormonas que pueden promover la proliferación, supervivencia o diferenciación de otros tipos celulares, además de proporcionar un entorno más cercano a las condiciones fisiopatológicas (Ham *et al.*, 2019; H. Hu *et al.*, 2021; Remsing Rix *et al.*, 2022; Strating *et al.*, 2023).

Teniendo en cuenta estas evidencias, decidimos comprobar el efecto sobre la respuesta al ITQ de EGFR osimertinib de los medios condicionados procedentes de las heteroesferas. Para ello, se trataron las homoesferas HCC4006 con medios condicionados obtenidos previamente de los cultivos de heteroesferas HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT. En la Figura 58 se observa cómo el tratamiento de las homoesferas con el ITQ a 10 nM redujo la viabilidad a un 49%. Cuando se incubaron en presencia del medio procedente de las heteroesferas HCC4006/CAFshNT aumentó la viabilidad hasta el 64%. Sin embargo, el medio condicionado de las heteroesferas HCC4006/CAFshNNMT no disminuyó la sensibilidad al osimertinib. Estos resultados indican que la NNMT de los CAFs es capaz de modificar el secretoma del cocultivo, lo que provoca en última instancia un aumento en la

resistencia al tratamiento de osimertinib en las homoesferas de células tumorales.

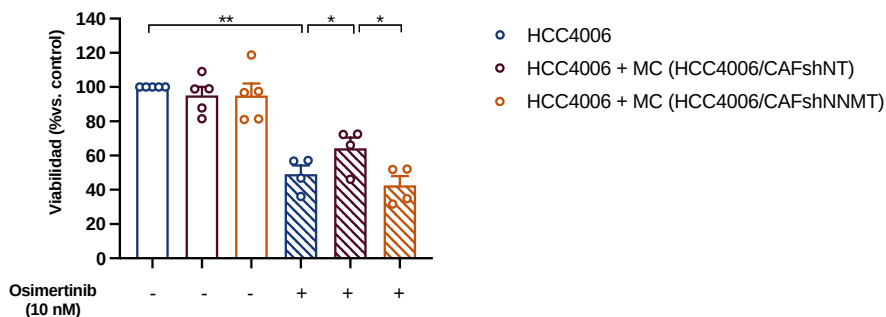


Figura 58: Viabilidad celular en respuesta al osimertinib en homoesferas de HCC4006 tratadas con medios condicionados (MC). Tras la formación de las esferas, estas se incubaron con MC procedente de heteroesferas HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT junto con osimertinib 10 nM durante 72 horas. La viabilidad celular fue determinada por cuantificación de ATP utilizando *Cell Titer-Glo*. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto a su respectivo control. La gráfica es representativa de 4 experimentos independientes, donde cada experimento contiene 5 esferas. ** $p \leq 0,05$ y * $p \leq 0,01$.

En definitiva, estas evidencias, junto con las que se desprenden de la Figura 56, indican que una parte significativa de la resistencia al osimertinib se encuentra regulada por las comunicaciones paracrinas entre las células tumorales y los CAFs shNT. Sin embargo, el porcentaje de viabilidad alcanzado en los medios condicionados de las heteroesferas HCC4006/CAFshNT fue inferior a los valores obtenidos en la curva de citotoxicidad (Figurar 56). Esto sugiere que, además de las señales paracrinas, el contacto físico directo entre las células podría también desempeñar un papel importante en la inducción de la resistencia a los ITQs de EGFR (Glentis *et al.*, 2017; H. Hu *et al.*, 2021; Santi *et al.*, 2018).

5.3.2. Secreción de TGFB1 en los cultivos tridimensionales

Como se ha descrito en numerosas ocasiones, el TGFB1 es una citoquina soluble conocida por ser uno de los principales inductores de la EMT, además de constituir un potente promotor de la resistencia a terapias dirigidas (Rafehi *et al.*, 2016; Singh & Settleman, 2010). Además, se ha demostrado que el bloqueo del TGFB1 con el inhibidor de TGFBR SB-431542 durante la adquisición de resistencia al gefitinib en HCC4006 evita la activación del fenotipo EMT en células tumorales (Soucheray *et al.*, 2015). En línea con estas observaciones y los resultados obtenidos en nuestro modelo relativos al fenotipo EMT, así como la adquisición de resistencia a osimertinib al cocultivar con los CAFs shNT, se analizaron los niveles de secreción del TGFB1 en las heterosferas.

En la Figura 59, observamos cómo, a diferencia del modelo bidimensional, la represión de la NNMT en los CAFs de CPNM condujo a una disminución marcada de este factor de crecimiento, alcanzando niveles similares a los secretados por las homoesferas HCC4006. Dado que las homoesferas de CAFs shNT secretan más TGFB1 que los CAFs shNNMT y que los niveles están en el mismo rango que los que encontramos en las heterosferas, estos resultados podrían indicar que el TGFB1 de los cocultivos procede principalmente de los CAFs.

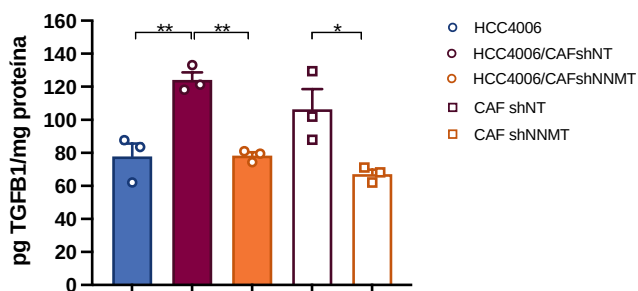


Figura 59: Niveles de secreción de TGFβ1 en las esferas de HCC4006, HCC4006/CAFshNT, HCC4006/CAFshNNMT, CAFs shNT y CAFs shNNMT. Los resultados se normalizaron respecto a la cantidad de proteína de cada condición. Gráfica representativa de 3 experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$ respecto al control HCC4006.

Para estudiar si la adquisición de la resistencia a los ITQs de EGFR en nuestro modelo se debía al TGFβ1, analizamos la viabilidad celular de las heteroesferas tras el tratamiento con osimertinib (500nM) y TGFβ1 (0,3 ng/ml), la concentración diferencial entre las heteroesferas HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT (Figura 60). Aunque ya hemos incidido varias veces en el importante papel del TGFβ1 en la resistencia adquirida a ITQs de EGFR (Jakobsen *et al.*, 2016; C. Wang *et al.*, 2019; M. Zhang *et al.*, 2021), la resistencia mediada por la actividad NNMT estromal no parece depender del este, dado que no encontramos diferencias significativas al comparar la viabilidad de las heteroesferas HCC4006/CAFshNNMT tratadas con osimertinib con las que además fueron incubadas con la citoquina. Para descartar totalmente su participación, las esferas se cultivaron a una concentración superior de TGFβ1 (5 ng/ml) sin observar diferencias (resultados no mostrados). Por tanto, a pesar de las diferencias de secreción entre las heteroesferas con CAFs shNT *versus* CAFs shNNMT, podríamos afirmar que el TGFβ1 no es suficiente para inducir la resistencia adquirida a ITQs en nuestro modelo.

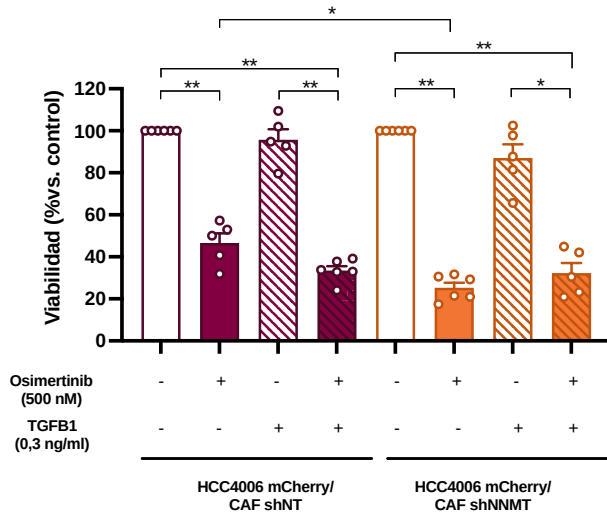


Figura 60: Viabilidad celular en respuesta al osimertinib y al TGFβ1 en las heteroesferas de HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT. Ensayo de citotoxicidad donde se incubaron las diferentes de esferas con osimertinib (500 nM) y TGFβ1 (0,3 ng/ml) durante 72 horas. La viabilidad celular fue determinada por cuantificación de ATP utilizando *Cell Titer-Glo*. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control. Los datos son representativos de 6 experimentos distintos, donde cada experimento contiene 5 esferas. *p ≤ 0,05 ** p ≤ 0,01.

5.3.3. Identificación de otros factores solubles liberados por los CAFs implicados en la resistencia a ITQs de EGFR

Tal y como mencionamos en la sección anterior, algunos autores han analizado el secretoma de los CAFs de CPNM con el fin de elucidar la comunicación que establecen con las células tumorales para condicionar la respuesta de estas a los ITQs de EGFR (H. Hu *et al.*, 2021). Siguiendo una estrategia similar, analizamos los niveles de 41 citoquinas y factores de crecimiento mediante un *array* de anticuerpos en los medios condicionados de las heteroesferas de HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT (Figura 61).

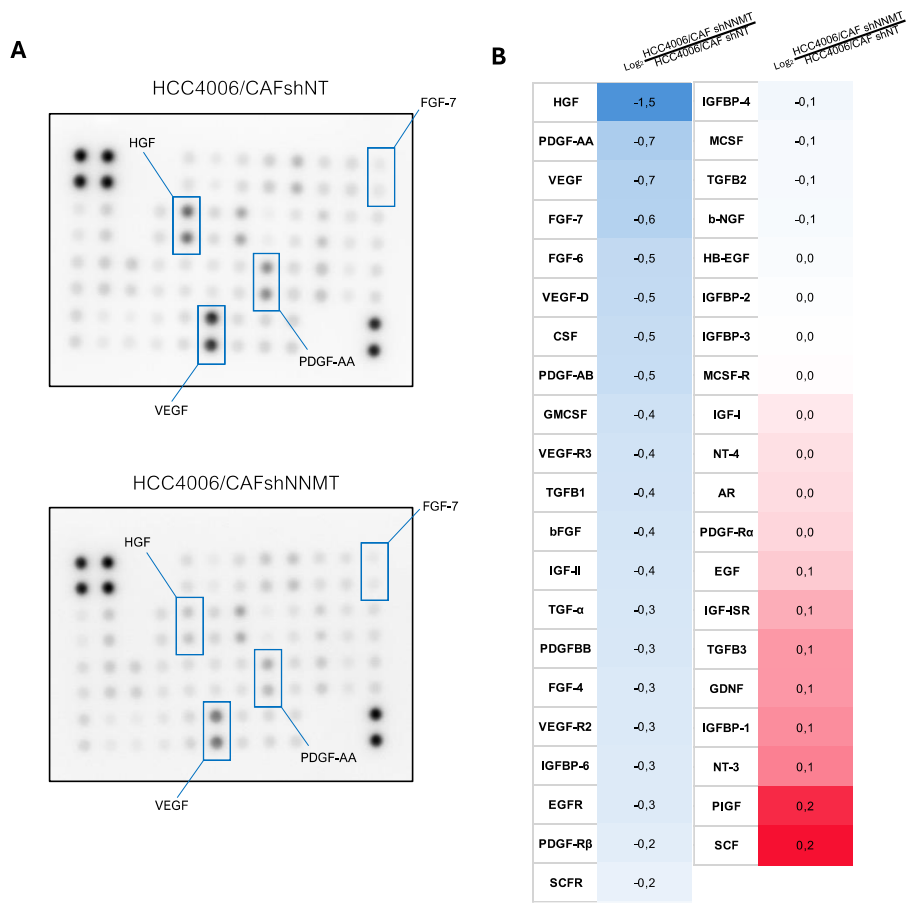


Figura 61: Análisis de los niveles de 41 citoquinas y factores de crecimiento en los medios condicionados de las heteroesferas HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT. Se analizaron los medios de cultivo en el que se formaron las esferas tras 4 días mediante un *array* de anticuerpos. (A) Imágenes de los *arrays* de anticuerpos revelados mediante quimioluminiscencia. (B) Densitometría de cada una de las parejas de *dots* normalizados al control positivo.

Tras la cuantificación del *array* de anticuerpos, encontramos algunas proteínas que disminuían significativamente su concentración en los medios condicionados de las heteroesferas HCC4006/CAFshNNMT, siendo el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) el cambio más notable (3 veces menos comparado con el medio condicionado de HCC4006/CAFshNT), seguido de

otros más sutiles que afectaban a PDGF-AA, VEGF y FGF7. En estas condiciones experimentales, también detectamos y confirmamos una discreta disminución de los niveles de TGFB1 en el medio condicionado de las heteroesferas HCC4006/CAFshNNMT, un factor que, como se ha comentado anteriormente, no explica la resensibilización parcial al osimertinib que observamos al cocultivar las células tumorales con CAFs con la NNMT reprimida (Figura 60).

Estos resultados señalan al HGF, ligando del oncogén MET, como un potencial mediador soluble de la resistencia al osimertinib inducida por los CAFs de CPNM de manera NNMT-dependiente y, por tanto, podrían complementar las evidencias aportadas por H. Hu y colaboradores (H. Hu *et al.*, 2021). El HGF fue originalmente descrito en el suero de rata como un potente agente mitógeno para los hepatocitos (Nakamura *et al.*, 1984). Entre sus múltiples funciones biológicas podemos subrayar las de inductor de la proliferación celular y la protección frente a la apoptosis (Nakamura & Mizuno, 2010). Además, la activación del eje HGF/MET está asociada a una serie de procesos protumorales como la angiogénesis, la migración, invasión y metástasis, y en definitiva la progresión tumoral (Furlan *et al.*, 2014). Como describimos en la Introducción, la oncoproteína MET puede activarse por diversos mecanismos, incluyendo la mencionada unión con su ligando HGF, la amplificación del gen *MET* y la transactivación por otros receptores de factores de crecimiento, como EGFR (Guo *et al.*, 2008). En el CPNM, la sobreexpresión de *MET* y los altos niveles de HGF se han asociado con un mal pronóstico (Finocchiaro *et al.*, 2015; Gelsomino *et al.*, 2014; Gumustekin *et al.*, 2012). Además, MET también se encuentra implicado en los procesos de remodelación tisular y desdiferenciación dirigidos por la EMT (Rastogi *et al.*, 2016). Concretamente, la unión de HGF al receptor MET favorece su

dimerización, autofosforilación, reclutamiento de efectores y activación de múltiples vías de señalización como PI3K-AKT y MAPKs. Asimismo, Engelman y sus colaboradores determinaron que el EGFR está vinculado a la señalización de PI3K/AKT a través de ERBB3 en el CPNM (Engelman *et al.*, 2005) y que la amplificación de *MET* dirige la resistencia adquirida al ITQ de EGFR de 1ª generación gefitinib mediante la unión y activación de ERBB3, de modo que se produce una activación independiente de EGFR a pesar de la inhibición de EGFR con el ITQ (Engelman *et al.*, 2007). En otros estudios se ha determinado el papel de HGF en la inducción a la resistencia a gefitinib sin la participación de ERBB3 (Yano *et al.*, 2008). Dada su importancia, se han explorado varios enfoques para inhibir el eje HGF/MET como son los anticuerpos neutralizantes de MET, los antagonistas de HGF y los ITQs de MET, como el crizotinib (Cui, 2014). Sin embargo, se ha observado que los ITQ no logran inhibir completamente la señalización HGF/MET debido a la aparición de resistencias (Y. Han *et al.*, 2024; Hughes & Siemann, 2018). Con todo, los ITQs de MET en combinación con los ITQs de EGFR han proporcionado un enfoque terapéutico eficaz para los CPNM con resistencia adquirida a los ITQs de EGFR mediada por la amplificación de *MET* (Engelman *et al.*, 2007; Yano *et al.*, 2008).

En el contexto del cáncer, el HGF es producido tanto por las células tumorales como por las células estromales (Deying *et al.*, 2017). En los cánceres de ovario o mama, se ha demostrado que los CAFs pueden proteger a las células tumorales al activar el eje HGF/MET (Deying *et al.*, 2017; Mueller *et al.*, 2012). En algunos casos de CPNM, la resistencia a los ITQs de EGFR puede ser consecuencia de la activación autocrina y/o paracrina que potencia el efecto protumoral de la oncoproteína MET. Así, en el trabajo anteriormente mencionado, H. Hu y colaboradores demostraron que la inhibición farmacológica de MET era capaz de revertir la resistencia al osimertinib

inducida por algunos subtipos de CAFs (H. Hu *et al.*, 2021). En conjunto, nuestros resultados corroboran estas observaciones, aunque dada su gran heterogeneidad los CAFs de CPNM podrían mediar dicha resistencia a través de otras citoquinas y factores de crecimiento. Siguiendo esta línea argumental, el factor de crecimiento de los fibroblastos FGF7 y la activación de su receptor FGFR también fue descrito por H. Hu y colaboradores como otra vía de señalización alternativa activable por otro subtipo de CAFs de CPNM que contribuye a la resistencia al osimertinib (H. Hu *et al.*, 2021). Otros autores han estudiado cómo diferentes isoformas del PDGF son importantes en la progresión tumoral y la resistencia a los tratamientos antitumorales (Pandey *et al.*, 2023). De hecho, la activación de la EMT provoca un aumento en los niveles de PDGFR tumoral, el cual también expresan los CAFs, y la hipersecreción de PDGFs estimula el reclutamiento de los fibroblastos en el CPNM (Tejada *et al.*, 2006). Por otro lado, tal y como se explica en la Introducción, la angiogénesis es uno de los sellos distintivos del cáncer, cuyo principal mediador es la unión de VEGF a sus receptores para estimular la proliferación y migración de células endoteliales y formar nuevos capilares, así como para estimular el crecimiento tumoral (Y. Zhao & Adjei, 2015). Con todo, nuestros resultados también sugieren que proteínas como FGF7, PDGFs o VEGFs se acumulan en los medios condicionados de las heteroesferas HCC4006/CAFs de una manera NNMT-dependiente y también podrían contribuir a la resistencia a los ITQs de EGFR.

A continuación, validamos los resultados preliminares del *array* de anticuerpos mediante un ensayo de ELISA cuantitativo específico para el HGF. En la Figura 62 podemos observar que sus niveles fueron casi indetectables en el medio de cultivo de las homoesferas de HCC4006 y relativamente altos tanto en el de las homoesferas de CAFs shNT como el de las CAFs shNNMT. Sin

embargo, la concentración de HGF en el medio de cultivo de las heteroesferas HCC4006/CAFshNT aumentó casi 10 veces con respecto al de las homoesferas y, lo que es más importante, disminuyó de manera estadísticamente significativa en el de las heteroesferas HCC4006/CAFshNNMT. Por tanto, estos resultados confirman que la actividad NNMT de los CAFs modula la secreción de HGF en el MAT del CPNM, determinando así la sensibilidad a los ITQs de EGFR.

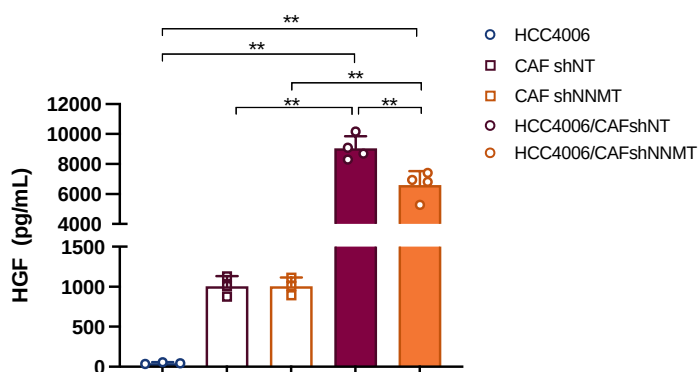


Figura 62: Concentraciones de HGF en los medios de cultivo tridimensionales de HCC4006, CAFs shNT, CAFs shNNMT, HCC4006/CAFshNT y HCC4006/CAFshNNMT. Se recogió el medio de cultivo en el que se formaron las esferas durante 4 días y se cuantificaron los niveles de secreción de HGF mediante ELISA. Resultados representativos de 4 réplicas del mismo experimento. ** $p \leq 0,01$.

Como ya describimos en la Introducción, la respuesta a la pregunta de cómo NNMT dirige la reprogramación epigenética que subyace en los múltiples cambios fenotípicos asociados al aumento de su actividad, gira alrededor de la compleja relación entre el metabolismo y los mecanismos de remodelación de la cromatina que controlan la transcripción génica. Distintas evidencias experimentales señalan que en las células tumorales (y también en los CAFs) de diferentes tipos de cáncer (que no el CPNM) la sobreactivación de NNMT consume el dador de metilos SAM y limita los niveles de NAD^+ , impactando así

en múltiples actividades enzimáticas remodeladoras de la cromatina que utilizan estos cofactores metabólicos, como por ejemplo las histona metiltransferasas y las histona desacetilasas, entre otras (Y. Gao *et al.*, 2021; Haws *et al.*, 2020; Kaelin & McKnight, 2013; C. Lu & Thompson, 2012; Song *et al.*, 2020). Por tanto, resulta plausible considerar que, en nuestro modelo experimental, la actividad NNMT estromal podría activar de alguna manera la maquinaria epigenética que regula la expresión del gen *HGF* y, por extensión, la de los programas transcripcionales FMT e EMT. Además, conocemos en detalle cómo se regula la actividad del promotor del gen *HGF* en condiciones fisiológicas y patológicas, siendo los factores de transcripción NF- κ B, CREB, AP2, PPAR γ , ácido retinoico, MYC/MAX, entre otros, importantes reguladores positivos de su transcripción y, por tanto, hipotéticos intermediarios (junto a otros reguladores epigenéticos) entre NNMT, los cambios metabólicos que provoca su sobreactivación y la regulación de la expresión de genes concretos (J. G. Jiang *et al.*, 2000; Xin Yu Li *et al.*, 2011; Raj *et al.*, 2022; Yin *et al.*, 2014).

Por otro lado, existe otro marco hipotético que podría explicar por qué la actividad de una enzima metabólica como NNMT regula los niveles de *HGF*. Numerosas evidencias resaltan la importancia de la glucólisis en la progresión tumoral y la resistencia a los tratamientos (Majem *et al.*, 2020; Morandi & Indraccolo, 2017). En modelos experimentales de cáncer hepático, *HGF* promueve el efecto *Warburg*, una adaptación del metabolismo energético tumoral que favorece la glucólisis sobre la fosforilación oxidativa, aumentando la producción de lactato (X. Huang *et al.*, 2019). En modelos de CPNM dirigidos por EGFR o MET, más cercanos a nuestro escenario experimental, el tratamiento prolongado con ITQs de estos receptores también incrementa la glucólisis (Apicella *et al.*, 2018). En este estudio, los autores demuestran que el lactato secretado por las células tumorales induce la expresión de *HGF* en

los CAFs de manera NF- κ B-dependiente, lo que a su vez potenciaría la señalización a través de MET en las células tumorales y, en consecuencia, el desarrollo de la resistencia a los ITQs. Por otra parte, NNMT promueve el efecto *Warburg* y la progresión del colangiocarcinoma, un tipo de cáncer de las vías biliares (S. Lu *et al.*, 2022). En otros trabajos se ha descrito un aumento de la glucólisis en las células de CPNM con resistencia adquirida a ITQs de EGFR mediado por la desacetilación por parte de la histona deacetilasa SIRT1 de la oncoproteína MYC, de una manera NNMT dependiente (Suzuki *et al.*, 2018; Y. Wang *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta todas estas evidencias experimentales, sería muy interesante comprobar si nuestros CAFs de CPNM con elevada actividad NNMT también modifican el metabolismo del MAT (tal vez promoviendo el efecto *Warburg*) contribuyendo a la resistencia a los ITQs de EGFR a través de un bucle de retroalimentación positiva lactato/HGF/MET y, además, generando un entorno pro-EMT que a su vez potencia la capacidad de invasión y metástasis, y en definitiva la progresión del CPNM (Hah *et al.*, 2019; F. Liu *et al.*, 2017; T. Qin *et al.*, 2022). No obstante, serán necesarios más experimentos *in vitro* e *in vivo* para validar estas hipótesis.

Por último, es importante que insistamos en la enorme heterogeneidad funcional de los CAFs de CPNM (ver Introducción). En el contexto de la resistencia a los ITQs de EGFR, H. Hu y colaboradores clasificaron a los CAFs en al menos tres subtipos según su impacto en la sensibilidad a los ITQs de EGFR y el mecanismo de acción: un subtipo de CAFs, que inducen resistencia a través de HGF/MET, otro que lo hace a través de FGF7/FGFR y un tercer subtipo que no contribuye (H. Hu *et al.*, 2021). A estos subtipos habría que añadir aquellas subpoblaciones recientemente caracterizadas mediante *scRNA-seq* (Cords *et al.*, 2023; Elyada *et al.*, 2019; Lambrechts *et al.*, 2018; Öhlund *et al.*, 2017), e introducir nuevas evidencias como las descritas en este

trabajo de investigación. Además, en el estudio de Hu *et al.* se demostró que 6 CAFs procedentes de pacientes de CPNM dirigidos por mutaciones activadores en EGFR de un total de 22 pacientes estudiados, pertenecían al primer subtipo, es decir, aquellos que inducían resistencia a través de MET/HGF. Por tanto, podríamos hipotetizar que aproximadamente un 16% de los pacientes de CPNM que adquieren resistencia a los ITQs de EGFR de 3ª generación (descartando aquellos que lo hagan por mecanismos genéticos como la mutación *EGFR*^{C797S}) podrían beneficiarse de una estrategia terapéutica basada en la modulación del eje NNMT/HGF/MET. En definitiva, el estudio detallado de la heterogeneidad y las interacciones que se producen en el MAT emerge como una nueva herramienta para prevenir o revertir la adquisición de resistencia a las terapias dirigidas contra EGFR en el CPNM.

V. CONCLUSIONES

- En los CAFs aislados de biopsias quirúrgicas de CPNM, la proliferación y migración *in vitro* es menor que la de los fibroblastos del tejido normal adyacente.
- La capacidad contráctil y la secreción de componentes de la MEC como el colágeno, junto a la hipersecreción del factor pro-EMT y pro-FMT TGFB1 son característicos de un fenotipo similar al del miofibroblasto.
- La expresión de NNMT en los CAFs, correlaciona parcialmente con la de marcadores fibróticos (α -SMA, FAP, FN1) y mesenquimales (SNAI1).
- α -SMA y NNMT tienden a coexpresan en los CAFs tanto a nivel basal como en respuesta al TGFB1.
- La represión de NNMT en los CAFs de CPNM disminuye la expresión de marcadores fibróticos como α -SMA y en menor medida FAP o FN1, así como marcadores mesenquimales como VIM, TWIST1 y ZEB1. Además, aumenta la proliferación y migración celulares, y disminuye su capacidad contráctil y secretora de TGFB1.
- El análisis inmunohistoquímico de las biopsias de CPNM muestra una elevada coexpresión entre α -SMA y NNMT, y una correlación positiva entre NNMT y el volumen de tumor ocupado por el estroma.
- El volumen de tumor ocupado por estroma y los niveles elevados de NNMT correlacionan con un peor pronóstico en los pacientes de CPNM. Estos resultados sugieren que la NNMT podría utilizarse como un biomarcador capaz de predecir la evolución clínica estos CPNM.
- El modelo tridimensional de esferas mimetiza con mayor fidelidad el MAT a diferencia del modelo bidimensional. La expresión de NNMT en los CAFs contribuye a una mayor estabilidad estructural y viabilidad de las células tumorales.

- La NNMT de los CAFs activa el proceso EMT al reprimir la CDH1 tumoral y aumentar los marcadores mesenquimales (CDH2, VIM) y factores de transcripción pro-EMT (SNAI1, TWIST1, ZEB1) en las esferas.
- La NNMT de los CAFs disminuye la sensibilidad de las células tumorales EGFR mutantes al ITQ de EGFR osimertinib.
- Aunque las esferas con NNMT elevada en los CAFs presenta mayores niveles de secreción de TGFB1, no parece un factor suficiente para inducir la resistencia al ITQ de EGFR.
- Los medios condicionados procedentes de las heteroesferas con NNMT elevada en los CAFs aumenta parcialmente la resistencia al osimertinib.
- El análisis de los medios condicionados mediante *arrays* de anticuerpos identificó al factor de crecimiento HGF como un importante mediador de la resistencia a los ITQs de EGFR dependiente de la actividad NNMT de los CAFs de CPNM con fenotipo miofibroblasto.
- La modulación farmacológica del eje NNMT/HGF/MET en el MAT emerge como una nueva estrategia terapéutica para prevenir la adquisición de resistencia a los ITQs de EGFR en los casos de CPNM dirigidos por mutaciones en EGFR.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abangan, R. S., Williams, C. R., Mehrotra, M., Duncan, J. D., & LaRue, A. C. (2010). MCP1 Directs Trafficking of Hematopoietic Stem Cell-Derived Fibroblast Precursors in Solid Tumor. *The American Journal of Pathology*, 176(4), 1914. <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2010.080839>
- Abbas, Z. N., Al-Saffar, A. Z., Jasim, S. M., & Sulaiman, G. M. (2023). Comparative analysis between 2D and 3D colorectal cancer culture models for insights into cellular morphological and transcriptomic variations. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45144-w>
- Adachi, Y., Ito, K., Hayashi, Y., Kimura, R., Tan, T. Z., Yamaguchi, R., & Ebi, H. (2020). Epithelial-to-Mesenchymal Transition is a Cause of Both Intrinsic and Acquired Resistance to KRAS G12C Inhibitor in KRAS G12C-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 26(22), 5962–5973. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2077>
- Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007 26:9, 26(9), 1324–1337. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>
- Alba-Castellón, L., Olivera-Salguero, R., Mestre-Farrera, A., Peña, R., Herrera, M., Bonilla, F., Casal, J. I., Baulida, J., Peña, C., & De Herreros, A. G. (2016). Snail1-Dependent Activation of Cancer-Associated Fibroblast Controls Epithelial Tumor Cell Invasion and Metastasis. *Cancer Research*, 76(21), 6205–6217. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0176>
- Albregues, J., Bertero, T., Grasset, E., Bonan, S., Maiel, M., Bourget, I., Philippe, C., Herraiz Serrano, C., Benamar, S., Croce, O., Sanz-Moreno, V., Meneguzzi, G., Feral, C. C., Cristofari, G., & Gaggioli, C. (2015). Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nature Communications* 2015 6:1, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms10204>
- Alegre, M. L., Frauwirth, K. A., & Thompson, C. B. (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature Reviews Immunology* 2001 1:3, 1(3), 220–228. <https://doi.org/10.1038/35105024>
- Alevizakos, M., Kaltsas, S., & Syrigos, K. N. (2013). The VEGF pathway in lung cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 72(6), 1169–1181. <https://doi.org/10.1007/S00280-013-2298-3/TABLES/2>
- Alexander, J., & Cukierman, E. (2016). Stromal dynamic reciprocity in cancer: intricacies of fibroblastic-ECM interactions. *Current Opinion in Cell Biology*, 42, 80–93. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2016.05.002>

- Alston, T. A., & Abeles, R. H. (1988). Substrate specificity of nicotinamide methyltransferase isolated from porcine liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 260(2), 601–608. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90487-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90487-0)
- Amenta, P. S., Briggs, K., Xu, K., Gamboa, E., Jukkola, A. F., Li, D., & Myers, J. C. (2000). Type XV collagen in human colonic adenocarcinomas has a different distribution than other basement membrane zone proteins. *Human Pathology*, 31(3), 359–366. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(00\)80251-8](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(00)80251-8)
- Amenta, P. S., Hadad, S., Lee, M. T., Barnard, N., Li, D., & Myers, J. C. (2003). Loss of types XV and XIX collagen precedes basement membrane invasion in ductal carcinoma of the female breast. *The Journal of Pathology*, 199(3), 298–308. <https://doi.org/10.1002/PATH.1303>
- Aoto, K., Ito, K., Aoki, S., Aoto, K., Ito, K., & Aoki, S. (2018). Complex formation between platelet-derived growth factor receptor β and transforming growth factor β receptor regulates the differentiation of mesenchymal stem cells into cancer-associated fibroblasts. *Oncotarget*, 9(75), 34090–34102. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.26124>
- Apicella, M., Giannoni, E., Fiore, S., Ferrari, K. J., Fernández-Pérez, D., Isella, C., Granchi, C., Minutolo, F., Sottile, A., Comoglio, P. M., Medico, E., Pietrantonio, F., Volante, M., Pasini, D., Chiarugi, P., Giordano, S., & Corso, S. (2018). Increased Lactate Secretion by Cancer Cells Sustains Non-cell-autonomous Adaptive Resistance to MET and EGFR Targeted Therapies. *Cell Metabolism*, 28(6), 848–865.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.08.006>
- Aramini, B., Banchelli, F., Bettelli, S., Manfredini, S., D'Amico, R., Masciale, V., Pinelli, M., Moretti, M., Stefani, A., Bertolini, F., Dominici, M., Morandi, U., & Maiorana, A. (2020). Overall survival in patients with lung adenocarcinoma harboring “niche” mutations: an observational study. *Oncotarget*, 11(5), 550. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.27472>
- Artandi, S. E., & DePinho, R. A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 9. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGP268>
- Babaei, G., Aziz, S. G. G., & Jaghi, N. Z. Z. (2021). EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, 110909. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110909>

- Baeriswyl, V., & Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19(5), 329–337. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2009.05.003>
- Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, S., Javaheri, T., & Zare, P. (2020). Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling* 2020 18:1, 18(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S12964-020-0530-4>
- Barbazán, J., & Matic Vignjevic, D. (2019). Cancer associated fibroblasts: is the force the path to the dark side? *Current Opinion in Cell Biology*, 56, 71–79. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2018.09.002>
- Barta, J. A., Powell, C. A., & Wisnivesky, J. P. (2019). Global epidemiology of lung cancer. *Annals of Global Health*, 85(1). <https://doi.org/10.5334/AOGH.2419/METRICS/>
- Bartoschek, M., Oskolkov, N., Bocci, M., Lövrot, J., Larsson, C., Sommarin, M., Madsen, C. D., Lindgren, D., Pekar, G., Karlsson, G., Ringnér, M., Bergh, J., Björklund, Å., & Pietras, K. (2018). Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018-07582-3>
- Basu, A. K. (2018). DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS19040970>
- Bechtel, W., McGoohan, S., Zeisberg, E. M., Müller, G. A., Kalbacher, H., Salant, D. J., Müller, C. A., Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2010). Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nature Medicine* 2010 16:5, 16(5), 544–550. <https://doi.org/10.1038/nm.2135>
- Becker, J. H., Gao, Y., Soucheray, M., Pulido, I., Kikuchi, E., Rodríguez, M. L., Gandhi, R., Lafuente-Sanchis, A., Aupí, M., Fernández-Coronado, J. A., Martín-Martorell, P., Cremades, A., Galbis-Caravajal, J. M., Alcácer, J., Christensen, C. L., Simms, P., Hess, A., Asahina, H., Kahle, M. P., ... Shimamura, T. (2019). CXCR7 reactivates ERK signaling to promote resistance to EGFR kinase inhibitors in NSCLC. *Cancer Research*, 79(17), 4439–4452. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0024/653829/AM/CXCR7-REACTIVATES-ERK-SIGNALING-TO-PROMOTE>
- Belhabib, I., Zaghdoudi, S., Lac, C., Bousquet, C., & Jean, C. (2021). Extracellular Matrices and Cancer-Associated Fibroblasts: Targets for Cancer Diagnosis and Therapy? *Cancers*, 13(14). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13143466>

- Berdasco, M., & Esteller, M. (2010). Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Developmental Cell*, 19(5), 698–711. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2010.10.005>
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer* 2003 3:6, 3(6), 401–410. <https://doi.org/10.1038/nrc1093>
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004 432:7015, 432(7015), 332–337. <https://doi.org/10.1038/nature03096>
- Biffi, G., Oni, T. E., Spielman, B., Hao, Y., Elyada, E., Park, Y., Preall, J., & Tuveson, D. A. (2019). IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGF β to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discovery*, 9(2), 282–301. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0710>
- Biffi, G., & Tuveson, D. A. (2021). Diversity and biology of cancer-associated fibroblasts. *Physiological Reviews*, 101(1), 147–176. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00048.2019/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0042029610011.JPEG>
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, 6(8), 611–622. <https://doi.org/10.1038/NRG1656>
- Bochet, L., Lehuédé, C., Dauvillier, S., Wang, Y. Y., Dirat, B., Laurent, V., Dray, C., Guiet, R., Maridonneau-Parini, I., Gonidec, S. Le, Couderc, B., Escourrou, G., Valet, P., & Muller, C. (2013). Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Research*, 73(18), 5657–5668. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0530>
- Bockwoldt, M., Houry, D., Niere, M., Gossmann, T. I., Reinartz, I., Schug, A., Ziegler, M., & Heiland, I. (2019). Identification of evolutionary and kinetic drivers of NAD-dependent signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(32), 15957–15966. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1902346116/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Bose, S., Allen, A. E., & Locasale, J. W. (2020). The Molecular Link from Diet to Cancer Cell Metabolism. *Molecular Cell*, 78(6), 1034–1044. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2020.05.018>
- Brabletz, S., & Brabletz, T. (2010). The ZEB/miR-200 feedback loop—a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Reports*, 11(9), 670–677. <https://doi.org/10.1038/EMBOR.2010.117>
- Brachs, S., Polack, J., Brachs, M., Jahn-Hofmann, K., Elvert, R., Pfenninger, A., Bärenz, F., Margerie, D., Mai, K., Spranger, J., & Kannt,

- A. (2019). Genetic Nicotinamide N-Methyltransferase (Nnmt) Deficiency in Male Mice Improves Insulin Sensitivity in Diet-Induced Obesity but Does Not Affect Glucose Tolerance. *Diabetes*, 68(3), 527–542. <https://doi.org/10.2337/DB18-0780>
- Bremnes, R. M., Dønnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Andersen, S., Sirera, R., Camps, C., Marinez, I., & Busund, L. T. (2011). The Role of Tumor Stroma in Cancer Progression and Prognosis: Emphasis on Carcinoma-Associated Fibroblasts and Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(1), 209–217. <https://doi.org/10.1097/JTO.0B013E3181F8A1BD>
- Brennan, K., Offiah, G., McSherry, E. A., & Hopkins, A. M. (2010). Tight junctions: a barrier to the initiation and progression of breast cancer? *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/460607>
- Brenner, D. R., McLaughlin, J. R., & Hung, R. J. (2011). Previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0017479>
- Bronsert, P., Kohler, I., Timme, S., Kiefer, S., Werner, M., Schilling, O., Vashist, Y., Makowiec, F., Brabletz, T., Hopt, U. T., Bausch, D., Kulemann, B., Keck, T., & Wellner, U. F. (2014). Prognostic significance of Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) expression in cancer cells and cancer-associated fibroblasts in pancreatic head cancer. *Surgery (United States)*, 156(1), 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2014.02.018>
- Bruner, H. C., & Derksen, P. W. B. (2018). Loss of E-Cadherin-Dependent Cell–Cell Adhesion and the Development and Progression of Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(3). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A029330>
- Bu, L., Baba, H., Yoshida, N., Miyake, K., Yasuda, T., Uchihara, T., Tan, P., & Ishimoto, T. (2019). Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Oncogene* 2019 38:25, 38(25), 4887–4901. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0765-y>
- Bubendorf, L., Büttner, R., Al-Dayel, F., Dietel, M., Elmberger, G., Kerr, K., López-Ríos, F., Marchetti, A., Öz, B., Pauwels, P., Penault-Llorca, F., Rossi, G., Ryška, A., & Thunnissen, E. (2016). Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Archiv*, 469(5), 489–503. <https://doi.org/10.1007/S00428-016-2000-3/FIGURES/5>
- Bubendorf, L., Lantuejoul, S., de Langen, A. J., & Thunnissen, E. (2017). Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens. *European Respiratory Review*, 26(144). <https://doi.org/10.1183/16000617.0007-2017>

- Burkhardt, D. L., & Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer* 2008 8:9, 8(9), 671–682. <https://doi.org/10.1038/nrc2399>
- Butler, J. M., Kobayashi, H., & Rafii, S. (2010). Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nature Reviews. Cancer*, 10(2), 138–146. <https://doi.org/10.1038/NRC2791>
- Campbell, J. D., Alexandrov, A., Kim, J., Wala, J., Berger, A. H., Pedamallu, C. S., Shukla, S. A., Guo, G., Brooks, A. N., Murray, B. A., Imielinski, M., Hu, X., Ling, S., Akbani, R., Rosenberg, M., Cibulskis, C., Ramachandran, A., Collisson, E. A., Kwiatkowski, D. J., ... Meyerson, M. (2016). Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nature Genetics* 2016 48:6, 48(6), 607–616. <https://doi.org/10.1038/ng.3564>
- Cansouline, X., Lipan, B., Sizaret, D., Tallet, A., Vandier, C., Carmier, D., & Legras, A. (2022). EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer at Surgical Stages: What Is the Place for Tyrosine Kinase Inhibitors? *Cancers*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/CANCERS14092257>
- Carey, K. D., Garton, A. J., Romero, M. S., Kahler, J., Thomson, S., Ross, S., Park, F., Haley, J. D., Gibson, N., & Sliwkowski, M. X. (2006). Kinetic Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Somatic Mutant Proteins Shows Increased Sensitivity to the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Erlotinib. *Cancer Research*, 66(16), 8163–8171. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0453>
- Carrot-Zhang, J., Chambwe, N., Damrauer, J. S., Knijnenburg, T. A., Robertson, A. G., Yau, C., Zhou, W., Berger, A. C., Huang, K. lin, Newberg, J. Y., Mashl, R. J., Romanel, A., Sayaman, R. W., Demichelis, F., Felau, I., Frampton, G. M., Han, S., Hoadley, K. A., Kemal, A., ... Beroukhim, R. (2020). Comprehensive Analysis of Genetic Ancestry and Its Molecular Correlates in Cancer. *Cancer Cell*, 37(5), 639–654.e6. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2020.04.012>
- Cavallari, I., Ciccarese, F., Sharova, E., Urso, L., Raimondi, V., Silic-Benussi, M., D'Agostino, D. M., & Ciminale, V. (2021). The miR-200 Family of microRNAs: Fine Tuners of Epithelial-Mesenchymal Transition and Circulating Cancer Biomarkers. *Cancers*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13235874>
- Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2004 4:2, 4(2), 118–132. <https://doi.org/10.1038/nrc1276>
- Chaffer, C. L., Marjanovic, N. D., Lee, T., Bell, G., Kleer, C. G., Reinhardt, F., D'Alessio, A. C., Young, R. A., & Weinberg, R. A. (2013). XPoised

- chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell*, 154(1), 61. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.005>
- Chaffer, C. L., San Juan, B. P., Lim, E., & Weinberg, R. A. (2016). EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 35(4), 645–654. <https://doi.org/10.1007/S10555-016-9648-7/TABLES/1>
- Chaft, J. E., Rimmer, A., Weder, W., Azzoli, C. G., Kris, M. G., & Cascone, T. (2021). Evolution of systemic therapy for stages I–III non-metastatic non-small-cell lung cancer. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 18, Number 9). <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00501-4>
- Chakravarthy, A., Furness, A., Joshi, K., Ghorani, E., Ford, K., Ward, M. J., King, E. V., Lechner, M., Marafioti, T., Quezada, S. A., Thomas, G. J., Feber, A., & Fenton, T. R. (2018). Pan-cancer deconvolution of tumour composition using DNA methylation. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05570-1>
- Chan, B. A., & Hughes, B. G. M. (2015). Targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current standards and the promise of the future. *Translational Lung Cancer Research*, 4(1), 36–54. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2218-6751.2014.05.01>
- Charest, A., Wilker, E. W., McLaughlin, M. E., Lane, K., Gowda, R., Coven, S., McMahon, K., Kovach, S., Feng, Y., Yaffe, M. B., Jacks, T., & Housman, D. (2006). ROS fusion tyrosine kinase activates a SH2 domain-containing phosphatase-2/phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin signaling axis to form glioblastoma in mice. *Cancer Research*, 66(15), 7473–7481. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1193>
- Chaturvedi, V., Fournier-Level, A., Cooper, H. M., & Murray, M. J. (2019). Loss of Neogenin1 in human colorectal carcinoma cells causes a partial EMT and wound-healing response. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-40886-Y>
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2008). Transforming Growth Factor- β Signaling–Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion. *Molecular Cancer Research*, 6(10), 1521–1533. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2203>
- Chirieac, L. R., & Dacic, S. (2010). Targeted Therapies in Lung Cancer. *Surgical Pathology Clinics*, 3(1), 71. <https://doi.org/10.1016/J.PATH.2010.04.001>
- Cho, J. H., Lim, S. H., An, H. J., Kim, K. H., Park, K. U., Kang, E. J., Choi, Y. H., Ahn, M. S., Lee, M. H., Sun, J. M., Lee, S. H., Ahn, J. S., Park, K., & Ahn, M. J. (2020). Osimertinib for patients with non-small-cell lung cancer harboring uncommon EGFR mutations: A multicenter,

- open-label, phase II trial (KCSG-Lu15-09). *Journal of Clinical Oncology*, 38(5), 488–495. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00931>
- Choe, C., Shin, Y. S., Kim, C., Choi, S. J., Lee, J., Kim, S. Y., Cho, Y. B., & Kim, J. (2015). Crosstalk with cancer-associated fibroblasts induces resistance of non-small cell lung cancer cells to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition. *OncoTargets and Therapy*, 8, 3665. <https://doi.org/10.2147/OTT.S89659>
- Christoffersson, G., & von Herrath, M. (2019). Regulatory Immune Mechanisms beyond Regulatory T Cells. *Trends in Immunology*, 40(6), 482–491. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.005>
- Chuliá-Peris, L., Carreres-Rey, C., Gabasa, M., Alcaraz, J., Carretero, J., & Pereda, J. (2022). Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Pulmonary Fibrosis: EMMPRIN/CD147 Comes into Play. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13). <https://doi.org/10.3390/IJMS23136894>
- Chung, J. H., Rho, J. K., Xu, X., Lee, J. S., Yoon, H. II, Lee, C. T., Choi, Y. J., Kim, H. R., Kim, C. H., & Lee, J. C. (2011). Clinical and molecular evidences of epithelial to mesenchymal transition in acquired resistance to EGFR-TKIs. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 73(2), 176–182. <https://doi.org/10.1016/J.LUNGCAN.2010.11.011>
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives. *Molecular Cell*, 40(2), 179. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.09.019>
- Collisson, E. A., Campbell, J. D., Brooks, A. N., Berger, A. H., Lee, W., Chmielecki, J., Beer, D. G., Cope, L., Creighton, C. J., Danilova, L., Ding, L., Getz, G., Hammerman, P. S., Hayes, D. N., Hernandez, B., Herman, J. G., Heymach, J. V., Jurisica, I., Kucherlapati, R., ... Cheney, R. (2014). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014 511:7511, 511(7511), 543–550. <https://doi.org/10.1038/nature13385>
- Conti, S., Kato, T., Park, D., Sahai, E., Trepatt, X., & Labernadie, A. (2021). CAFs and Cancer Cells Co-Migration in 3D Spheroid Invasion Assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2179, 243–256. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0779-4_19
- Cooper, G. M. (2000). *The Development and Causes of Cancer*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
- Cords, L., Tietscher, S., Anzeneder, T., Langwieder, C., Rees, M., de Souza, N., & Bodenmiller, B. (2023). Cancer-associated fibroblast classification in single-cell and spatial proteomics data. *Nature Communications* 2023 14:1, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39762-1>

- Cortez, E., Roswall, P., & Pietras, K. (2014). Functional subsets of mesenchymal cell types in the tumor microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*, 25, 3–9. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2013.12.010>
- Cortot, A. B., & Jänne, P. A. (2014). Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *European Respiratory Review*, 23(133), 356–366. <https://doi.org/10.1183/09059180.00004614>
- Costa, A., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Pelon, F., Bourachot, B., Cardon, M., Sirven, P., Magagna, I., Fuhrmann, L., Bernard, C., Bonneau, C., Kondratova, M., Kuperstein, I., Zinovyev, A., Givel, A. M., Parrini, M. C., Soumelis, V., Vincent-Salomon, A., & Mechta-Grigoriou, F. (2018). Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell*, 33(3), 463–479.e10. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2018.01.011>
- Council, L., & Hameed, O. (2009). Differential expression of immunohistochemical markers in bladder smooth muscle and myofibroblasts, and the potential utility of desmin, smoothelin, and vimentin in staging of bladder carcinoma. *Modern Pathology* 2009 22:5, 22(5), 639–650. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.9>
- Covarrubias, A. J., Perrone, R., Grozio, A., & Verdin, E. (2020). NAD⁺ metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 22:2, 22(2), 119–141. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00313-x>
- Cox, T. R., Bird, D., Baker, A. M., Barker, H. E., Ho, M. W. Y., Lang, G., & Erler, J. T. (2013). LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Research*, 73(6), 1721. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2233>
- Cox, T. R., & Erler, J. T. (2014). Molecular pathways: connecting fibrosis and solid tumor metastasis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(14), 3637–3643. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1059>
- Craene, B. De, & Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews Cancer* 2013 13:2, 13(2), 97–110. <https://doi.org/10.1038/nrc3447>
- Crosas-Molist, E., Bertran, E., Rodriguez-Hernandez, I., Herraiz, C., Cantelli, G., Fabra, A., Sanz-Moreno, V., & Fabregat, I. (2016). The NADPH oxidase NOX4 represses epithelial to amoeboid transition and efficient tumour dissemination. *Oncogene* 2017 36:21, 36(21), 3002–3014. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.454>
- Cui, J. J. (2014). Targeting receptor tyrosine kinase MET in cancer: Small molecule inhibitors and clinical progress. *Journal of Medicinal*

- Chemistry*, 57(11), 4427–4453.
https://doi.org/10.1021/JM401427C/ASSET/IMAGES/LARGE/JM-2013-01427C_0017.JPEG
- Da Cunha Santos, G., Saiegh, M. A., Geddie, W., & Leighl, N. (2011). EGFR gene status in cytological samples of nonsmall cell lung carcinoma: controversies and opportunities. *Cancer Cytopathology*, 119(2), 80–91. <https://doi.org/10.1002/CNCY.20150>
- Dagogo-Jack, I., & Shaw, A. T. (2017). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2017 15:2, 15(2), 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>
- Damaghi, M., Tafreshi, N. K., Lloyd, M. C., Sprung, R., Estrella, V., Wojtkowiak, J. W., Morse, D. L., Koomen, J. M., Bui, M. M., Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2015). Chronic acidosis in the tumour microenvironment selects for overexpression of LAMP2 in the plasma membrane. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS9752>
- Daniel, S. K., Seo, Y. D., & Pillarisetty, V. G. (2020). The CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis as a mechanism of immune resistance in gastrointestinal malignancies. *Seminars in Cancer Biology*, 65, 176–188. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2019.12.007>
- Davidson, S., Efremova, M., Riedel, A., Mahata, B., Pramanik, J., Huuhtanen, J., Kar, G., Vento-Tormo, R., Hagai, T., Chen, X., Haniffa, M. A., Shields, J. D., & Teichmann, S. A. (2020). Single-Cell RNA Sequencing Reveals a Dynamic Stromal Niche That Supports Tumor Growth. *Cell Reports*, 31(7). <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.107628>
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., ... Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949–954. <https://doi.org/10.1038/NATURE00766>
- Davies, K. D., Le, A. T., Theodoro, M. F., Skokan, M. C., Aisner, D. L., Berge, E. M., Terracciano, L. M., Cappuzzo, F., Incarbone, M., Roncalli, M., Alloisio, M., Santoro, A., Camidge, D. R., Varella-Garcia, M., & Doebele, R. C. (2012). Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(17), 4570–4579. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0550>
- Dawson, J. C., Serrels, A., Stupack, D. G., Schlaepfer, D. D., & Frame, M. C. (2021). Targeting FAK in anticancer combination therapies.

- Nature Reviews. Cancer*, 21(5), 313–324.
<https://doi.org/10.1038/S41568-021-00340-6>
- De Mello, R. A. B., Voscaboinik, R., Luciano, J. V. P., Cremonese, R. V., Amaral, G. A., Castelo-Branco, P., & Antoniou, G. (2021). Immunotherapy in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Lacking Driver Mutations and Future Perspectives. *Cancers* 2022, Vol. 14, Page 122, 14(1), 122.
<https://doi.org/10.3390/CANCERS14010122>
- De Palma, M., Biziato, D., & Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 17(8), 457–474. <https://doi.org/10.1038/NRC.2017.51>
- DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C. B. (2008). The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism*, 7(1), 11–20.
<https://doi.org/10.1016/J.CMET.2007.10.002>
- Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), 605–644. <https://doi.org/10.1016/J.CCM.2011.09.001>
- DeNardo, D. G., Andreu, P., & Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(2), 309–316.
<https://doi.org/10.1007/S10555-010-9223-6/FIGURES/1>
- Derynck, R., Akhurst, R. J., & Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genetics*, 29(2), 117–129. <https://doi.org/10.1038/NG1001-117>
- Deying, W., Feng, G., Shumei, L., Hui, Z., Ming, L., & Hongqing, W. (2017). CAF-derived HGF promotes cell proliferation and drug resistance by up-regulating the c-Met/PI3K/Akt and GRP78 signalling in ovarian cancer cells. *Bioscience Reports*, 37(2), 20160470.
<https://doi.org/10.1042/BSR20160470>
- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2018). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2018 20:2, 20(2), 69–84.
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- Doolin, M. T., Smith, I. M., & Stroka, K. M. (2021). Fibroblast to myofibroblast transition is enhanced by increased cell density. *Molecular Biology of the Cell*, 32(22), ar41–ar41.
<https://doi.org/10.1091/MBC.E20-08-0536>
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 3(1), 11–22.
<https://doi.org/10.1038/NRC969>

- Du, B., & Shim, J. S. (2016). Targeting Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21070965>
- Du, F., Qiao, C., Li, X., Chen, Z., Liu, H., Wu, S., Hu, S., Qiu, Z., Qian, M., Tian, D., Wu, K., Fan, D., Nie, Y., & Xia, L. (2019). Forkhead box K2 promotes human colorectal cancer metastasis by upregulating ZEB1 and EGFR. *Theranostics*, 9(13), 3879–3902. <https://doi.org/10.7150/THNO.31716>
- Du, H., & Che, G. (2017). Genetic alterations and epigenetic alterations of cancer-associated fibroblasts. *Oncology Letters*, 13(1), 3–12. <https://doi.org/10.3892/OL.2016.5451>
- Dufort, C. C., DelGiorno, K. E., Carlson, M. A., Osgood, R. J., Zhao, C., Huang, Z., Thompson, C. B., Connor, R. J., Thanos, C. D., Scott Brockenbrough, J., Provenzano, P. P., Frost, G. I., Michael Shepard, H., & Hingorani, S. R. (2016). Interstitial Pressure in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Is Dominated by a Gel-Fluid Phase. *Biophysical Journal*, 110(9), 2106–2119. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2016.03.040>
- Duma, N., Santana-Davila, R., & Molina, J. R. (2019). Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 94(8), 1623–1640. <https://doi.org/10.1016/J.MAYOCP.2019.01.013>
- Dumont, N., Liu, B., Defilippis, R. A., Chang, H., Rabban, J. T., Karnezis, A. N., Tjoe, J. A., Marx, J., Parvin, B., & Tlsty, T. D. (2013). Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 15(3), 249–262. <https://doi.org/10.1593/NEO.121950>
- D'Urso, M., & Kurniawan, N. A. (2020). Mechanical and Physical Regulation of Fibroblast–Myofibroblast Transition: From Cellular Mechanoreponse to Tissue Pathology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 609653. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.609653/BIBTEX>
- Dwivedi, N., Shukla, N., Prathima, K. M., Das, M., & Dhar, S. K. (2023). Novel CAF-identifiers via transcriptomic and protein level analysis in HNSC patients. *Scientific Reports 2023 13:1*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40908-w>
- Eales, K. L., Hollinshead, K. E. R., & Tennant, D. A. (2016). Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis 2016 5:1*, 5(1), e190–e190. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.50>
- Eck, M. J., & Yun, C. H. (2010). Structural and mechanistic underpinnings of the differential drug sensitivity of EGFR mutations in non-small cell

- lung cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(3), 559–566. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2009.12.010>
- Eckert, M. A., Coscia, F., Chryplewicz, A., Chang, J. W., Hernandez, K. M., Pan, S., Tienda, S. M., Nahotko, D. A., Li, G., Blaženović, I., Lastra, R. R., Curtis, M., Yamada, S. D., Perets, R., McGregor, S. M., Andrade, J., Fiehn, O., Moellering, R. E., Mann, M., & Lengyel, E. (2019). Proteomics reveals NNMT as a master metabolic regulator of cancer-associated fibroblasts. *Nature*, 569(7758), 723–728. <https://doi.org/10.1038/S41586-019-1173-8>
- Ehebauer, F., Ghavampour, S., & Kraus, D. (2020). Glucose availability regulates nicotinamide N-methyltransferase expression in adipocytes. *Life Sciences*, 248, 117474. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.117474>
- Elyada, E., Bolisetty, M., Laise, P., Flynn, W. F., Courtois, E. T., Burkhart, R. A., Teinor, J. A., Belleau, P., Biffi, G., Lucito, M. S., Sivajothi, S., Armstrong, T. D., Engle, D. D., Yu, K. H., Hao, Y., Wolfgang, C. L., Park, Y., Preall, J., Jaffee, E. M., ... Tuveson, D. A. (2019). Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discovery*, 9(8), 1102–1123. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0094>
- Emad, A., Ray, T., Jensen, T. W., Parat, M., Natrajan, R., Sinha, S., & Ray, P. S. (2020). Superior breast cancer metastasis risk stratification using an epithelial-mesenchymal-amoeboid transition gene signature. *Breast Cancer Research : BCR*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S13058-020-01304-8>
- Engelman, J. A., & Jänne, P. A. (2008). Mechanisms of Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(10), 2895–2899. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2248>
- Engelman, J. A., Jänne, P. A., Mermel, C., Pearlberg, J., Mukohara, T., Fleet, C., Cichowski, K., Johnson, B. E., & Cantley, L. C. (2005). ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(10), 3788–3793. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0409773102>
- Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Joon, O. P., Lindeman, N., Gale, C. M., Zhao, X., Christensen, J., Kosaka, T., Holmes, A. J., Rogers, A. M., Cappuzzo, F., Mok, T., Lee, C., Johnson, B. E., Cantley, L. C., & Jänne, P. A. (2007). MET

- amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*, 316(5827), 1039–1043. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1141478/SUPPL_FILE/ENGELMAN_SOM_REVISED.PDF
- Erdogan, B., & Webb, D. J. (2017). Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. *Biochemical Society Transactions*, 45(1), 229. <https://doi.org/10.1042/BST20160387>
- Erion, D. M., Yonemitsu, S., Nie, Y., Nagai, Y., Gillum, M. P., Hsiao, J. J., Iwasaki, T., Stark, R., Weismann, D., Xing, X. Y., Murray, S. F., Bhanot, S., Monia, B. P., Horvath, T. L., Gao, Q., Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2009). SirT1 knockdown in liver decreases basal hepatic glucose production and increases hepatic insulin responsiveness in diabetic rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(27), 11288–11293. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0812931106/ASSET/3EA57123-9A54-4D62-AB4A-B2904C518EED/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ9990966940004.JPEG>
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics* 2007 8:4, 8(4), 286–298. <https://doi.org/10.1038/nrg2005>
- Fan, J., Krautkramer, K. A., Feldman, J. L., & Denu, J. M. (2015). Metabolic regulation of histone post-translational modifications. *ACS Chemical Biology*, 10(1), 95–108. https://doi.org/10.1021/CB500846U/ASSET/IMAGES/LARGE/CB-2014-00846U_0004.JPEG
- Fane, M., & Weeraratna, A. T. (2019). How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2019 20:2, 20(2), 89–106. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0222-9>
- Feron, O. (2009). Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*, 92(3), 329–333. <https://doi.org/10.1016/J.RADONC.2009.06.025>
- Ferrara, B., Pignatelli, C., Cossutta, M., Citro, A., Courty, J., & Piemonti, L. (2021). The Extracellular Matrix in Pancreatic Cancer: Description of a Complex Network and Promising Therapeutic Options. *Cancers*, 13(17). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13174442>
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer* 2003 3:6, 3(6), 453–458. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>
- Finocchiaro, G., Toschi, L., Gianoncelli, L., Baretti, M., & Santoro, A. (2015). Prognostic and predictive value of MET deregulation in non-

- small cell lung cancer. *Annals of Translational Medicine*, 3(6), 83.
<https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2305-5839.2015.03.43>
- Flier, J. S., Underhill, L. H., & Dvorak, H. F. (1986). Tumors: Wounds That Do Not Heal. *New England Journal of Medicine*, 315(26), 1650–1659.
<https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152606>
- Fontoura, J. C., Viezzer, C., dos Santos, F. G., Ligabue, R. A., Weinlich, R., Puga, R. D., Antonow, D., Severino, P., & Bonorino, C. (2020). Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Materials Science and Engineering: C*, 107, 110264. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.110264>
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., & Honjo, T. (2000). Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(7), 1027.
<https://doi.org/10.1084/JEM.192.7.1027>
- Friedberg, E. C., Aguilera, A., Gellert, M., Hanawalt, P. C., Hays, J. B., Lehmann, A. R., Lindahl, T., Lowndes, N., Sarasin, A., & Wood, R. D. (2006). DNA repair: From molecular mechanism to human disease. *DNA Repair*, 5(8), 986–996.
<https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2006.05.005>
- Fu, R., Han, C. F., Ni, T., Di, L., Liu, L. J., Lv, W. C., Bi, Y. R., Jiang, N., He, Y., Li, H. M., Wang, S., Xie, H., Chen, B. A., Wang, X. S., Weiss, S. J., Lu, T., Guo, Q. L., & Wu, Z. Q. (2019). A ZEB1/p53 signaling axis in stromal fibroblasts promotes mammary epithelial tumours. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-019-11278-7>
- Fukino, K., Shen, L., Matsumoto, S., Morrison, C. D., Mutter, G. L., & Eng, C. (2004). Combined total genome loss of heterozygosity scan of breast cancer stroma and epithelium reveals multiplicity of stromal targets. *Cancer Research*, 64(20), 7231–7236.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2866>
- Furlan, A., Kherrouche, Z., Montagne, R., Copin, M. C., & Tulasne, D. (2014). Thirty years of research on met receptor to move a biomarker from bench to bedside. *Cancer Research*, 74(23), 6737–6744.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1932>
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J. F., Harrington, K., & Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and

- following cells. *Nature Cell Biology*, 9(12), 1392–1400.
<https://doi.org/10.1038/NCB1658>
- Gao, G. F., Parker, J. S., Reynolds, S. M., Silva, T. C., Wang, L. B., Zhou, W., Akbani, R., Bailey, M., Balu, S., Berman, B. P., Brooks, D., Chen, H., Cherniack, A. D., Demchok, J. A., Ding, L., Felau, I., Gaheen, S., Gerhard, D. S., Heiman, D. I., ... Noble, M. S. (2019). Before and After: Comparison of Legacy and Harmonized TCGA Genomic Data Commons' Data. *Cell Systems*, 9(1), 24–34.e10.
<https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.06.006>
- Gao, Y., Martin, N. I., & van Haren, M. J. (2021). Nicotinamide N-methyl transferase (NNMT): An emerging therapeutic target. *Drug Discovery Today*, 26(11), 2699–2706.
<https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2021.05.011>
- Garamszegi, N., Garamszegi, S. P., Samavarchi-Tehrani, P., Walford, E., Schneiderbauer, M. M., Wrana, J. L., & Scully, S. P. (2010). Extracellular matrix-induced transforming growth factor- β receptor signaling dynamics. *Oncogene* 2010 29:16, 29(16), 2368–2380.
<https://doi.org/10.1038/onc.2009.514>
- García-Palmero, I., Torres, S., Bartolomé, R. A., Peláez-García, A., Larriba, M. J., Lopez-Lucendo, M., Peña, C., Escudero-Paniagua, B., Muñoz, A., & Casal, J. I. (2016). Twist1-induced activation of human fibroblasts promotes matrix stiffness by upregulating palladin and collagen $\alpha 1(VI)$. *Oncogene*, 35(40), 5224–5236.
<https://doi.org/10.1038/ONC.2016.57>
- Garvey, C. M., Lau, R., Sanchez, A., Sun, R. X., Fong, E. J., Doche, M. E., Chen, O., Jusuf, A., Lenz, H. J., Larson, B., & Mumenthaler, S. M. (2020). Anti-EGFR Therapy Induces EGF Secretion by Cancer-Associated Fibroblasts to Confer Colorectal Cancer Chemoresistance. *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 1393, 12(6), 1393.
<https://doi.org/10.3390/CANCERS12061393>
- Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews. Cancer*, 4(11), 891–899.
<https://doi.org/10.1038/NRC1478>
- Gelsomino, F., Facchinetti, F., Haspinger, E. R., Garassino, M. C., Trusolino, L., De Braud, F., & Tiseo, M. (2014). Targeting the MET gene for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 89(2), 284–299.
<https://doi.org/10.1016/J.CRITREVNOC.2013.11.006>
- Giordano, T. J. (2014). The Cancer Genome Atlas Research Network: A Sight to Behold. *Endocrine Pathology* 2014 25:4, 25(4), 362–365.
<https://doi.org/10.1007/S12022-014-9345-4>

- Glabman, R. A., Choyke, P. L., & Sato, N. (2022). Cancer-Associated Fibroblasts: Tumorigenicity and Targeting for Cancer Therapy. *Cancers*, 14(16). <https://doi.org/10.3390/CANCERS14163906>
- Glentis, A., Oertle, P., Mariani, P., Chikina, A., El Marjou, F., Attieh, Y., Zaccarini, F., Lae, M., Loew, D., Dingli, F., Sirven, P., Schoumacher, M., Gurchenkov, B. G., Plodinec, M., & Vignjevic, D. M. (2017). Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-017-00985-8>
- Gonzalez, D. M., & Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signaling*, 7(344), re8. <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2005189>
- Graziani, V., Rodriguez-Hernandez, I., Maiques, O., & Sanz-Moreno, V. (2022). The amoeboid state as part of the epithelial-to-mesenchymal transition programme Cell Biology. 228 *Trends in Cell Biology*, 32(3). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.10.004>
- Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Harris, C. C., & Hollstein, M. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*, 54(18), 4855–4878. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8069852/>
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140(6), 883–899. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.01.025>
- Gu, T. L., Deng, X., Huang, F., Tucker, M., Crosby, K., Rimkunas, V., Wang, Y., Deng, G., Zhu, L., Tan, Z., Hu, Y., Wu, C., Nardone, J., MacNeill, J., Ren, J., Reeves, C., Innocenti, G., Norris, B., Yuan, J., ... Comb, M. J. (2011). Survey of Tyrosine Kinase Signaling Reveals ROS Kinase Fusions in Human Cholangiocarcinoma. *PLOS ONE*, 6(1), e15640. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0015640>
- Gumustekin, M., Kargi, A., Ulukus, C., Bulut, G., Gozukizil, : A, Atabey, N., & Oztup, I. (2012). Abbreviations HGF Hepatocyte Growth Factor NSCLC Non-small cell lung cancer MMP Matrix metalloproteinases TIMP Tissue inhibitor of metalloproteinases ECM Extracellular matrix TK Tyrosine kinase JM Juxtamembrane TM Transmembrane SNP Single nucleotide polymorphism IHC Immunohistochemistry. *Pathol. Oncol. Res*, 18, 209–218. <https://doi.org/10.1007/s12253-011-9430-7>
- Guo, A., Villén, J., Kornhauser, J., Lee, K. A., Stokes, M. P., Rikova, K., Possemato, A., Nardone, J., Innocenti, G., Wetzel, R., Wang, Y., MacNeill, J., Mitchell, J., Gygi, S. P., Rush, J., Polakiewicz, R. D., & Comb, M. J. (2008). Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

- the United States of America*, 105(2), 692–697.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0707270105>
- Hah, Y. S., Cho, H. Y., Jo, S. Y., Park, Y. S., Yoon, T. J., & Heo, E. P. (2019). Nicotinamide N-methyltransferase induces the proliferation and invasion of squamous cell carcinoma cells. *Oncology Reports*, 42(5), 1805–1814. <https://doi.org/10.3892/OR.2019.7315/HTML>
- Hahn, W. C., & Weinberg, R. A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2002 2:5, 2(5), 331–341. <https://doi.org/10.1038/nrc795>
- Haigis, M. C., & Guarente, L. P. (2006). Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes & Development*, 20(21), 2913–2921. <https://doi.org/10.1101/GAD.1467506>
- Ham, I. H., Oh, H. J., Jin, H., Bae, C. A., Jeon, S. M., Choi, K. S., Son, S. Y., Han, S. U., Brekken, R. A., Lee, D., & Hur, H. (2019). Targeting interleukin-6 as a strategy to overcome stroma-induced resistance to chemotherapy in gastric cancer. *Molecular Cancer*, 18(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12943-019-0972-8/FIGURES/6>
- Han, C., Liu, T., & Yin, R. (2020). Biomarkers for cancer-associated fibroblasts. *Biomarker Research*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S40364-020-00245-W/TABLES/2>
- Han, Y., Yu, Y., Miao, D., Zhou, M., Zhao, J., Shao, Z., Jin, R., Le, X., Li, W., & Xia, Y. (2024). Targeting MET in NSCLC: An Ever-Expanding Territory. *JTO Clinical and Research Reports*, 5(2), 100630. <https://doi.org/10.1016/j.jtocrr.2023.100630>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309–322. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2012.02.022>
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353–364. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80108-7)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Hanazawa, Y., Sato, K., Kuroiwa, N., Ogawa, M., Kuriyama, A., Asanagi, M., Kato, N., Moriyama, Y., Horitsu, K., & Fujimura, S. (1994). Characterization of nicotinamide methyltransferase in livers of mice bearing Ehrlich ascites tumors: preferential increase of activity. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for*

- Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 15(1), 7–16.
<https://doi.org/10.1159/000217868>
- Harney, A. S., Arwert, E. N., Entenberg, D., Wang, Y., Guo, P., Qian, B. Z., Oktay, M. H., Pollard, J. W., Jones, J. G., & Condeelis, J. S. (2015). Real-Time Imaging Reveals Local, Transient Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation Stimulated by TIE2hi Macrophage-Derived VEGFA. *Cancer Discovery*, 5(9), 932–943.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0012>
- Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2007). The DNA Damage Response: Ten Years After. *Molecular Cell*, 28(5), 739–745.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2007.11.015>
- Harrison, P. T., Vyse, S., & Huang, P. H. (2020). Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 61, 167–179.
<https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2019.09.015>
- Harvey I. Pass, D. P. C. D. H. J. J. D. M. G. V. S. A. T. T. (2010). *Principles and Practice of Lung Cancer*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Haws, S. A., Leech, C. M., & Denu, J. M. (2020). Metabolism and the Epigenome: A Dynamic Relationship. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(9), 731–747. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2020.04.002>
- Hayflick, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614–636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- Hecht, S. S. (1999). Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 91(14), 1194–1210.
<https://doi.org/10.1093/JNCI/91.14.1194>
- Heiden, M. G. V., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1160809>
- Henke, E., Nandigama, R., & Ergün, S. (2020). Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6.
<https://doi.org/10.3389/FMOLB.2019.00160>
- Hinz, B. (2012). Mechanical aspects of lung fibrosis: a spotlight on the myofibroblast. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3), 137–147. <https://doi.org/10.1513/PATS.201202-017AW>
- Hirsch, F. R., Scagliotti, G. V., Mulshine, J. L., Kwon, R., Curran, W. J., Wu, Y. L., & Paz-Ares, L. (2017). Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet (London, England)*, 389(10066), 299–311. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30958-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30958-8)

- Hollborn, M., Stathopoulos, C., Steffen, A., Wiedemann, P., Kohen, L., & Bringmann, A. (2007). Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(9), 4360–4367. <https://doi.org/10.1167/IOVS.06-1234>
- Hong, S., Moreno-Navarrete, J. M., Wei, X., Kikukawa, Y., Tzameli, I., Prasad, D., Lee, Y., Asara, J. M., Fernandez-Real, J. M., Maratos-Flier, E., & Pissios, P. (2015). Nicotinamide N-methyltransferase regulates hepatic nutrient metabolism through Sirt1 protein stabilization. *Nature Medicine*, 21(8), 887–894. <https://doi.org/10.1038/NM.3882>
- Hosaka, K., Yang, Y., Seki, T., Fischer, C., Dubey, O., Fredlund, E., Hartman, J., Religa, P., Morikawa, H., Ishii, Y., Sasahara, M., Larsson, O., Cossu, G., Cao, R., Lim, S., & Cao, Y. (2016). Pericyte-fibroblast transition promotes tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(38), E5618–E5627. https://doi.org/10.1073/PNAS.1608384113/SUPPL_FILE/PNAS.201608384SI.PDF
- Howington, J. A., Blum, M. G., Chang, A. C., Balekian, A. A., & Murthy, S. C. (2013). Treatment of Stage I and II Non-small Cell Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*, 143(5), e278S–e313S. <https://doi.org/10.1378/CHEST.12-2359>
- Hsu, M. L., & Naidoo, J. (2020). Principles of Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Thoracic Surgery Clinics*, 30(2), 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2020.01.009>
- Hsu, S., Kim, M., Hernandez, L., Grajales, V., Noonan, A., Anver, M., Davidson, B., & Annunziata, C. M. (2012). IKK- ϵ coordinates invasion and metastasis of ovarian cancer. *Cancer Research*, 72(21), 5494–5504. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3993/650309/AM/IKK-COORDINATES-INVASION-AND-METASTASIS-OF-OVARIAN>
- Hu, D., Zhuo, W., Gong, P., Ji, F., Zhang, X., Chen, Y., Mao, M., Ju, S., Pan, Y., & Shen, J. (2023). Biological differences between normal and cancer-associated fibroblasts in breast cancer. *Heliyon*, 9(9), e19803. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2023.E19803>
- Hu, H., Piotrowska, Z., Hare, P. J., Chen, H., Mulvey, H. E., Mayfield, A., Noeen, S., Kattermann, K., Greenberg, M., Williams, A., Riley, A. K., Wilson, J. J., Mao, Y. Q., Huang, R. P., Banwait, M. K., Ho, J., Crowther, G. S., Hariri, L. P., Heist, R. S., ... Engelman, J. A. (2021). Three subtypes of lung cancer fibroblasts define distinct therapeutic

- paradigms. *Cancer Cell*, 39(11), 1531. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2021.09.003>
- Hu, J., Tian, J., Zhu, S., Sun, L., Yu, J., Tian, H., Dong, Q., Luo, Q., Jiang, N., Niu, Y., & Shang, Z. (2017). Sox5 contributes to prostate cancer metastasis and is a master regulator of TGF- β -induced epithelial mesenchymal transition through controlling Twist1 expression. *British Journal of Cancer* 2018 118:1, 118(1), 88–97. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.372>
- Huang, Q., Chen, H., Yin, D., Wang, J., Wang, S., Yang, F., Li, J., Mu, T., Li, J., Zhao, J., Yin, R., Li, W., Qiu, M., Zhang, E., & Li, X. (2024). Multi-omics analysis reveals NNMT as a master metabolic regulator of metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Npj Precision Oncology* 2024 8:1, 8(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41698-024-00509-w>
- Huang, R. Y. J., Guilford, P., & Thiery, J. P. (2012). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 19), 4417–4422. <https://doi.org/10.1242/JCS.099697>
- Huang, X., Gan, G., Wang, X., Xu, T., & Xie, W. (2019). The HGF-MET axis coordinates liver cancer metabolism and autophagy for chemotherapeutic resistance. *Autophagy*, 15(7), 1258–1279. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1580105>
- Hughes, V. S., & Siemann, D. W. (2018). Have Clinical Trials Properly Assessed c-Met Inhibitors? *Trends in Cancer*, 4(2), 94–97. <https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2017.11.009>
- Hyman, D. M., Puzanov, I., Subbiah, V., Faris, J. E., Chau, I., Blay, J.-Y., Wolf, J., Raje, N. S., Diamond, E. L., Hollebecque, A., Gervais, R., Elez-Fernandez, M. E., Italiano, A., Hofheinz, R.-D., Hidalgo, M., Chan, E., Schuler, M., Lasserre, S. F., Makrutzki, M., ... Baselga, J. (2015). Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *The New England Journal of Medicine*, 373(8), 726–736. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1502309>
- Hynes, R. O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5957), 1216–1219. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1176009>
- Imamura, Y., Mukohara, T., Shimonono, Y., Funakoshi, Y., Chayahara, N., Toyoda, M., Kiyota, N., Takao, S., Kono, S., Nakatsura, T., & Minami, H. (2015). Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology Reports*, 33(4), 1837–1843. <https://doi.org/10.3892/OR.2015.3767>
- Imyanitov, E. N., Demidova, I. A., Gordiev, M. G., Filipenko, M. L., Kekeyeva, T. V., Moliaka, Y. K., Gervas, P. A., Kozhemyako, V. B.,

- Vodolazhskiy, D. I., Sergeyeva, L. A., Fattakhova, D. U., Iyevleva, A. G., Mitiushkina, N. V., Kuligina, E. S., Barinov, A. A., Mommaeva, M. S., Aleksakhina, S. N., Tsimafeyeu, I. V., & Tjulandin, S. A. (2016). Distribution of EGFR Mutations in 10,607 Russian Patients with Lung Cancer. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 20(4), 401–406. <https://doi.org/10.1007/S40291-016-0213-4/FIGURES/1>
- Inamura, K. (2017). Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Frontiers in Oncology*, 7(AUG), 193. <https://doi.org/10.3389/FONC.2017.00193>
- Inoue, C., Miki, Y., Saito, R., Hata, S., Abe, J., Sato, I., Okada, Y., & Sasano, H. (2019). PD-L1 Induction by Cancer-Associated Fibroblast-Derived Factors in Lung Adenocarcinoma Cells. *Cancers*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/CANCERS11091257>
- Iozzo, R. V., & Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 42, 11–55. <https://doi.org/10.1016/J.MATBIO.2015.02.003>
- Irvine, A. F., Waise, S., Green, E. W., Stuart, B., & Thomas, G. J. (2021). Characterising cancer-associated fibroblast heterogeneity in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 11(1), 3727. <https://doi.org/10.1038/S41598-021-81796-2>
- Itoh, G., Takagane, K., Fukushi, Y., Kuriyama, S., Umakoshi, M., Goto, A., Yanagihara, K., Yashiro, M., & Tanaka, M. (2022). Cancer-associated fibroblasts educate normal fibroblasts to facilitate cancer cell spreading and T-cell suppression. *Molecular Oncology*, 16(1), 166. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13077>
- Izumi, D., Ishimoto, T., Miyake, K., Sugihara, H., Eto, K., Sawayama, H., Yasuda, T., Kiyozumi, Y., Kaida, T., Kurashige, J., Imamura, Y., Hiyoshi, Y., Iwatsuki, M., Iwagami, S., Baba, Y., Sakamoto, Y., Miyamoto, Y., Yoshida, N., Watanabe, M., ... Baba, H. (2016). CXCL12/CXCR4 activation by cancer-associated fibroblasts promotes integrin β 1 clustering and invasiveness in gastric cancer. *International Journal of Cancer*, 138(5), 1207–1219. <https://doi.org/10.1002/IJC.29864>
- Jabbarzadeh Kaboli, P., Salimian, F., Aghapour, S., Xiang, S., Zhao, Q., Li, M., Wu, X., Du, F., Zhao, Y., Shen, J., Cho, C. H., & Xiao, Z. (2020). Akt-targeted therapy as a promising strategy to overcome drug resistance in breast cancer - A comprehensive review from chemotherapy to immunotherapy. *Pharmacological Research*, 156. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.104806>

- Jacobi, N., Seeboeck, R., Hofmann, E., Schweiger, H., Smolinska, V., Mohr, T., Boyer, A., Sommergruber, W., Lechner, P., Pichler-Huebschmann, C., önder, K., Hundsberger, H., Wiesner, C., & Eger, A. (2017). Organotypic three-dimensional cancer cell cultures mirror drug responses in vivo: lessons learned from the inhibition of EGFR signaling. *Oncotarget*, 8(64), 107423. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.22475>
- Jain, R. K., Martin, J. D., & Stylianopoulos, T. (2014). The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 16, 321–346. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOENG-071813-105259>
- Jakobsen, K. R., Demuth, C., Sorensen, B. S., & Nielsen, A. L. (2016). The role of epithelial to mesenchymal transition in resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 5(2), 172–182. <https://doi.org/10.21037/TLCR.2016.04.07>
- Jakowlew, S. B. (2006). Transforming growth factor- β in cancer and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 25:3, 25(3), 435–457. <https://doi.org/10.1007/S10555-006-9006-2>
- Jamal-Hanjani, M., Huebner, A., McGranahan, N., & Swanton, C. (2018). Defining the lethal subclone in metastatic lung cancer. *Annals of Oncology*, 29, viii702. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy424>
- Janku, F., Stewart, D. J., & Kurzrock, R. (2010). Targeted therapy in non-small-cell lung cancer is it becoming a reality? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(7), 401–414. <https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2010.64>
- Jänne, P. A., Engelman, J. A., & Johnson, B. E. (2005). Epidermal growth factor receptor mutations in non-small-cell lung cancer: Implications for treatment and tumor biology. *Journal of Clinical Oncology*, 23(14), 3227–3234. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.985>
- Jenkins, B. H., Buckingham, J. F., Hanley, C. J., & Thomas, G. J. (2022). Targeting cancer-associated fibroblasts: Challenges, opportunities and future directions. *Pharmacology & Therapeutics*, 240, 108231. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2022.108231>
- Jiang, J. G., Defrances, M. C., Machen, J., Johnson, C., & Zarnegar, R. (2000). The repressive function of AP2 transcription factor on the hepatocyte growth factor gene promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(3), 882–886. <https://doi.org/10.1006/BBRC.2000.2848>
- Jiang, L., Gonda, T. A., Gamble, M. V., Salas, M., Seshan, V., Tu, S., Twaddell, W. S., Hegyi, P., Lazar, G., Steele, I., Varro, A., Wang, T. C., & Tycko, B. (2008). Global Hypomethylation of Genomic DNA in

- Cancer-Associated Myofibroblasts. *Cancer Research*, 68(23), 9900–9908. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1319>
- Jiffar, T., Yilmaz, T., Lee, J., Miller, Y., Feng, L., El-Naggar, A., & Kupferman, M. E. (2017). Brain derived neurotrophic factor (BDNF) coordinates lympho-vascular metastasis through a fibroblast-governed paracrine axis in the tumor microenvironment. *Cancer Cell & Microenvironment*, 4(2). <https://doi.org/10.14800/CCM.1566>
- Johansson, A. C., Ansell, A., Jerhammar, F., Lindh, M. B., Grénman, R., Munck-Wikland, E., Östman, A., & Roberg, K. (2012). Cancer-associated fibroblasts induce matrix metalloproteinase-mediated cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Molecular Cancer Research*, 10(9), 1158–1168. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0030/79979/AM/CANCER-ASSOCIATED-FIBROBLASTS-INDUCE-MATRIX>
- Jones, G. S., & Baldwin, D. R. (2018). Recent advances in the management of lung cancer. *Clinical Medicine*, 18(Suppl 2), s41–s46. <https://doi.org/10.7861/CLINMEDICINE.18-2-S41>
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The Epigenomics of Cancer. *Cell*, 128(4), 683–692. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.01.029>
- Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & Development*, 23(5), 537–548. <https://doi.org/10.1101/GAD.1756509>
- Jong, I. Y., Li, X. Y., Ota, I., Fearon, E. R., & Weiss, S. J. (2005). Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11740–11748. <https://doi.org/10.1074/JBC.M413878200>
- Jouppila-Mättö, A., Tuhkanen, H., Soini, Y., Pukkila, M., Närkiö-Mäkelä, M., Sironen, R., Virtanen, I., Mannermaa, A., & Kosma, V. M. (2011). Transcription factor snail1 expression and poor survival in pharyngeal squamous cell carcinoma. *Histology and Histopathology*, 26(4), 443–449. <https://doi.org/10.14670/HH-26.443>
- Joyce, J. A., & Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, 9(4), 239–252. <https://doi.org/10.1038/NRC2618>
- Junttila, M. R., & Evan, G. I. (2009). p53 — a Jack of all trades but master of none. *Nature Reviews Cancer* 2009 9:11, 9(11), 821–829. <https://doi.org/10.1038/nrc2728>
- Kaelin, W. G., & McKnight, S. L. (2013). Influence of Metabolism on Epigenetics and Disease. *Cell*, 153(1), 56–69. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.03.004>

- Kaimori, A., Potter, J., Kaimori, J. Y., Wang, C., Mezey, E., & Koteish, A. (2007). Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(30), 22089–22101. <https://doi.org/10.1074/JBC.M700998200>
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2016 16:9, 16(9), 582–598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(5), 392–401. <https://doi.org/10.1038/NRC1877>
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science : AMS*, 14(4), 910. <https://doi.org/10.5114/AOMS.2016.63743>
- Karnoub, A. E., & Weinberg, R. A. (2007). Chemokine Networks and Breast Cancer Metastasis. *Breast Disease*, 26(1), 75–85. <https://doi.org/10.3233/BD-2007-26107>
- Karnoub, A. E., & Weinberg, R. A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008 9:7, 9(7), 517–531. <https://doi.org/10.1038/nrm2438>
- Kaur, A., Ecker, B. L., Douglass, S. M., Kugel, C. H., Webster, M. R., Almeida, F. V., Somasundaram, R., Hayden, J., Ban, E., Ahmadzadeh, H., Franco-Barraza, J., Shah, N., Mellis, I. A., Keeney, F., Kossenkov, A., Tang, H. Y., Yin, X., Liu, Q., Xu, X., ... Weeraratna, A. T. (2019). Remodeling of the Collagen Matrix in Aging Skin Promotes Melanoma Metastasis and Affects Immune Cell Motility. *Cancer Discovery*, 9(1), 64–81. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0193>
- Kay, E. J., Paterson, K., Riero-Domingo, C., Sumpton, D., Däbritz, J. H. M., Tardito, S., Boldrini, C., Hernandez-Fernaud, J. R., Athineos, D., Dhayade, S., Stepanova, E., Gjerga, E., Neilson, L. J., Lilla, S., Hedley, A., Koulouras, G., McGregor, G., Jamieson, C., Johnson, R. M., ... Zanivan, S. (2022). Cancer-associated fibroblasts require proline synthesis by PYCR1 for the deposition of pro-tumorigenic extracellular matrix. *Nature Metabolism* 2022 4:6, 4(6), 693–710. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00582-0>
- Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2008). PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. <http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Immunol.26.021607.090331>, 26,

- 677–704.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.26.021607.090331>
- Kennedy, K. M., & Dewhirst, M. W. (2009). Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Http://Dx.Doi.Org/10.2217/Fon.09.145*, 6(1), 127–148.
<https://doi.org/10.2217/FON.09.145>
- Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1), 52–67.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.03.015>
- Kinno, T., Tsuta, K., Shiraishi, K., Mizukami, T., Suzuki, M., Yoshida, A., Suzuki, K., Asamura, H., Furuta, K., Kohno, T., & Kushima, R. (2014). Clinicopathological features of nonsmall cell lung carcinomas with BRAF mutations. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 25(1), 138–142.
<https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDT495>
- Klingberg, F., Hinz, B., & White, E. S. (2013). The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of Pathology*, 229(2), 298. <https://doi.org/10.1002/PATH.4104>
- Kobayashi, H., Enomoto, A., Woods, S. L., Burt, A. D., Takahashi, M., & Worthley, D. L. (2019). Cancer-associated fibroblasts in gastrointestinal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(5), 282–295. <https://doi.org/10.1038/S41575-019-0115-0>
- Koliarakis, V., Prados, A., Armaka, M., & Kollias, G. (2020). The mesenchymal context in inflammation, immunity and cancer. *Nature Immunology*, 21(9), 974–982. <https://doi.org/10.1038/S41590-020-0741-2>
- Koulouris, A., Tsagkaris, C., Corriero, A. C., Metro, G., & Mountzios, G. (2022). Resistance to TKIs in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: From Mechanisms to New Therapeutic Strategies. *Cancers* 2022, Vol. 14, Page 3337, 14(14), 3337.
<https://doi.org/10.3390/CANCERS14143337>
- Koundouros, N., & Poulogiannis, G. (2020). Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *British Journal of Cancer*, 122(1), 4–22.
<https://doi.org/10.1038/S41416-019-0650-Z>
- Kumar, A., Golani, A., & Kumar, L. D. (2020). EMT in breast cancer metastasis: An interplay of microRNAs, signaling pathways and circulating tumor cells. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 25(5), 979–1010. <https://doi.org/10.2741/4844/4844/FIG3.JPG>
- Kumari, S., Sharma, S., Advani, D., Khosla, A., Kumar, P., & Ambasta, R. K. (2022). Unboxing the molecular modalities of mutagens in cancer.

- Environmental Science and Pollution Research International*, 29(41), 62111. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-16726-W>
- Kurose, K., Gilley, K., Matsumoto, S., Watson, P. H., Zhou, X. P., & Eng, C. (2002). Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nature Genetics*, 32(3), 355–357. <https://doi.org/10.1038/NG1013>
- Kuzet, S. E., & Gaggioli, C. (2016). Fibroblast activation in cancer: when seed fertilizes soil. *Cell and Tissue Research*, 365(3), 607–619. <https://doi.org/10.1007/S00441-016-2467-X>
- Lababede, O., & Meziane, M. A. (2018). The Eighth Edition of TNM Staging of Lung Cancer: Reference Chart and Diagrams. *The Oncologist*, 23(7), 844. <https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.2017-0659>
- Lambrechts, D., Wauters, E., Boeckx, B., Aibar, S., Nittner, D., Burton, O., Bassez, A., Decaluwé, H., Pircher, A., Van den Eynde, K., Weynand, B., Verbeken, E., De Leyn, P., Liston, A., Vansteenkiste, J., Carmeliet, P., Aerts, S., & Thienpont, B. (2018). Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment. *Nature Medicine*, 24(8), 1277–1289. <https://doi.org/10.1038/S41591-018-0096-5>
- Lamouille, S., Connolly, E., Smyth, J. W., Akhurst, R. J., & Derynck, R. (2012). TGF- β -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 5), 1259–1273. <https://doi.org/10.1242/JCS.095299>
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(3), 178–196. <https://doi.org/10.1038/NRM3758>
- Landau, M., & Ben-Tal, N. (2008). Dynamic equilibrium between multiple active and inactive conformations explains regulation and oncogenic mutations in ErbB receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1785(1), 12–31. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2007.08.001>
- Lane, D. P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature* 1992 358:6381, 358(6381), 15–16. <https://doi.org/10.1038/358015a0>
- Langer, C. J., Besse, B., Gualberto, A., Brambilla, E., & Soria, J. C. (2010). The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(36), 5311–5320. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.8126>
- LATIMER, K. M., & MOTT, T. F. (2015). Lung Cancer: Diagnosis, Treatment Principles, and Screening. *American Family Physician*, 91(4), 250–256. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2015/0215/p250.html>

- Lavie, D., Ben-Shmuel, A., Erez, N., & Scherz-Shouval, R. (2022). Cancer-associated fibroblasts in the single-cell era. *Nature Cancer* 2022 3:7, 3(7), 793–807. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00411-z>
- Leask, A. (2020). A centralized communication network: Recent insights into the role of the cancer associated fibroblast in the development of drug resistance in tumors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 101, 111–114. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2019.10.016>
- LeBleu, V. S., & Kalluri, R. (2018). A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Disease Models & Mechanisms*, 11(4). <https://doi.org/10.1242/DMM.029447>
- Lee, A. F., Chen, M. C., Chen, C. J., Yang, C. J., Huang, M. S., & Liu, Y. P. (2017). Reverse epithelial-mesenchymal transition contributes to the regain of drug sensitivity in tyrosine kinase inhibitor-resistant non-small cell lung cancer cells. *PloS One*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0180383>
- Lee, J. K., Lee, J., Kim, S., Kim, S., Youk, J., Park, S., An, Y., Keam, B., Kim, D. W., Heo, D. S., Kim, Y. T., Kim, J. S., Kim, S. H., Lee, J. S., Lee, S. H., Park, K., Ku, J. L., Jeon, Y. K., Chung, D. H., ... Ju, Y. S. (2017). ClonalHistory & genetic predictors of transformation into small-cell carcinomas from lung adenocarcinomas. *Journal of Clinical Oncology*, 35(26), 3065–3074. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.9096>
- Lemjabbar-Alaoui, H., Hassan, O. U. I., Yang, Y. W., & Buchanan, P. (2015). Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1856(2), 189–210. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2015.08.002>
- Leonetti, A., Sharma, S., Minari, R., Perego, P., Giovannetti, E., & Tiseo, M. (2019). Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 2019 121:9, 121(9), 725–737. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0573-8>
- Li, C., & Kuemmerle, J. F. (2014). The mechanisms that mediate the development of fibrosis in patients with Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(7), 1250. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000043>
- Li, H., Courtois, E. T., Sengupta, D., Tan, Y., Chen, K. H., Goh, J. J. L., Kong, S. L., Chua, C., Hon, L. K., Tan, W. S., Wong, M., Choi, P. J., Wee, L. J. K., Hillmer, A. M., Tan, I. B., Robson, P., & Prabhakar, S. (2017). Reference component analysis of single-cell transcriptomes elucidates cellular heterogeneity in human colorectal tumors. *Nature Genetics*, 49(5), 708–718. <https://doi.org/10.1038/NG.3818>

- Li, J., Jia, Z., Kong, J., Zhang, F., Fang, S., Li, X., Li, W., Yang, X., Luo, Y., Lin, B., & Liu, T. (2016). Carcinoma-Associated Fibroblasts Lead the Invasion of Salivary Gland Adenoid Cystic Carcinoma Cells by Creating an Invasive Track. *PLOS ONE*, *11*(3), e0150247. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0150247>
- Li, S., Qiao, L., Yang, Z., & He, C. (2018). Prognostic value of Nicotinamide N-methyltransferase expression in patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Physiology*, *9*(OCT), 406698. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.01407/BIBTEX>
- Li, Xiao Yu, Pi, Y. N., Chen, Y., Zhu, Q., & Xia, B. R. (2022). Nicotinamide N-Methyltransferase: A Promising Biomarker and Target for Human Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*, *12*, 894744. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.894744/BIBTEX>
- Li, Xin Yu, Zhan, X. R., Liu, X. M., & Wang, X. C. (2011). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB in the differentiation of pancreatic ductal cells into islet β -cells mediated by hepatocyte growth factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *404*(2), 711–716. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2010.12.048>
- Li, Zhenzhen, Sun, C., & Qin, Z. (2021). Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts and its effect on cancer cell reprogramming. *Theranostics*, *11*(17), 8322. <https://doi.org/10.7150/THNO.62378>
- Li, Zhi, & Yin, P. (2023). Tumor microenvironment diversity and plasticity in cancer multidrug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1878*(6), 188997. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2023.188997>
- Liang, G., Li, Y., Lin, Y., Yang, X., Yang, J., Hu, S., & Liu, A. (2023). Nicotinamide N-methyltransferase and liver diseases. *Genes & Diseases*, *10*(5), 1883–1893. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.03.019>
- Liang, L., Zeng, M., Pan, H., Liu, H., & He, Y. (2018). Nicotinamide N-methyltransferase promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells by activating transforming growth factor- β 1 expression. *Oncology Letters*, *15*(4), 4592. <https://doi.org/10.3892/OL.2018.7885>
- Liao, Z., Tan, Z. W., Zhu, P., & Tan, N. S. (2019). Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment – Accomplices in tumor malignancy. *Cellular Immunology*, *343*, 103729. <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2017.12.003>
- Lindsey, S., & Langhans, S. A. (2014). Crosstalk of oncogenic signaling pathways during epithelial-mesenchymal transition. *Frontiers in*

- Oncology*, 4(NOV), 358.
<https://doi.org/10.3389/FONC.2014.00358/BIBTEX>
- Liu, F., Song, S., Yi, Z., Zhang, M., Li, J., Yang, F., Yin, H., Yu, X., Guan, C., Liu, Y., Liu, Z., Wang, J., & Zhu, D. (2017). HGF induces EMT in non-small-cell lung cancer through the hBVR pathway. *European Journal of Pharmacology*, 811, 180–190.
<https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2017.05.040>
- Liu, K. Y., Mistry, R. J., Aguirre, C. A., Fasouli, E. S., Thomas, M. G., Klamt, F., Ramsden, D. B., & Parsons, R. B. (2015). Nicotinamide N-methyltransferase increases complex I activity in SH-SY5Y cells via sirtuin 3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 467(3), 491–496. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.10.023>
- Liu, W., Zhu, M., Li, X., Er, L., & Li, S. (2023). NNMT Is an Immune-Related Prognostic Biomarker That Modulates the Tumor Microenvironment in Pan-Cancer. *Disease Markers*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/9226712>
- Liu, Y., Lai, M., Li, S., Wang, Y., Feng, F., Zhang, T., Tong, L., Zhang, M., Chen, H., Chen, Y., Song, P., Li, Y., Bai, G., Ning, Y., Tang, H., Fang, Y., Chen, Y., Lu, X., Geng, M., ... Ding, J. (2022). LS-106, a novel EGFR inhibitor targeting C797S, exhibits antitumor activities both in vitro and in vivo. *Cancer Science*, 113(2), 709–720. <https://doi.org/10.1111/CAS.15229>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.05.039>
- Losanno, T., Rossi, A., Maione, P., Napolitano, A., & Gridelli, C. (2016). Anti-EGFR and antiangiogenic monoclonal antibodies in metastatic non-small-cell lung cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 16(6), 747–758. <https://doi.org/10.1517/14712598.2016.1163333>
- Lowe, S. W., Cepero, E., & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004 432:7015, 432(7015), 307–315. <https://doi.org/10.1038/nature03098>
- Lu, C., & Thompson, C. B. (2012). Metabolic regulation of epigenetics. *Cell Metabolism*, 16(1), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.001>
- Lu, P., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology*, 196(4), 395–406. <https://doi.org/10.1083/JCB.201102147>
- Lu, S. C. (2000). S-Adenosylmethionine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32(4), 391–395. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00139-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00139-9)

- Lu, S., Ke, S., Wang, C., Xu, Y., Li, Z., Song, K., Bai, M., Zhou, M., Yu, H., Yin, B., Li, X., Feng, Z., Hua, Y., Pan, S., Jiang, H., Li, L., Wu, Y., & Ma, Y. (2022). NNMT promotes the progression of intrahepatic cholangiocarcinoma by regulating aerobic glycolysis via the EGFR-STAT3 axis. *Oncogenesis* 2022 11:1, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41389-022-00415-5>
- Lu, X. M., & Long, H. (2018). Nicotinamide N-methyltransferase as a potential marker for cancer Minireview. *Neoplasma*, 65. https://doi.org/10.4149/neo_2018_171024N680
- Luo, H., Xia, X., Huang, L. Bin, An, H., Cao, M., Kim, G. D., Chen, H. N., Zhang, W. H., Shu, Y., Kong, X., Ren, Z., Li, P. H., Liu, Y., Tang, H., Sun, R., Li, C., Bai, B., Jia, W., Liu, Y., ... Xu, H. (2022). Pan-cancer single-cell analysis reveals the heterogeneity and plasticity of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34395-2>
- Ma, B., Li, F., & Ma, B. (2023). Down-regulation of COL1A1 inhibits tumor-associated fibroblast activation and mediates matrix remodeling in the tumor microenvironment of breast cancer. *Open Life Sciences*, 18(1). <https://doi.org/10.1515/BIOL-2022-0776>
- Majem, B., Nadal, E., & Muñoz-Pinedo, C. (2020). Exploiting metabolic vulnerabilities of Non small cell lung carcinoma. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 98, 54–62. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2019.06.004>
- Majety, M., Pradel, L. P., Gies, M., & Ries, C. H. (2015). Fibroblasts Influence Survival and Therapeutic Response in a 3D Co-Culture Model. *PLOS ONE*, 10(6), e0127948. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0127948>
- Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., & Allavena, P. (2017). Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 14(7), 399–416. <https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2016.217>
- Marsh, T., Pietras, K., & McAllister, S. S. (2013). Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832(7), 1070. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2012.10.013>
- Masugi, Y. (2022). The Desmoplastic Stroma of Pancreatic Cancer: Multilayered Levels of Heterogeneity, Clinical Significance, and Therapeutic Opportunities. *Cancers*, 14(13). <https://doi.org/10.3390/CANCERS14133293>
- Melissaridou, S., Wiechec, E., Magan, M., Jain, M. V., Chung, M. K., Farnebo, L., & Roberg, K. (2019). The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and

- neck cancer. *Cancer Cell International*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12935-019-0733-1>
- Melzer, C., von der Ohe, J., Hass, R., & Ungefroren, H. (2017). TGF- β -Dependent Growth Arrest and Cell Migration in Benign and Malignant Breast Epithelial Cells Are Antagonistically Controlled by Rac1 and Rac1b. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7). <https://doi.org/10.3390/IJMS18071574>
- Mestre-Farrera, A., Bruch-Oms, M., Peña, R., Rodríguez-Morato, J., Alba-Castellon, L., Comerma, L., Quintela-Fandino, M., Duñach, M., Baulida, J., Pozo, O. J., & de Herreros, A. G. (2021). Glutamine-Directed Migration of Cancer-Activated Fibroblasts Facilitates Epithelial Tumor Invasion. *Cancer Research*, 81(2), 438–451. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0622>
- Mhaidly, R., & Mechta-Grigoriou, F. (2021). Role of cancer-associated fibroblast subpopulations in immune infiltration, as a new means of treatment in cancer. *Immunological Reviews*, 302(1), 259–272. <https://doi.org/10.1111/IMR.12978>
- Milani, Z. H., Ramsden, D. B., & Parsons, R. B. (2013). Neuroprotective effects of nicotinamide N-methyltransferase and its metabolite 1-methylnicotinamide. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 27(9), 451–456. <https://doi.org/10.1002/JBT.21508>
- Millet, M., Bollmann, E., Ringuette Goulet, C., Bernard, G., Chabaud, S., Huot, M. É., Pouliot, F., Bolduc, S., & Bordeleau, F. (2022). Cancer-Associated Fibroblasts in a 3D Engineered Tissue Model Induce Tumor-like Matrix Stiffening and EMT Transition. *Cancers*, 14(15), 3810. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14153810/S1>
- Minari, R., Bordi, P., Del Re, M., Facchinetti, F., Mazzoni, F., Barbieri, F., Camerini, A., Comin, C. E., Gnetti, L., Azzoni, C., Nizzoli, R., Bortesi, B., Rofi, E., Petreni, P., Campanini, N., Rossi, G., Danesi, R., & Tiseo, M. (2018). Primary resistance to osimertinib due to SCLC transformation: Issue of T790M determination on liquid re-biopsy. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 115, 21–27. <https://doi.org/10.1016/J.LUNGCAN.2017.11.011>
- Mink, S. R., Vashistha, S., Zhang, W., Hodge, A., Agus, D. B., & Jain, A. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts derived from EGFR-TKI resistant tumors reverse EGFR pathway inhibition by EGFR-TKIs. *Molecular Cancer Research: MCR*, 8(6), 809. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0460>
- Mishra, P., Banerjee, D., & Ben-Baruch, A. (2011). Chemokines at the crossroads of tumor-fibroblast interactions that promote malignancy. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(1), 31–39. <https://doi.org/10.1189/JLB.0310182>
-

- Mishra, R., Haldar, S., Suchanti, S., & Bhowmick, N. A. (2019). Epigenetic changes in fibroblasts drive cancer metabolism and differentiation. *Endocrine-Related Cancer*, 26(12), R673. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0347>
- Mok, T. S., Wu, Y.-L., Ahn, M.-J., Garassino, M. C., Kim, H. R., Ramalingam, S. S., Shepherd, F. A., He, Y., Akamatsu, H., Theelen, W. S. M. E., Lee, C. K., Sebastian, M., Templeton, A., Mann, H., Marotti, M., Ghiorghiu, S., & Papadimitrakopoulou, V. A. (2017). Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M–Positive Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 376(7), 629–640. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1612674/SUPPL_FILE/NEJMOA1612674_DISCLOSURES.PDF
- Morandi, A., & Indraccolo, S. (2017). Linking metabolic reprogramming to therapy resistance in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1868(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2016.12.004>
- Morita, T., Kodama, Y., Shiokawa, M., Kuriyama, K., Marui, S., Kuwada, T., Sogabe, Y., Matsumori, T., Kakiuchi, N., Tomono, T., Mima, A., Ueda, T., Tsuda, M., Yamauchi, Y., Nishikawa, Y., Sakuma, Y., Ota, Y., Maruno, T., Uza, N., ... Seno, H. (2020). CXCR4 in Tumor Epithelial Cells Mediates Desmoplastic Reaction in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Research*, 80(19), 4058–4070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2745>
- Moustakas, A., & Heldin, C. H. (2009). The regulation of TGFβ signal transduction. *Development (Cambridge, England)*, 136(22), 3699–3714. <https://doi.org/10.1242/DEV.030338>
- Mueller, K. L., Madden, J. M., Zoratti, G. L., Kuperwasser, C., List, K., & Boerner, J. L. (2012). Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor mediates epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor resistance in triple-negative breast cancers through paracrine activation of Met. *Breast Cancer Research*, 14(4), 1–11. <https://doi.org/10.1186/BCR3224/FIGURES/4>
- Mukaida, N., Sasaki, S. I., & Baba, T. (2014). Chemokines in cancer development and progression and their potential as targeting molecules for cancer treatment. *Mediators of Inflammation*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/170381>
- Nagaraj, N. S., & Datta, P. K. (2010). Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 19(1), 77–91. <https://doi.org/10.1517/13543780903382609>
- Najafi, M., Farhood, B., & Mortezaee, K. (2019). Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *Journal of Cellular*

- Biochemistry*, 120(3), 2782–2790.
<https://doi.org/10.1002/JCB.27681>
- Nakamura, T., & Mizuno, S. (2010). The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 86(6), 588–610.
<https://doi.org/10.2183/PJAB.86.588>
- Nakamura, T., Nawa, K., & Ichihara, A. (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 122(3), 1450–1459. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)91253-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)91253-1)
- Nallasamy, P., Nimmakayala, R. K., Parte, S., Are, A. C., Batra, S. K., & Ponnusamy, M. P. (2022). Tumor microenvironment enriches the stemness features: the architectural event of therapy resistance and metastasis. *Molecular Cancer* 2022 21:1, 21(1), 1–25.
<https://doi.org/10.1186/S12943-022-01682-X>
- Neel, J.-C., Humbert, L., & Lebrun, J.-J. (2012). The Dual Role of TGF β in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *ISRN Molecular Biology*, 2012, 1–28. <https://doi.org/10.5402/2012/381428>
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010 11:3, 11(3), 220–228.
<https://doi.org/10.1038/nrm2858>
- Neuwirt, H., Bouchal, J., Kharaishvili, G., Ploner, C., Jöhrer, K., Pitterl, F., Weber, A., Klocker, H., & Eder, I. E. (2020). Cancer-associated fibroblasts promote prostate tumor growth and progression through upregulation of cholesterol and steroid biosynthesis. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 1–18.
<https://doi.org/10.1186/S12964-019-0505-5/FIGURES/7>
- Nia, H. T., Munn, L. L., & Jain, R. K. (2020). Physical traits of cancer. *Science*, 370(6516).
https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAZ0868/ASSET/5D0A72D9-30DE-4D81-96F5-8D7E0B0B58B2/ASSETS/GRAPHIC/370_AAZ0868_F3.JPEG
- Niederst, M. J., Hu, H., Mulvey, H. E., Lockerman, E. L., Garcia, A. R., Piotrowska, Z., Sequist, L. V., & Engelman, J. A. (2015). The allelic context of the C797S mutation acquired upon treatment with third-generation EGFR inhibitors impacts sensitivity to subsequent treatment strategies. *Clinical Cancer Research*, 21(17), 3924–3933.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0560/176568/AM/THE-ALLELIC-CONTEXT-OF-THE-C797S-MUTATION-ACQUIRED>

- Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A., & Thiery, J. P. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.06.028>
- Ning, X., Zhang, H., Wang, C., & Song, X. (2018). Exosomes Released by Gastric Cancer Cells Induce Transition of Pericytes Into Cancer-Associated Fibroblasts. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 24, 2350. <https://doi.org/10.12659/MSM.906641>
- Nissen, N. I., Karsdal, M., & Willumsen, N. (2019). Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13046-019-1110-6/TABLES/1>
- Noonan, K. L., Ho, C., Laskin, J., & Murray, N. (2015). The influence of the evolution of first-line chemotherapy on steadily improving survival in advanced non-small-cell lung cancer clinical trials. In *Journal of Thoracic Oncology* (Vol. 10, Number 11). <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000667>
- Nurmik, M., Ullmann, P., Rodriguez, F., Haan, S., & Letellier, E. (2020). In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *International Journal of Cancer*, 146(4), 895. <https://doi.org/10.1002/IJC.32193>
- Öhlund, D., Handly-Santana, A., Biffi, G., Elyada, E., Almeida, A. S., Ponz-Sarvise, M., Corbo, V., Oni, T. E., Hearn, S. A., Lee, E. J., Chio, I. I. C., Hwang, C. Il, Tiriack, H., Baker, L. A., Engle, D. D., Feig, C., Kultti, A., Egeblad, M., Fearon, D. T., ... Tuveson, D. A. (2017). Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(3), 579. <https://doi.org/10.1084/JEM.20162024>
- Ohta, Y., Fujii, M., Takahashi, S., Takano, A., Nanki, K., Matano, M., Hanyu, H., Saito, M., Shimokawa, M., Nishikori, S., Hatano, Y., Ishii, R., Sawada, K., Machinaga, A., Ikeda, W., Imamura, T., & Sato, T. (2022). Cell–matrix interface regulates dormancy in human colon cancer stem cells. *Nature* 2022 608:7924, 608(7924), 784–794. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05043-y>
- Orgaz, J. L., Pandya, P., Dalmeida, R., Karagiannis, P., Sanchez-Laorden, B., Viros, A., Albregues, J., Nestle, F. O., Ridley, A. J., Gaggioli, C., Marais, R., Karagiannis, S. N., & Sanz-Moreno, V. (2014). Diverse matrix metalloproteinase functions regulate cancer amoeboid migration. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS5255>
- Orr, B., Riddick, A. C. P., Stewart, G. D., Anderson, R. A., Franco, O. E., Hayward, S. W., & Thomson, A. A. (2012). Identification of stromally

- expressed molecules in the prostate by tag-profiling of cancer-associated fibroblasts, normal fibroblasts and fetal prostate. *Oncogene*, 31(9), 1130–1142. <https://doi.org/10.1038/ONC.2011.312>
- Ou, S. H. I., Tan, J., Yen, Y., & Soo, R. A. (2012). ROS1 as a “druggable” receptor tyrosine kinase: lessons learned from inhibiting the ALK pathway. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 12(4), 447–456. <https://doi.org/10.1586/ERA.12.17>
- Palanichamy, K., Kanji, S., Gordon, N., Thirumoorthy, K., Jacob, J. R., Litzenberg, K. T., Patel, Di., & Chakravarti, A. (2017). NNMT silencing activates tumor suppressor PP2A, inactivates oncogenic STKs, and inhibits tumor forming ability. *Clinical Cancer Research*, 23(9), 2325–2334. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1323>
- Pandey, P., Khan, F., Upadhyay, T. K., Seungjoon, M., Park, M. N., & Kim, B. (2023). New insights about the PDGF/PDGFR signaling pathway as a promising target to develop cancer therapeutic strategies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 161, 114491. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2023.114491>
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 12(4), 252–264. <https://doi.org/10.1038/NRC3239>
- Park, K. C., & Richardson, D. R. (2020). The c-MET oncoprotein: Function, mechanisms of degradation and its targeting by novel anti-cancer agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1864(10), 129650. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2020.129650>
- Park, S. E., Noh, J. M., Kim, Y. J., Lee, H. S., Cho, J. H., Lim, S. W., Ahn, Y. C., Pyo, H., Choi, Y. La, Han, J., Sun, J. M., Lee, S. H., Ahn, J. S., Park, K., & Ahn, M. J. (2019). EGFR Mutation Is Associated with Short Progression-Free Survival in Patients with Stage III Non-squamous Cell Lung Cancer Treated with Concurrent Chemoradiotherapy. *Cancer Research and Treatment*, 51(2), 493–501. <https://doi.org/10.4143/CRT.2018.125>
- Parker, J. B., Valencia, C., Akas, D., Dilorio, S. E., Griffin, M. F., Longaker, M. T., & Wan, D. C. (2023). Understanding Fibroblast Heterogeneity in Form and Function. *Biomedicines*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/BIMEDICINES11082264>
- Parsons, R. B., & Facey, P. D. (2021). Nicotinamide N-Methyltransferase: An Emerging Protagonist in Cancer Macro(r)evolution. *Biomolecules* 2021, Vol. 11, Page 1418, 11(10), 1418. <https://doi.org/10.3390/BIM11101418>

- Pasquini, G., & Giaccone, G. (2018). C-MET inhibitors for advanced non-small cell lung cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 27(4), 363–375. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1462336>
- Passaro, A., Jänne, P. A., Mok, T., & Peters, S. (2021). Overcoming therapy resistance in EGFR-mutant lung cancer. *Nature Cancer* 2021 2:4, 2(4), 377–391. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00195-8>
- Passaro, A., Mok, T., Peters, S., Popat, S., Ahn, M. J., & de Marinis, F. (2021). Recent Advances on the Role of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in the Management of NSCLC With Uncommon, Non Exon 20 Insertions, EGFR Mutations. *Journal of Thoracic Oncology*, 16(5), 764–773. <https://doi.org/10.1016/J.JTHO.2020.12.002>
- Passiglia, F., Bironzo, P., Bertaglia, V., Listì, A., Garbo, E., & Scagliotti, G. V. (2022). Optimizing the clinical management of EGFR-mutant advanced non-small cell lung cancer: a literature review. *Translational Lung Cancer Research*, 11(5), 935–949. <https://doi.org/10.21037/TLCR-22-1/COIF>
- Peng, Q., Zhao, L., Hou, Y., Sun, Y., Wang, L., Luo, H., Peng, H., & Liu, M. (2013). Biological Characteristics and Genetic Heterogeneity between Carcinoma-Associated Fibroblasts and Their Paired Normal Fibroblasts in Human Breast Cancer. *PLOS ONE*, 8(4), e60321. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0060321>
- Penke, L. R., & Peters-Golden, M. (2019). Molecular determinants of mesenchymal cell activation in fibroproliferative diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 76(21), 4179–4201. <https://doi.org/10.1007/S00018-019-03212-3>
- Petersen, O. W., Nielsen, H. L., Gudjonsson, T., Villadsen, R., Rank, F., Niebuhr, E., Bissell, M. J., & Rønnov-Jessen, L. (2003). Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *The American Journal of Pathology*, 162(2), 391–402. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63834-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63834-5)
- Pignon, J. P., Tribodet, H., Scagliotti, G. V., Douillard, J. Y., Shepherd, F. A., Stephens, R. J., Dunant, A., Torri, V., Rosell, R., Seymour, L., Spiro, S. G., Rolland, E., Fossati, R., Aubert, D., Ding, K., Waller, D., & Le Chevalier, T. (2008). Lung adjuvant cisplatin evaluation: A pooled analysis by the LACE collaborative group. *Journal of Clinical Oncology*, 26(21), 3552–3559. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.9030>
- Ping, Q., Yan, R., Cheng, X., Wang, W., Zhong, Y., Hou, Z., Shi, Y., Wang, C., & Li, R. (2021). Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions. *Cancer Gene Therapy*, 28(9), 984–999. <https://doi.org/10.1038/S41417-021-00318-4>
- Pissios, P. (2017). Nicotinamide N-Methyltransferase: More Than a Vitamin B3 Clearance Enzyme. *Trends in Endocrinology and*

- Metabolism: TEM*, 28(5), 340–353.
<https://doi.org/10.1016/J.TEM.2017.02.004>
- Pozzi, V., Di Ruscio, G., Sartini, D., Campagna, R., Seta, R., Fulvi, P., Vici, A., Milanese, G., Brandoni, G., Galosi, A. B., Montironi, R., Cecati, M., & Emanuelli, M. (2018). Clinical performance and utility of a NNMT-based urine test for bladder cancer. *The International Journal of Biological Markers*, 33(1), 94–101.
<https://doi.org/10.5301/IJBM.5000311>
- Pu, Y., & Ji, Q. (2022). Tumor-Associated Macrophages Regulate PD-1/PD-L1 Immunosuppression. *Frontiers in Immunology*, 13, 874589.
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.874589/BIBTEX>
- Pulido, I., Ollosi, S., Aparisi, S., Becker, J. H., Aliena-Valero, A., Benet, M., Rodríguez, M. L., Lopez, A., Tamayo-Torres, E., Chulia-Peris, L., García-Cañaveras, J. C., Soucheray, M., Dalheim, A. V., Salom, J. B., Qiu, W., Kaja, S., Fernandez-Coronado, J. A., Alandes, S., Alcacer, J., ... Shimamura, T. (2020). Endothelin-1-Mediated Drug Resistance in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Cancer Research*, 80(19), 4224–4232. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0141>
- Qian, B. Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141(1), 39–51.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.03.014>
- Qin, B. M., Chen, X., De Zhu, J., & Pei, D. Q. (2005). Identification of EGFR kinase domain mutations among lung cancer patients in China: implication for targeted cancer therapy. *Cell Research*, 15(3), 212–217. <https://doi.org/10.1038/SJ.CR.7290289>
- Qin, T., Xiao, Y., Qian, W., Wang, X., Gong, M., Wang, Q., An, R., Han, L., Duan, W., Ma, Q., & Wang, Z. (2022). HGF/c-Met pathway facilitates the perineural invasion of pancreatic cancer by activating the mTOR/NGF axis. *Cell Death & Disease* 2022 13:4, 13(4), 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s41419-022-04799-5>
- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 19(11), 1423–1437.
<https://doi.org/10.1038/NM.3394>
- Rafehi, S., Valdes, Y. R., Bertrand, M., McGee, J., Préfontaine, M., Sugimoto, A., Dimattia, G. E., & Shepherd, T. G. (2016). TGFβ signaling regulates epithelial-mesenchymal plasticity in ovarian cancer ascites-derived spheroids. *Endocrine-Related Cancer*, 23(3), 147–159. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0383>
- Raj, S., Kesari, K. K., Kumar, A., Rath, B., Sharma, A., Gupta, P. K., Jha, S. K., Jha, N. K., Slama, P., Roychoudhury, S., & Kumar, D. (2022). Molecular mechanism(s) of regulation(s) of c-MET/HGF signaling in

- head and neck cancer. *Molecular Cancer*, 21(1).
<https://doi.org/10.1186/S12943-022-01503-1>
- Ramachandran, S., Verma, A. K., Dev, K., Goyal, Y., Bhatt, D., Alsahli, M. A., Rahmani, A. H., Almatroudi, A., Almatroodi, S. A., Alrumaihi, F., & Khan, N. A. (2021). Role of Cytokines and Chemokines in NSCLC Immune Navigation and Proliferation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5563746>
- Ramalingam, S. S., Yang, J. C. H., Lee, C. K., Kurata, T., Kim, D. W., John, T., Nogami, N., Ohe, Y., Mann, H., Rukazenzov, Y., Ghiorghiu, S., Stetson, D., Markovets, A., Barrett, J. C., Thress, K. S., & Jänne, P. A. (2018). Osimertinib As First-Line Treatment of EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(9), 841–849. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.7576>
- Rastogi, I., Rajanna, S., Webb, A., Chhabra, G., Foster, B., Webb, B., & Puri, N. (2016). Mechanism of c-Met and EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance through epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 477(4), 937. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.07.003>
- Raynaud, C. M., Hernandez, J., Llorca, F. P., Nuciforo, P., Mathieu, M. C., Commo, F., Delaloge, S., Sabatier, L., André, F., & Soria, J. C. (2010). DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer. *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*, 33(4), 341–345. <https://doi.org/10.1097/COC.0B013E3181B0C4C2>
- Reck, M., Carbone, D. P., Garassino, M., & Barlesi, F. (2021). Targeting KRAS in non-small-cell lung cancer: recent progress and new approaches. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 32(9), 1101–1110. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2021.06.001>
- Reguart, N., & Remon, J. (2015). Common EGFR-mutated subgroups (Del19/L858R) in advanced non-small-cell lung cancer: chasing better outcomes with tyrosine kinase inhibitors. *Http://Dx.Doi.Org/10.2217/Fon.15.15*, 11(8), 1245–1257. <https://doi.org/10.2217/FON.15.15>
- Rekhtman, N., Paik, P. K., Arcila, M. E., Tafe, L. J., Oxnard, G. R., Moreira, A. L., Travis, W. D., Zakowski, M. F., Kris, M. G., & Ladanyi, M. (2012). Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: Lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clinical Cancer Research*, 18(4), 1167–1176. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2109>

- Remsing Rix, L. L., Sumi, N. J., Hu, Q., Desai, B., Bryant, A. T., Li, X., Welsh, E. A., Fang, B., Kinose, F., Kuenzi, B. M., Chen, Y. A., Antonia, S. J., Lovly, C. M., Koomen, J. M., Haura, E. B., Marusyk, A., & Rix, U. (2022). IGF-binding proteins secreted by cancer-associated fibroblasts induce context-dependent drug sensitization of lung cancer cells. *Science Signaling*, 15(747). <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.ABJ5879>
- Rich, P. R., & Maréchal, A. (2010). The mitochondrial respiratory chain. *Essays in Biochemistry*, 47, 1–23. <https://doi.org/10.1042/BSE0470001>
- Rinn, J. L., Bondre, C., Gladstone, H. B., Brown, P. O., & Chang, H. Y. (2006). Anatomic Demarcation by Positional Variation in Fibroblast Gene Expression Programs. *PLOS Genetics*, 2(7), e119. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.0020119>
- Rivera, M. P., Mehta, A. C., & Wahidi, M. M. (2013). Establishing the Diagnosis of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*, 143(5), e142S-e165S. <https://doi.org/10.1378/CHEST.12-2353>
- Robert A. Weinberg, R. A. W. (2014). *The Biology of Cancer*. Garland Publishing Inc.
- Roberti, A., Fernández, A. F., & Fraga, M. F. (2021). Nicotinamide N-methyltransferase: At the crossroads between cellular metabolism and epigenetic regulation. *Molecular Metabolism*, 45, 101165. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2021.101165>
- Roberts, P. J., & Stinchcombe, T. E. (2013). KRAS mutation: should we test for it, and does it matter? *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(8), 1112–1121. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.0454>
- Rockey, D. C., Weymouth, N., & Shi, Z. (2013). Smooth Muscle α Actin (Acta2) and Myofibroblast Function during Hepatic Wound Healing. *PLoS ONE*, 8(10), 77166. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0077166>
- Ruano-Raviña, A., Provencio, M., Calvo De Juan, V., Carcereny, E., Moran, T., Rodriguez-Abreu, D., López-Castro, R., Cuadrado Albite, E., Guirado, M., Gómez González, L., Massutí, B., Ortega Granados, A. L., Blasco, A., Cobo, M., García-Campelo, R., Bosch, J., Trigo, J., Juan, Ó., Aguado De La Rosa, C., ... Cerezo, S. (2020). Lung cancer symptoms at diagnosis: results of a nationwide registry study. *ESMO Open*, 5(6), 1021. <https://doi.org/10.1136/ESMOOPEN-2020-001021>

- Sahadevan, P., & Allen, B. G. (2022). Isolation and culture of adult murine cardiac atrial and ventricular fibroblasts and myofibroblasts. *Methods*, 203, 187–195. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2021.04.004>
- Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D. G., Egeblad, M., Evans, R. M., Fearon, D., Greten, F. R., Hingorani, S. R., Hunter, T., Hynes, R. O., Jain, R. K., Janowitz, T., Jorgensen, C., Kimmelman, A. C., Kolonin, M. G., Maki, R. G., Powers, R. S., Puré, E., ... Werb, Z. (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nature Reviews. Cancer*, 20(3), 174–186. <https://doi.org/10.1038/S41568-019-0238-1>
- Saitoh, M. (2023). Transcriptional regulation of EMT transcription factors in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 97, 21–29. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2023.10.001>
- Salmon, H., Franciszkiwicz, K., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M. C., Validire, P., Trautmann, A., Mami-Chouaib, F., & Donnadieu, E. (2012). Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(3), 899–910. <https://doi.org/10.1172/JCI45817>
- Salvarani, N., Maguy, A., De Simone, S. A., Miragoli, M., Jousset, F., & Rohr, S. (2017). TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1) Plays a Pivotal Role in Cardiac Myofibroblast Arrhythmogenicity. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 10(5). <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.116.004567/-/DC1>
- Samimi, H., Sohi, A. N., Irani, S., Arefian, E., Mahdiannasser, M., Fallah, P., & Haghpahan, V. (2021). Alginate-based 3D cell culture technique to evaluate the half-maximal inhibitory concentration: an in vitro model of anticancer drug study for anaplastic thyroid carcinoma. *Thyroid Research*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S13044-021-00118-W/FIGURES/5>
- Samuel, M. S., Lopez, J. I., McGhee, E. J., Croft, D. R., Strachan, D., Timpson, P., Munro, J., Schröder, E., Zhou, J., Brunton, V. G., Barker, N., Clevers, H., Sansom, O. J., Anderson, K. I., Weaver, V. M., & Olson, M. F. (2011). Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and β -catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth. *Cancer Cell*, 19(6), 776–791. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2011.05.008>
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K. V., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Velculescu, V. E. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human

- cancers. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5670), 554.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1096502>
- Sangha, R., Price, J., & Butts, C. A. (2010). Adjuvant Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer: Current and Future Directions. *The Oncologist*, 15(8), 862–872.
<https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.2009-0186>
- Santi, A., Kugeratski, F. G., & Zanivan, S. (2018). Cancer Associated Fibroblasts: The Architects of Stroma Remodeling. *Proteomics*, 18(5–6). <https://doi.org/10.1002/PMIC.201700167>
- Santoni-Rugiu, E., Melchior, L. C., Urbanska, E. M., Jakobsen, J. N., De Stricker, K., Grauslund, M., & Sørensen, J. B. (2019). Intrinsic Resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Differences and Similarities with Acquired Resistance. *Cancers 2019, Vol. 11, Page 923*, 11(7), 923.
<https://doi.org/10.3390/CANCERS11070923>
- Sanz-Moreno, V., Gaggioli, C., Yeo, M., Albrengues, J., Wallberg, F., Viros, A., Hooper, S., Mitter, R., Féral, C. C., Cook, M., Larkin, J., Marais, R., Meneguzzi, G., Sahai, E., & Marshall, C. J. (2011). ROCK and JAK1 Signaling Cooperate to Control Actomyosin Contractility in Tumor Cells and Stroma. *Cancer Cell*, 20(2), 229–245.
<https://doi.org/10.1016/J.CCR.2011.06.018>
- Sartini, D., Muzzonigro, G., Milanese, G., Pozzi, V., Vici, A., Morganti, S., Rossi, V., Mazzucchelli, R., Montironi, R., & Emanuelli, M. (2013). Upregulation of tissue and urinary nicotinamide N-methyltransferase in bladder cancer: potential for the development of a urine-based diagnostic test. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 65(3), 473–483.
<https://doi.org/10.1007/S12013-012-9451-1>
- Sartini, D., Pozzi, V., Renzi, E., Morganti, S., Rocchetti, R., Rubini, C., Santarelli, A., Muzio, L. Lo, & Emanuelli, M. (2012). Analysis of tissue and salivary nicotinamide N-methyltransferase in oral squamous cell carcinoma: basis for the development of a noninvasive diagnostic test for early-stage disease. *Biological Chemistry*, 393(6), 505–511.
<https://doi.org/10.1515/HSZ-2012-0112>
- Sartini, D., Seta, R., Pozzi, V., Morganti, S., Rubini, C., Zizzi, A., Tomasetti, M., Santarelli, L., & Emanuelli, M. (2015). Role of nicotinamide N-methyltransferase in non-small cell lung cancer: in vitro effect of shRNA-mediated gene silencing on tumourigenicity. *Biological Chemistry*, 396(3), 225–234. <https://doi.org/10.1515/HSZ-2014-0231>
- Savas, P., Hughes, B., & Solomon, B. (2013). Targeted therapy in lung cancer: IPASS and beyond, keeping abreast of the explosion of targeted therapies for lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 5(SUPPL.5). <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2072-1439.2013.08.52>
-

- Scagliotti, G. V., Selvaggi, G., Novello, S., & Hirsch, F. R. (2004). The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(12 Pt 2). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-040007>
- Schalm, S. S., Dineen, T., Lim, S. M., Park, C. W., Hsieh, J., Woessner, R., Zhang, Z., Wilson, K., Eno, M., Wilson, D., Williams, B., Campbell, J., de Savi, C., Stevison, F., Utt, C., Guzi, T., Dorsch, M., Hoeflich, K., & Cho, B. C. (2020). 384P BLU-945, a highly potent and selective 4th generation EGFR TKI for the treatment of EGFR T790M/C797S resistant NSCLC. *Annals of Oncology*, 31, S1391. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2020.10.378>
- Schmid, K., Oehl, N., Wrba, F., Pirker, R., Pirker, C., & Filipits, M. (2009). EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases. *Clinical Cancer Research*, 15(14), 4554–4560. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0089/347152/P/EGFR-KRAS-BRAF-MUTATIONS-IN-PRIMARY-LUNG>
- Schwartz, A. G., & Cote, M. L. (2016). Epidemiology of lung cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 893, 21–41. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_2/TABLES/1
- Schwartz, A. G., Prysak, G. M., Bock, C. H., & Cote, M. L. (2007). The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis*, 28(3), 507–518. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGL253>
- Scott, E. N., Gocher, A. M., Workman, C. J., & Vignali, D. A. A. (2021). Regulatory T Cells: Barriers of Immune Infiltration Into the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 12, 702726. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.702726/BIBTEX>
- Sequist, L. V., Waltman, B. A., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A. B., Fidias, P., Bergethon, K., Shaw, A. T., Gettinger, S., Cosper, A. K., Akhavanfard, S., Heist, R. S., Temel, J., Christensen, J. G., Wain, J. C., Lynch, T. J., Vernovsky, K., Mark, E. J., Lanuti, M., ... Engelman, J. A. (2011). Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Science Translational Medicine*, 3(75), 75ra26. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3002003>
- Shan, T., Chen, S., Chen, X., Lin, W. R., Li, W., Ma, J., Wu, T., Ji, H., Li, Y., Cui, X., & Kang, Y. (2017). Prometastatic mechanisms of CAF-mediated EMT regulation in pancreatic cancer cells. *International Journal of Oncology*, 50(1), 121–128. <https://doi.org/10.3892/IJO.2016.3779>

- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2000 1:1, 1(1), 72–76. <https://doi.org/10.1038/35036093>
- Shen, M., Liu, X., Zhang, H., & Guo, S. W. (2016). Transforming growth factor β 1 signaling coincides with epithelial-mesenchymal transition and fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation in the development of adenomyosis in mice. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 31(2), 355–369. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEV314>
- Sherr, C. J., & McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2(2), 103–112. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00102-2)
- Shi, X., Young, C. D., Zhou, H., & Wang, X. (2020). Transforming Growth Factor- β Signaling in Fibrotic Diseases and Cancer-Associated Fibroblasts. *Biomolecules*, 10(12), 1–22. <https://doi.org/10.3390/BIOM10121666>
- Shinde, A. V., Humeres, C., & Frangogiannis, N. G. (2017). The role of α -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1863(1), 298–309. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2016.11.006>
- Shroff, G. S., de Groot, P. M., Papadimitrakopoulou, V. A., Truong, M. T., & Carter, B. W. (2018). Targeted Therapy and Immunotherapy in the Treatment of Non–Small Cell Lung Cancer. *Radiologic Clinics of North America*, 56(3), 485–495. <https://doi.org/10.1016/J.RCL.2018.01.012>
- Simanshu, D. K., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, 170(1), 17–33. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.06.009>
- Simithy, J., Sidoli, S., Yuan, Z. F., Coradin, M., Bhanu, N. V., Marchione, D. M., Klein, B. J., Bazilevsky, G. A., McCullough, C. E., Magin, R. S., Kutateladze, T. G., Snyder, N. W., Marmorstein, R., & Garcia, B. A. (2017). Characterization of histone acylations links chromatin modifications with metabolism. *Nature Communications* 2017 8:1, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01384-9>
- Simon, T., & Salhia, B. (2022). Cancer-Associated Fibroblast Subpopulations With Diverse and Dynamic Roles in the Tumor Microenvironment. *Molecular Cancer Research*, 20(2), 183–192. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-21-0282/673001/AM/CANCER-ASSOCIATED-FIBROBLAST-SUBPOPULATIONS-WITH>
- Singh, A., & Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*

- 2010 29:34, 29(34), 4741–4751.
<https://doi.org/10.1038/onc.2010.215>
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107–1112.
<https://doi.org/10.1093/JNCI/82.13.1107>
- Skrypek, N., Goossens, S., De Smedt, E., Vandamme, N., & Berx, G. (2017). Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends in Genetics*, 33(12), 943–959. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2017.08.004>
- Smit, M. A., Philipsen, M. W., Postmus, P. E., Putter, H., Tollenaar, R. A., Cohen, D., & Mesker, W. E. (2020). The prognostic value of the tumor-stroma ratio in squamous cell lung cancer, a cohort study. *Cancer Treatment and Research Communications*, 25.
<https://doi.org/10.1016/J.CTARC.2020.100247>
- Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S. I., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Bando, M., Ohno, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Niki, T., Sohara, Y., Sugiyama, Y., & Mano, H. (2007). Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007 448:7153, 448(7153), 561–566. <https://doi.org/10.1038/nature05945>
- Soini, Y., Tuhkanen, H., Sironen, R., Virtanen, I., Kataja, V., Auvinen, P., Mannermaa, A., & Kosma, V. M. (2011). Transcription factors zeb1, twist and snai1 in breast carcinoma. *BMC Cancer*, 11(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-73/FIGURES/5>
- Song, M., Li, Y., Miao, M., Zhang, F., Yuan, H., Cao, F., Chang, W., Shi, H., & Song, C. (2020). High stromal nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) indicates poor prognosis in colorectal cancer. *Cancer Medicine*, 9(6), 2030. <https://doi.org/10.1002/CAM4.2890>
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., & LLeonart, M. E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 376–390.
<https://doi.org/10.1016/J.ARR.2012.10.004>
- Soucheray, M., Capelletti, M., Pulido, I., Kuang, Y., Paweletz, C. P., Becker, J. H., Kikuchi, E., Xu, C., Patel, T. B., Al-Shahrour, F., Carretero, J., Wong, K. K., Jänne, P. A., Shapiro, G. I., & Shimamura, T. (2015). Intratumoral Heterogeneity in EGFR-Mutant NSCLC Results in Divergent Resistance Mechanisms in Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition. *Cancer Research*, 75(20), 4372–4383.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0377>

- Stanisavljevic, J., Loubat-Casanovas, J., Herrera, M., Luque, T., Peña, R., Lluch, A., Albanell, J., Bonilla, F., Rovira, A., Peña, C., Navajas, D., Rojo, F., García De Herreros, A., & Baulida, J. (2015). Snail1-expressing fibroblasts in the tumor microenvironment display mechanical properties that support metastasis. *Cancer Research*, 75(2), 284–295. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1903/651631/AM/SNAIL1-EXPRESSING-FIBROBLASTS-IN-THE-TUMOR>
- Strating, E., Verhagen, M. P., Wensink, E., Dünnebach, E., Wijler, L., Aranguren, I., De la Cruz, A. S., Peters, N. A., Hageman, J. H., van der Net, M. M. C., van Schelven, S., Laoukili, J., Fodde, R., Roodhart, J., Nierkens, S., Snippert, H., Gloerich, M., Rinkes, I. B., Elias, S. G., & Kranenburg, O. (2023). Co-cultures of colon cancer cells and cancer-associated fibroblasts recapitulate the aggressive features of mesenchymal-like colon cancer. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1053920>
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719–724. <https://doi.org/10.1038/NATURE07943>
- Ström, K., Morales-Alamo, D., Ottosson, F., Edlund, A., Hjort, L., Jörgensen, S. W., Almgren, P., Zhou, Y., Martin-Rincon, M., Ekman, C., Pérez-López, A., Ekström, O., Perez-Suarez, I., Mattiasson, M., De Pablos-Velasco, P., Oskolkov, N., Ahlqvist, E., Wierup, N., Eliasson, L., ... Hansson, O. (n.d.). *N 1-methylnicotinamide is a signalling molecule produced in skeletal muscle coordinating energy metabolism OPEN*. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21099-1>
- Suda, K., Tomizawa, K., & Mitsudomi, T. (2010). Biological and clinical significance of KRAS mutations in lung cancer: An oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(1), 49–60. <https://doi.org/10.1007/S10555-010-9209-4/TABLES/2>
- Sun, H., Wang, X., Wang, X., Xu, M., & Sheng, W. (2022). The role of cancer-associated fibroblasts in tumorigenesis of gastric cancer. *Cell Death & Disease* 2022 13:10, 13(10), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05320-8>
- Suzuki, S., Okada, M., Takeda, H., Kuramoto, K., Sanomachi, T., Togashi, K., Seino, S., Yamamoto, M., Yoshioka, T., & Kitanaka, C. (2018). Involvement of GLUT1-mediated glucose transport and metabolism in gefitinib resistance of non-small-cell lung cancer cells. *Oncotarget*, 9(66), 32667–32679. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.25994>
- Tahara, S., Nojima, S., Ohshima, K., Hori, Y., Sato, K., Kurashige, M., Matsui, T., Okuzaki, D., & Morii, E. (2021). Nicotinamide N-

- methyltransferase is related to MELF pattern invasion in endometrioid carcinoma. *Cancer Medicine*, 10(23), 8630–8640. <https://doi.org/10.1002/CAM4.4359>
- Takahashi, K., Akatsu, Y., Podyma-Inoue, K. A., Matsumoto, T., Takahashi, H., Yoshimatsu, Y., Koinuma, D., Shirouzu, M., Miyazono, K., & Watabe, T. (2020). Targeting all transforming growth factor- β isoforms with an Fc chimeric receptor impairs tumor growth and angiogenesis of oral squamous cell cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(36), 12559–12572. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA120.012492>
- Takezawa, K., Pirazzoli, V., Arcila, M. E., Nebhan, C. A., Song, X., de Stanchina, E., Ohashi, K., Janjigian, Y. Y., Spitzler, P. J., Melnick, M. A., Riely, G. J., Kris, M. G., Miller, V. A., Ladanyi, M., Politi, K., & Pao, W. (2012). HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation. *Cancer Discovery*, 2(10), 922–933. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0108>
- Talmadge, J. E., & Fidler, I. J. (2010). AACR centennial series: The biology of cancer metastasis: Historical perspective. *Cancer Research*, 70(14), 5649–5669. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040.656390/P/AACR-CENTENNIAL-SERIES-THE-BIOLOGY-OF-CANCER>
- Talmadge, J. E., & Gabrilovich, D. I. (2013). History of myeloid-derived suppressor cells. *Nature Reviews. Cancer*, 13(10), 739–752. <https://doi.org/10.1038/NRC3581>
- Tan, H. X., Cao, Z. Bin, He, T. T., Huang, T., Xiang, C. L., & Liu, Y. (2019). TGF β 1 is essential for MSCs-CAFs differentiation and promotes HCT116 cells migration and invasion via JAK/STAT3 signaling. *OncoTargets and Therapy*, 12, 5323–5334. <https://doi.org/10.2147/OTT.S178618>
- Tan, H. X., Gong, W. Z., Zhou, K., Xiao, Z. G., Hou, F. T., Huang, T., Zhang, L., Dong, H. Y., Zhang, W. L., Liu, Y., & Huang, Z. C. (2020). CXCR4/TGF- β 1 mediated hepatic stellate cells differentiation into carcinoma-associated fibroblasts and promoted liver metastasis of colon cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 21(3), 258–268. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1685157>
- Tang, S. W., Yang, T. C., Lin, W. C., Chang, W. H., Wang, C. C., Lai, M. K., & Lin, J. Y. (2011). Nicotinamide N -methyltransferase induces cellular invasion through activating matrix metalloproteinase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 32(2), 138–145. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGQ225>

- Tejada, M. L., Yu, L., Dong, J., Jung, K., Meng, G., Peale, F. V., Frantz, G. D., Hall, L., Liang, X. H., Gerber, H. P., & Ferrara, N. (2006). Tumor-driven paracrine platelet-derived growth factor receptor alpha signaling is a key determinant of stromal cell recruitment in a model of human lung carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(9), 2676–2688. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1770>
- Thakur, C., & Chen, F. (2019). Connections between metabolism and epigenetics in cancers. *Seminars in Cancer Biology*, 57, 52–58. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2019.06.006>
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), 871–890. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.11.007>
- Thomas, M. G., Saldanha, M., Mistry, R. J., Dexter, D. T., Ramsden, D. B., & Parsons, R. B. (2013). Nicotinamide N-methyltransferase expression in SH-SY5Y neuroblastoma and N27 mesencephalic neurones induces changes in cell morphology via ephrin-B2 and Akt signalling. *Cell Death & Disease*, 4(6), e669. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2013.200>
- Timmerman, L. A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertrán, E., Pérez-Pomares, J. M., Díez, J., Aranda, S., Palomo, S., McCormick, F., Izpisua-Belmonte, J. C., & De La Pompa, J. L. (2004). Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes & Development*, 18(1), 99–115. <https://doi.org/10.1101/GAD.276304>
- Tiwari, A., Trivedi, R., & Lin, S. Y. (2022). Tumor microenvironment: barrier or opportunity towards effective cancer therapy. *Journal of Biomedical Science 2022* 29:1, 29(1), 1–27. <https://doi.org/10.1186/S12929-022-00866-3>
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., & Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(5), 349–363. <https://doi.org/10.1038/NRM809>
- Tomida, M., Ohtake, H., Yokota, T., Kobayashi, Y., & Kurosumi, M. (2008). Stat3 up-regulates expression of nicotinamide N-methyltransferase in human cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 134(5), 551–559. <https://doi.org/10.1007/S00432-007-0318-6/TABLES/1>
- Torok, N. J. (2018). P300, A New Player in Mechanosensitivity and Activation of Cancer-Associated Fibroblasts. *Gastroenterology*, 154(8), 2025. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2018.05.002>

- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21262>
- Torrealba, N., Vera, R., Fraile, B., Martínez-Onsurbe, P., Paniagua, R., & Royuela, M. (2020). TGF- β /PI3K/AKT/mTOR/NF- κ B pathway. Clinicopathological features in prostate cancer. *The Aging Male*, 23(5), 801–811. <https://doi.org/10.1080/13685538.2019.1597840>
- Trammell, S. A. J., & Brenner, C. (2015). NNMT: A Bad Actor in Fat Makes Good in Liver. *Cell Metabolism*, 22(2), 200–201. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2015.07.017>
- Tran, P. T., Fan, A. C., Bendapudi, P. K., Koh, S., Komatsubara, K., Chen, J., Horng, G., Bellovin, D. I., Giuriato, S., Wang, C. S., Whitsett, J. A., & Felsher, D. W. (2008). Combined Inactivation of MYC and K-Ras Oncogenes Reverses Tumorigenesis in Lung Adenocarcinomas and Lymphomas. *PLOS ONE*, 3(5), e2125. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0002125>
- Travis, W. D. (2020). Lung Cancer Pathology: Current Concepts. *Clinics in Chest Medicine*, 41(1), 67–85. <https://doi.org/10.1016/J.CCM.2019.11.001>
- Tulchinsky, E., Demidov, O., Kriajevska, M., Barlev, N. A., & Imyanitov, E. (2019). EMT: A mechanism for escape from EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1871(1), 29–39. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2018.10.003>
- Tyner, S. D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., Sang, H. P., Thompson, T., Karsenty, G., Bradley, A., & Donehower, L. A. (2002). p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*, 415(6867), 45–53. <https://doi.org/10.1038/415045A>
- Ulanovskaya, O. A., Zuhl, A. M., & Cravatt, B. F. (2013). NNMT promotes epigenetic remodeling in cancer by creating a metabolic methylation sink. *Nature Chemical Biology* 2013 9:5, 9(5), 300–306. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1204>
- Umez, D., Okada, N., Sakoda, Y., Adachi, K., Ojima, T., Yamaue, H., Eto, M., & Tamada, K. (2019). Inhibitory functions of PD-L1 and PD-L2 in the regulation of anti-tumor immunity in murine tumor microenvironment. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 68(2), 201–211. <https://doi.org/10.1007/S00262-018-2263-4/FIGURES/6>
- Vicent, S., Sayles, L. C., Vaka, D., Khatri, P., Gevaert, O., Chen, R., Zheng, Y., Gillespie, A. K., Clarke, N., Xu, Y., Shrager, J., Hoang, C. D., Plevritis, S., Butte, A. J., & Sweet-Cordero, E. A. (2012). Cross-species functional analysis of cancer-associated fibroblasts identifies a

- critical role for CLCF1 and IL-6 in non-small cell lung cancer in vivo. *Cancer Research*, 72(22), 5744–5756. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1097>
- Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W. K., Whelan, R. L., Kumara, H. M. C. S., Signori, E., Honoki, K., Georgakilas, A. G., Amin, A., Helferich, W. G., Boosani, C. S., Guha, G., Ciriolo, M. R., Chen, S., ... Kwon, B. S. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S185–S198. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2015.03.004>
- Vitale, D., Kumar Katakam, S., Greve, B., Jang, B., Oh, E. S., Alaniz, L., & Götte, M. (2019). Proteoglycans and glycosaminoglycans as regulators of cancer stem cell function and therapeutic resistance. *The FEBS Journal*, 286(15), 2870–2882. <https://doi.org/10.1111/FEBS.14967>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10(8), 789–799. <https://doi.org/10.1038/NM1087>
- Wadowska, K., Bil-Lula, I., Trembecki, Ł., & Śliwińska-Mossoń, M. (2020). Genetic Markers in Lung Cancer Diagnosis: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 1–24. <https://doi.org/10.3390/IJMS21134569>
- Wald, O., Izhar, U., Amir, G., Kirshberg, S., Shlomai, Z., Zamir, G., Peled, A., & Shapira, O. M. (2011). Interaction between neoplastic cells and cancer-associated fibroblasts through the CXCL12/CXCR4 axis: role in non-small cell lung cancer tumor proliferation. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 141(6), 1503–1512. <https://doi.org/10.1016/J.JTCVS.2010.11.056>
- Walker, C., Mojares, E., & Del Río Hernández, A. (2018). Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS19103028>
- Walker, E. J., Heydet, D., Veldre, T., & Ghildyal, R. (2019). Transcriptomic changes during TGF- β -mediated differentiation of airway fibroblasts to myofibroblasts. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56955-1>
- Wallace, D. C. (2005). Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 70, 363–374. <https://doi.org/10.1101/SQB.2005.70.035>
- Wang, C., Wang, T., Lv, D., Li, L., Yue, J., Chen, H. Z., & Xu, L. (2019). Acquired resistance to EGFR TKIs mediated by TGF β 1/integrin B3 signaling in EGFR-mutant lung cancer. *Molecular Cancer*

- Therapeutics*, 18(12), 2357–2367. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0181/87930/AM/ACQUIRED-RESISTANCE-TO-EGFR-TKIS-MEDIATED-BY-TGF>
- Wang, H., Chi, L., Yu, F., Dai, H., Gao, C., Si, X., Wang, Z., Liu, L., Zheng, J., Shan, L., Liu, H., & Zhang, Q. (2023). Annual review of KRAS inhibitors in 2022. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 249, 115124. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2023.115124>
- Wang, J., Liu, X., Huang, Y., Li, P., Yang, M., Zeng, S., Chen, D., Wang, Q., Liu, H., Luo, K., & Deng, J. (2022). Targeting nicotinamide N-methyltransferase overcomes resistance to EGFR-TKI in non-small cell lung cancer cells. *Cell Death Discovery* 2022 8:1, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00966-x>
- Wang, L., Cao, L., Wang, H., Liu, B., Zhang, Q., Meng, Z., Wu, X., Zhou, Q., & Xu, K. (2017). Cancer-associated fibroblasts enhance metastatic potential of lung cancer cells through IL-6/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*, 8(44), 76116–76128. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.18814>
- Wang, W., Yang, C., Wang, T., & Deng, H. (2022). Complex roles of nicotinamide N-methyltransferase in cancer progression. *Cell Death & Disease* 2022 13:3, 13(3), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04713-z>
- Wang, Y., Zeng, J., Wu, W., Xie, S., Yu, H., Li, G., Zhu, T., Li, F., Lu, J., Wang, G. Y., Xie, X., & Zhang, J. (2019). Nicotinamide N-methyltransferase enhances chemoresistance in breast cancer through SIRT1 protein stabilization. *Breast Cancer Research*, 21(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13058-019-1150-Z/FIGURES/10>
- Wang, Y., Zhou, X., Lei, Y., Chu, Y., Yu, X., Tong, Q., Zhu, T., Yu, H., Fang, S., Li, G., Wang, L., Wang, G. Y., Xie, X., & Zhang, J. (2022). NNMT contributes to high metastasis of triple negative breast cancer by enhancing PP2A/MEK/ERK/c-Jun/ABCA1 pathway mediated membrane fluidity. *Cancer Letters*, 547, 215884. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2022.215884>
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*, 123(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.123.3191.309>
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *Journal of General Physiology*, 8(6), 519–530. <https://doi.org/10.1085/JGP.8.6.519>
- Wątroba, M., Dudek, I., Skoda, M., Stangret, A., Rządziejewicz, P., & Szukiewicz, D. (2017). Sirtuins, epigenetics and longevity. *Ageing Research Reviews*, 40, 11–19. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2017.08.001>

- Wawro, M. E., Chojnacka, K., Wieczorek-Szukala, K., Sobierajska, K., & Niewiarowska, J. (2018). Invasive Colon Cancer Cells Induce Transdifferentiation of Endothelium to Cancer-Associated Fibroblasts through Microtubules Enriched in Tubulin- β 3. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1). <https://doi.org/10.3390/IJMS20010053>
- Weng, C. H., Chen, L. Y., Lin, Y. C., Shih, J. Y., Lin, Y. C., Tseng, R. Y., Chiu, A. C., Yeh, Y. H., Liu, C., Lin, Y. T., Fang, J. M., & Chen, C. C. (2018). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI. *Oncogene* 2018 38:4, 38(4), 455–468. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0454-2>
- Weng, C. H., Chen, L. Y., Lin, Y. C., Shih, J. Y., Lin, Y. C., Tseng, R. Y., Chiu, A. C., Yeh, Y. H., Liu, C., Lin, Y. T., Fang, J. M., & Chen, C. C. (2019). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI. *Oncogene*, 38(4), 455–468. <https://doi.org/10.1038/S41388-018-0454-2>
- Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., & Johnson, K. R. (2008). Cadherin switching. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 6), 727–735. <https://doi.org/10.1242/JCS.000455>
- Wong, K. Y., Cheung, A. H. K., Chen, B., Chan, W. N., Yu, J., Lo, K. W., Kang, W., & To, K. F. (2022). Cancer-associated fibroblasts in nonsmall cell lung cancer: From molecular mechanisms to clinical implications. *International Journal of Cancer*, 151(8), 1195. <https://doi.org/10.1002/IJC.34127>
- Wu, M., Hu, W., Wang, G., Yao, Y., & Yu, X. F. (2020). Nicotinamide N-Methyltransferase Is a Prognostic Biomarker and Correlated With Immune Infiltrates in Gastric Cancer. *Frontiers in Genetics*, 11, 1200. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2020.580299/BIBTEX>
- Xiang, H., Ramil, C. P., Hai, J., Zhang, C., Wang, H., Watkins, A. A., Afshar, R., Georgiev, P., Sze, M. A., Song, X. S., Curran, P. J., Cheng, M., Miller, J. R., Sun, D., Loboda, A., Jia, Y., Moy, L. Y., Chi, A., & Brandish, P. E. (2020). Cancer-Associated Fibroblasts Promote Immunosuppression by Inducing ROS-Generating Monocytic MDSCs in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Immunology Research*, 8(4), 436–450. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0507>
- Xiao, D., & He, J. (2010). Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 2(3), 154. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2072-1439.2010.02.03.7>
- Xiao, Q., & Ge, G. (2012). Lysyl Oxidase, Extracellular Matrix Remodeling and Cancer Metastasis. *Cancer Microenvironment*, 5(3), 261. <https://doi.org/10.1007/S12307-012-0105-Z>
-

- Xiao, Y., & Yu, D. (2021). Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 221, 107753. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2020.107753>
- Xie, X., Liu, H., Wang, Y., Zhou, Y., Yu, H., Li, G., Ruan, Z., Li, F., Wang, X., & Zhang, J. (2016). Nicotinamide N-methyltransferase enhances resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cells through inhibition of the ASK1-p38 MAPK pathway. *Oncotarget*, 7(29), 45837–45848. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.9962>
- Xie, X., Yu, H., Wang, Y., Zhou, Y., Li, G., Ruan, Z., Li, F., Wang, X., Liu, H., & Zhang, J. (2014). Nicotinamide N-methyltransferase enhances the capacity of tumorigenesis associated with the promotion of cell cycle progression in human colorectal cancer cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 564, 52–66. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2014.08.017>
- Xing, P. Y., Zhu, Y. X., Wang, L., Hui, Z. G., Liu, S. M., Ren, J. S., Zhang, Y., Song, Y., Liu, C. C., Huang, Y. C., Liao, X. Z., Xing, X. J., Wang, D. Bin, Yang, L., Du, L. Bin, Liu, Y. Q., Zhang, Y. Z., Liu, Y. Y., Wei, D. H., ... Dai, M. (2019). What are the clinical symptoms and physical signs for non-small cell lung cancer before diagnosis is made? A nation-wide multicenter 10-year retrospective study in China. *Cancer Medicine*, 8(8), 4055. <https://doi.org/10.1002/CAM4.2256>
- Xu, J., Capezzone, M., Xu, X., & Hershman, J. M. (2005). Activation of Nicotinamide N-Methyltransferase Gene Promoter by Hepatocyte Nuclear Factor-1 β in Human Papillary Thyroid Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*, 19(2), 527–539. <https://doi.org/10.1210/ME.2004-0215>
- Xu, J., & Hershman, J. M. (2006). Histone Deacetylase Inhibitor Depsipeptide Represses Nicotinamide N-Methyltransferase and Hepatocyte Nuclear Factor-1 β Gene Expression in Human Papillary Thyroid Cancer Cells. *https://Home.Liebertpub.Com/Thy*, 16(2), 151–160. <https://doi.org/10.1089/THY.2006.16.151>
- Xu, J., Moatamed, F., Caldwell, J. S., Walker, J. R., Kraiem, Z., Taki, K., Brent, G. A., & Hershman, J. M. (2003). Enhanced Expression of Nicotinamide N-Methyltransferase in Human Papillary Thyroid Carcinoma Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(10), 4990–4996. <https://doi.org/10.1210/JC.2002-021843>
- Xu, X., Peng, Q., Jiang, X., Tan, S., Yang, Y., Yang, W., Han, Y., Chen, Y., Oyang, L., Lin, J., Xia, L., Peng, M., Wu, N., Tang, Y., Li, J., Liao, Q., & Zhou, Y. (2023). Metabolic reprogramming and epigenetic modifications in cancer: from the impacts and mechanisms to the treatment potential. *Experimental & Molecular Medicine* 2023 55:7, 55(7), 1357–1370. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01020-1>

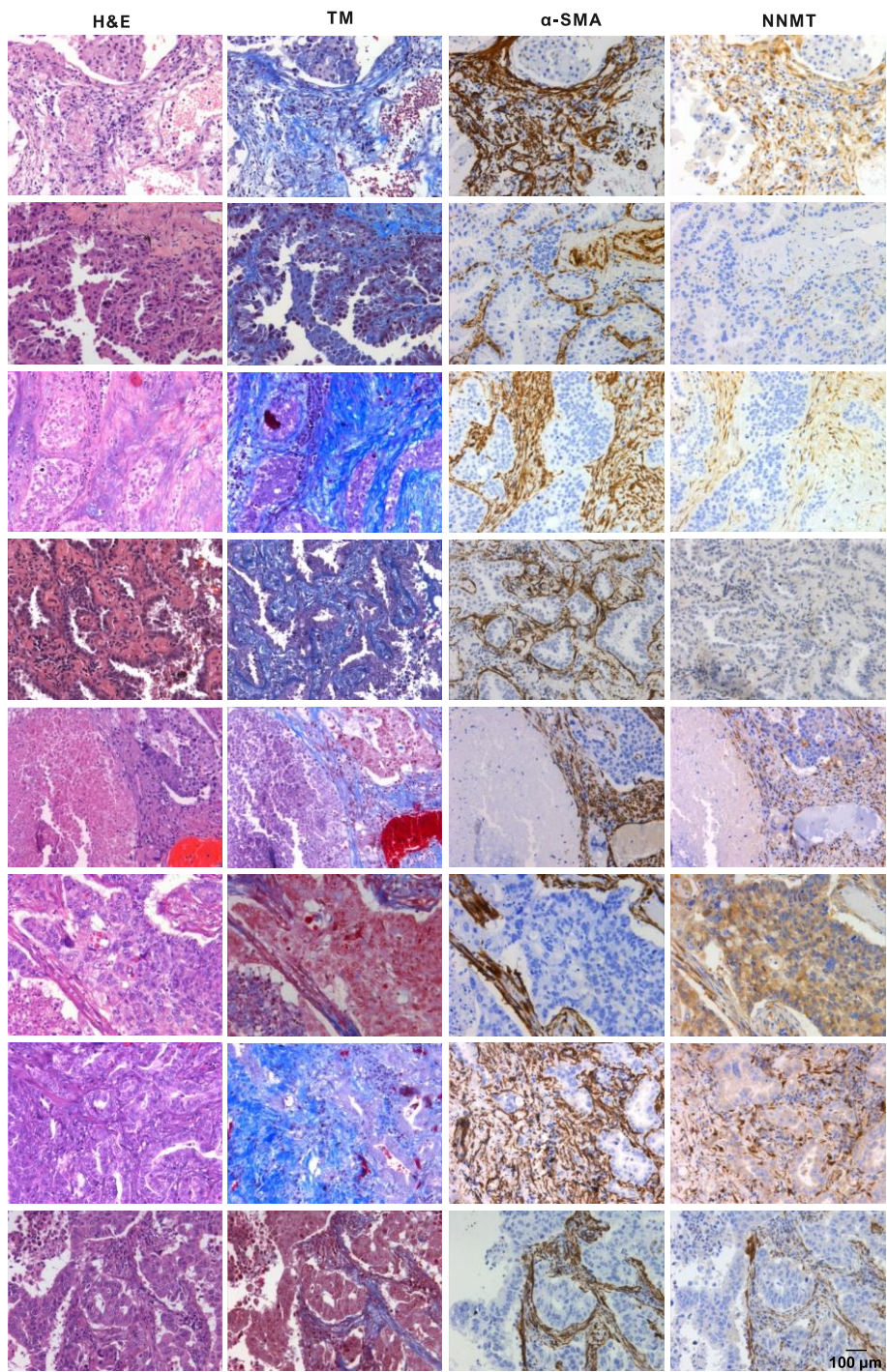
- Xuefeng, X., Hou, M. X., Yang, Z. W., Agudamu, A., Wang, F., Su, X. L., Li, X., Shi, L., Terigele, T., Bao, L. L., & Wu, X. L. (2020). Epithelial–mesenchymal transition and metastasis of colon cancer cells induced by the FAK pathway in cancer-associated fibroblasts. *The Journal of International Medical Research*, 48(6), 1–17. <https://doi.org/10.1177/0300060520931242>
- Yaku, K., Okabe, K., Hikosaka, K., & Nakagawa, T. (2018). NAD metabolism in cancer therapeutics. *Frontiers in Oncology*, 8(DEC), 622. <https://doi.org/10.3389/FONC.2018.00622/BIBTEX>
- Yamada, K. M., Collins, J. W., Cruz Walma, D. A., Doyle, A. D., Morales, S. G., Lu, J., Matsumoto, K., Nazari, S. S., Sekiguchi, R., Shinsato, Y., & Wang, S. (2019). Extracellular matrix dynamics in cell migration, invasion and tissue morphogenesis. *International Journal of Experimental Pathology*, 100(3), 144–152. <https://doi.org/10.1111/IEP.12329>
- Yang, Dakai, Liu, J., Qian, H., & Zhuang, Q. (2023). Cancer-associated fibroblasts: from basic science to anticancer therapy. *Experimental & Molecular Medicine* 2023 55:7, 55(7), 1322–1332. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01013-0>
- Yang, Dawei, Guo, P., He, T., & Powell, C. A. (2021). Role of endothelial cells in tumor microenvironment. *Clinical and Translational Medicine*, 11(6), e450. <https://doi.org/10.1002/CTM2.450>
- Yang, P., Luo, Q., Wang, X., Fang, Q., Fu, Z., Li, J., Lai, Y., Chen, X., Xu, X., Peng, X., Hu, K., Nie, X., Liu, S., Zhang, J., Li, J., Shen, C., Gu, Y., Liu, J., Chen, J., ... Su, J. (2023). Comprehensive Analysis of Fibroblast Activation Protein Expression in Interstitial Lung Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 207(2), 160–172. https://doi.org/10.1164/RCCM.202110-2414OC/SUPPL_FILE/DISCLOSURES.PDF
- Yang, Z., Yang, N., Ou, Q., Xiang, Y., Jiang, T., Wu, X., Bao, H., Tong, X., Wang, X., Shao, Y. W., Liu, Y., Wang, Y., & Zhou, C. (2018). Investigating novel resistance mechanisms to third-generation EGFR tyrosine kinase inhibitor osimertinib in non–small cell lung cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 24(13), 3097–3107. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2310/87341/AM/INVESTIGATING-NOVEL-RESISTANCE-MECHANISMS-TO-THIRD>
- Yano, S., Wang, W., Li, Q., Matsumoto, K., Sakurama, H., Nakamura, T., Ogino, H., Kakiuchi, S., Hanibuchi, M., Nishioka, Y., Uehara, H., Mitsudomi, T., Yatabe, Y., Nakamura, T., & Sone, S. (2008). Hepatocyte Growth Factor Induces Gefitinib Resistance of Lung Adenocarcinoma with Epidermal Growth Factor Receptor–Activating

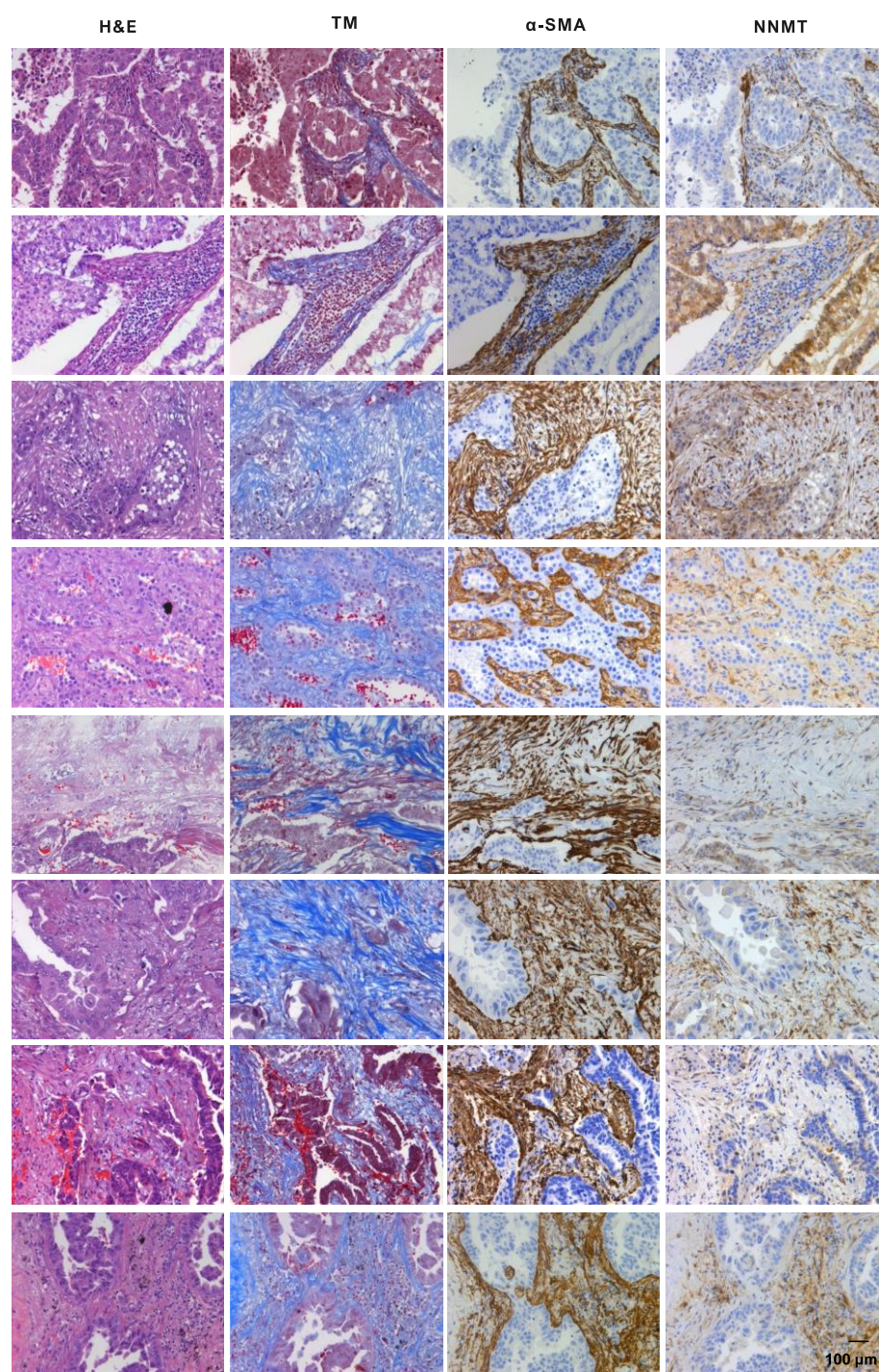
- Mutations. *Cancer Research*, 68(22), 9479–9487. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1643>
- Yeo, C. D., Kang, N., Choi, S. Y., Kim, B. N., Park, C. K., Kim, J. W., Kim, Y. K., & Kim, S. J. (2017). The role of hypoxia on the acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness: a possible link to epigenetic regulation. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 32(4), 589–599. <https://doi.org/10.3904/KJIM.2016.302>
- Yeon, J. H., Jeong, H. E., Seo, H., Cho, S., Kim, K., Na, D., Chung, S., Park, J., Choi, N., & Kang, J. Y. (2018). Cancer-derived exosomes trigger endothelial to mesenchymal transition followed by the induction of cancer-associated fibroblasts. *Acta Biomaterialia*, 76, 146–153. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2018.07.001>
- Yin, J., Lee, J. H., Zhang, J., Gao, Z., Polotsky, V. Y., & Ye, J. (2014). Regulation of hepatocyte growth factor expression by NF- κ B and PPAR γ in adipose tissue. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 306(8), E929. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00687.2013>
- Yoo, Y. A., Kang, M. H., Lee, H. J., Kim, B. H., Park, J. K., Kim, H. K., Kim, J. S., & Oh, S. C. (2011). Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer. *Cancer Research*, 71(22), 7061–7070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1338>
- Yoon, H., Tang, C. M., Banerjee, S., Delgado, A. L., Yebra, M., Davis, J., & Sicklick, J. K. (2021). TGF- β 1-mediated transition of resident fibroblasts to cancer-associated fibroblasts promotes cancer metastasis in gastrointestinal stromal tumor. *Oncogenesis* 2021 10:2, 10(2), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00302-5>
- You, J., Li, M., Cao, L. M., Gu, Q. H., Deng, P. B., Tan, Y., & Hu, C. P. (2019). Snail1-dependent cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells via exosomes. *QJM: An International Journal of Medicine*, 112(8), 581–590. <https://doi.org/10.1093/QJMED/HCZ093>
- You, Jia, Li, M., Tan, Y., Cao, L., Gu, Q., Yang, H., & Hu, C. (2017). Snail1-expressing cancer-associated fibroblasts induce lung cancer cell epithelial-mesenchymal transition through miR-33b. *Oncotarget*, 8(70), 114769. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.23082>
- Young, R. P., & Hopkins, R. J. (2010). Link between COPD and lung cancer. *Respiratory Medicine*, 104(5), 758–759. <https://doi.org/10.1016/J.RMED.2009.11.025>
- Yu, H. A., Arcila, M. E., Rekhtman, N., Sima, C. S., Zakowski, M. F., Pao, W., Kris, M. G., Miller, V. A., Ladanyi, M., & Riely, G. J. (2013). Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI

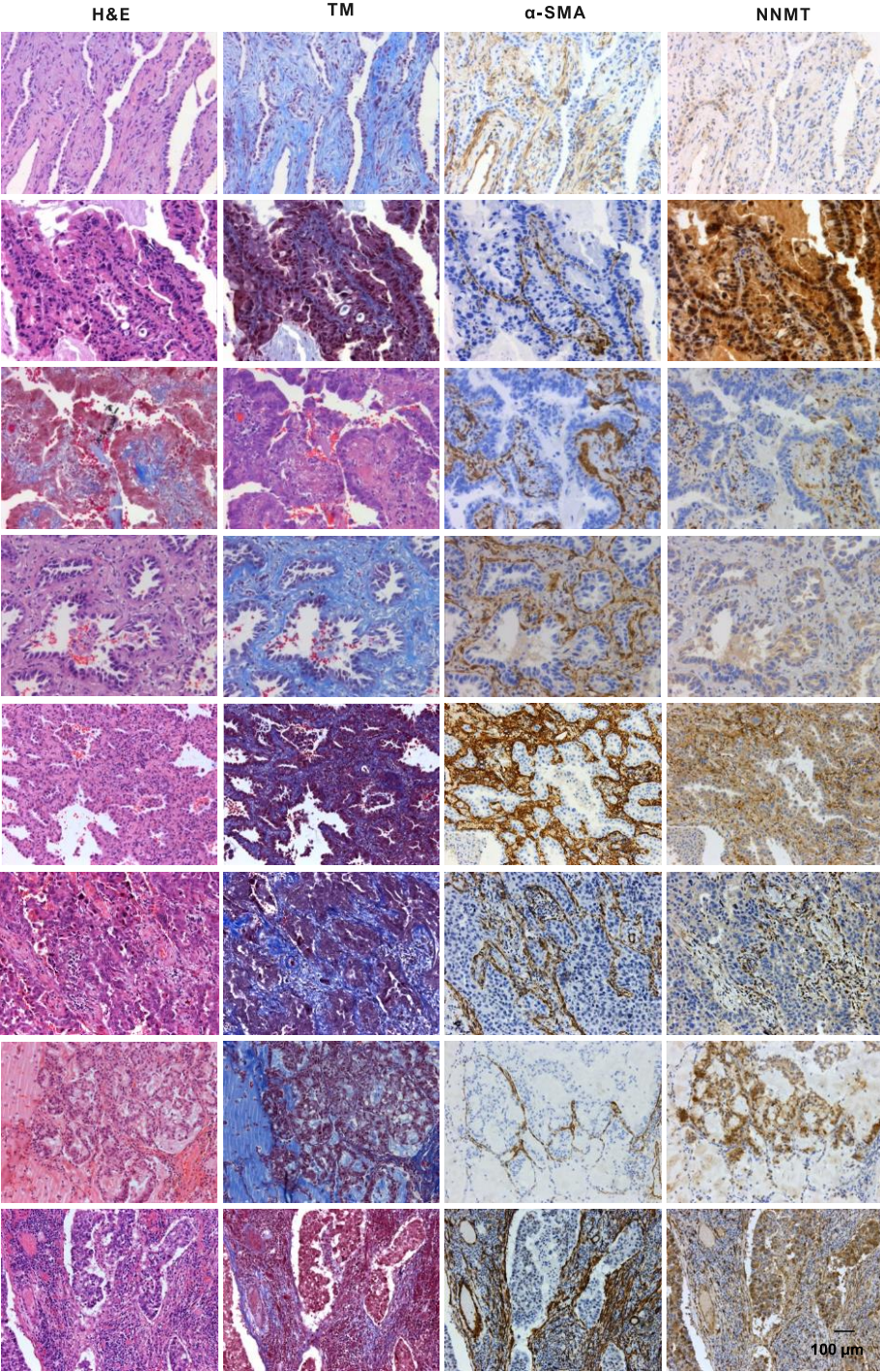
- therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clinical Cancer Research*, 19(8), 2240–2247. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2246/85140/AM/ANALYSIS-OF-MECHANISMS-OF-ACQUIRED-RESISTANCE-TO>
- Yun, C. H., Boggon, T. J., Li, Y., Woo, M. S., Greulich, H., Meyerson, M., & Eck, M. J. (2007). Structures of Lung Cancer-Derived EGFR Mutants and Inhibitor Complexes: Mechanism of Activation and Insights into Differential Inhibitor Sensitivity. *Cancer Cell*, 11(3), 217–227. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2006.12.017>
- Zeisberg, E. M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., & Kalluri, R. (2007). Discovery of Endothelial to Mesenchymal Transition as a Source for Carcinoma-Associated Fibroblasts. *Cancer Research*, 67(21), 10123–10128. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3127>
- Zeisberg, M., & Kalluri, R. (2013). Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 304(3), 216–225. <https://doi.org/10.1152/AJPCCELL.00328.2012/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH00031371640002.JPEG>
- Zhang, A., Qian, Y., Ye, Z., Chen, H., Xie, H., Zhou, L., Shen, Y., & Zheng, S. (2017). Cancer-associated fibroblasts promote M2 polarization of macrophages in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Medicine*, 6(2), 463–470. <https://doi.org/10.1002/CAM4.993>
- Zhang, J., Wang, Y., Li, G., Yu, H., & Xie, X. (2014). Down-regulation of nicotinamide N-methyltransferase induces apoptosis in human breast cancer cells via the mitochondria-mediated pathway. *PloS One*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0089202>
- Zhang, L., Song, M., Zhang, F., Yuan, H., Chang, W., Yu, G., & Niu, Y. (2021). Accumulation of Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT) in Cancer-associated Fibroblasts: A Potential Prognostic and Predictive Biomarker for Gastric Carcinoma. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 69(3), 165–176. <https://doi.org/10.1369/0022155420976590>
- Zhang, M., Zhang, Y. Y., Chen, Y., Wang, J., Wang, Q., & Lu, H. (2021). TGF- β Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.786728>
- Zhang, Q., Lin, F., Huang, J., & Xiong, C. (2022). Mechanical transmission enables EMT cancer cells to drive epithelial cancer cell migration to guide tumor spheroid disaggregation. *Science China Life Sciences*, 65(10), 2031–2049. <https://doi.org/10.1007/S11427-021-2054-3/METRICS>
-

- Zhang, W., Jing, Y., Wang, S., Wu, Y., Sun, Y., Zhuang, J., Huang, X., Chen, S., Zhang, X., Song, Y., Hu, Q., & Ni, Y. (2022). Identification of Biological Functions and Prognostic Value of NNMT in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomolecules*, 12(10), 1487. <https://doi.org/10.3390/BIOM12101487/S1>
- Zhao, H., Li, R., Chen, Y., Yang, X., & Shang, Z. (2023). Stromal nicotinamide N-methyltransferase orchestrates the crosstalk between fibroblasts and tumour cells in oral squamous cell carcinoma: evidence from patient-derived assembled organoids. *Oncogene* 2023 42:15, 42(15), 1166–1180. <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02642-5>
- Zhao, Y., & Adjei, A. A. (2015). Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *The Oncologist*, 20(6), 660–673. <https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.2014-0465>
- Zheng, M. (2016). Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 25(3), 447–468. <https://doi.org/10.1016/J.SOC.2016.02.003>
- Zhou, W., Ercan, D., Chen, L., Yun, C. H., Li, D., Capelletti, M., Cortot, A. B., Chirieac, L., Iacob, R. E., Padera, R., Engen, J. R., Wong, K. K., Eck, M. J., Gray, N. S., & Jänne, P. A. (2009). Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature* 2009 462:7276, 462(7276), 1070–1074. <https://doi.org/10.1038/nature08622>
- Zhu, X., Chen, L., Liu, L., & Niu, X. (2019). EMT-Mediated Acquired EGFR-TKI Resistance in NSCLC: Mechanisms and Strategies. *Frontiers in Oncology*, 9, 1044. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.01044>

VII. MATERIAL SUPLEMENTARIO







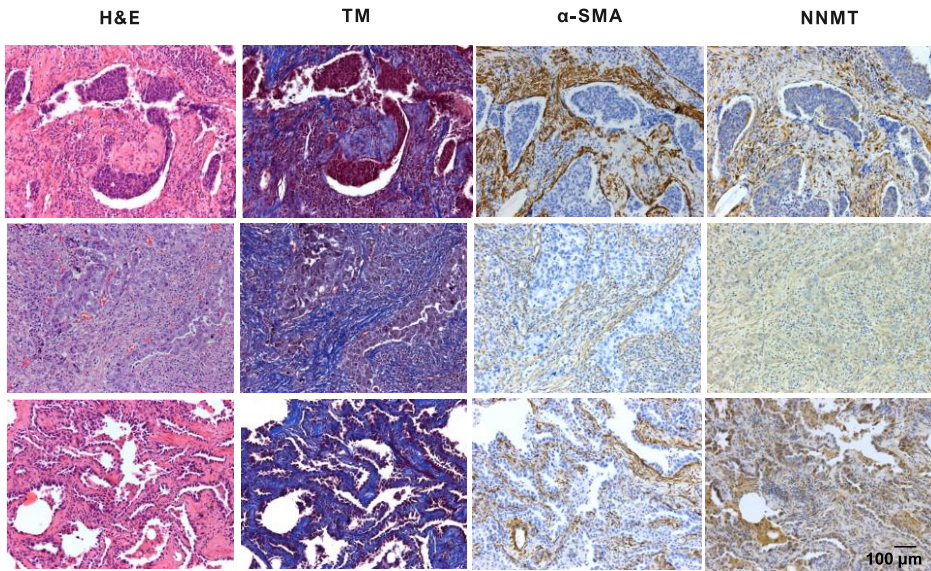


Figura S 1: Análisis inmunohistoquímico de Hematoxilina/Eosina, Tricrómico de Masson y tinciones de α -SMA y NNMT en cortes pulmonares procedentes de 27 pacientes con CPNM. Tras el montaje y desparafinado de las biopsias pulmonares de pacientes con CPNM, se hicieron tinciones de Hematoxilina (morado=núcleos celulares; rosa=citoplasma), Tricrómico (azul=fibras de colágeno, morado=núcleo celular, rojo=estructuras oxidadas y citoplasma), α -SMA (marrón=fibras de α -SMA) y NNMT (marrón=proteína NNMT en citoplasma y núcleos) (20x).