



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

**AGONISTAS DE CANNABINOIDES EN
CÁNCER DE PULMÓN**

Facultat de Medicina i Odontologia

Programa de Doctorado en Medicina

JAVIER ALCÁCER FERNÁNDEZ-CORONADO

DIRECTORES

Profesora Carmen Carda Batalla

Profesor Manuel Mata Roig

Profesora Lara Milián Medina

Febrero 2024

INFORME DIRECTORS/AS, TUTOR/A PER A DIPÒSIT DE TESI

Director (es) / Codirector (es):

1.- Cognoms, Nom. Carda Batalla, Carmen. N.I.F: 18931520J, Departament/Institut: Patologia Centre: Facultat de Medicina i Odontologia

2.- Cognoms, Nom. Mata Roig, Manuel. N.I.F: 48341227B, Departament/Institut: Patologia. Centre: Facultat de Medicina i Odontologia

3.- Cognoms, Nom. Milián Medina, Lara. N.I.F: 24369632M, Departament/Institut: Patologia. Centre: Facultat de Medicina i Odontologia

Tutor o tutora (si pertoca)

Cognoms, Nom. . N.I.F: , Departament/Institut: Centre:

Com a director (a) /codirector (a), tutor(a) de la tesi doctoral AGONISTAS DE CANNABINOIDES EN CÁNCER DE PULMÓN

de D/Dª Javier Alcacer Fernández-Coronado,

estudiant del programa de doctorat 3139 Programa de Doctorat en Medicina (RD99/2011), de la Universitat de València, emeten informe favorable per a la realització del dipòsit i defensa de la tesi doctoral.

Data: 15/02/2024

Signat: Carmen Carda Batalla

MARIA
DEL
CARMEN
CARDA
BATALLA
Directora

Firmado digitalmente por MARIA DEL CARMEN|CARDA|BATALLA
Fecha: 2024.02.19 13:01:20 +01'00'

Signat: Lara Milián Medina

LARA
MILIAN
MEDINA
Directora

Firmado digitalmente por LARA| MILIAN|MEDINA
Fecha: 2024.02.19 13:06:17 +01'00'

Signat: Manuel Mata Roig

MANUE
L
MATA
ROIG
Director

Firmado digitalmente por MANUEL|MATA|ROIG
Nombre de reconocimiento (DN): cn=MANUEL|MATA|ROIG, serialNumber=48341227B, givenName=MANUEL, sn=MATA ROIG, ou=CEADAGANGC, o=ACOL, c=ES
Fecha: 2024.02.19 13:17:06 +01'00'

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Cáncer de pulmón.....	17
1.1.1. Clasificación.....	18
1.1.1.1. Clasificación molecular.....	21
1.1.1.2. Cáncer de pulmón hereditario.....	24
1.1.1.3. Cáncer de pulmón en no fumadores.....	26
1.1.2. Epidemiología: incidencia, prevalencia, mortalidad y supervivencia.....	27
1.1.3. Diagnóstico.....	31
1.1.3.1. Diagnóstico histopatológico.....	31
1.1.3.2. Inmunohistoquímica.....	32
1.1.3.3. Diagnóstico molecular.....	33
1.1.4. Tratamientos actuales.....	34
1.2. Transición epitelio-mesénquima (TEM).....	37
1.2.1. Mecanismos celulares y moleculares de la TEM.....	39
1.2.2. TGF β : señalización mediada por la superfamilia de ligandos.....	41
1.2.3. TEM y cáncer.....	48
1.3. Sistema endocannabinoide.....	51
1.3.1. Sistema endocannabinoide o endocannabinoidoma.....	51
1.3.1.1. Receptores de cannabinoides.....	52
1.3.1.2. Cannabinoides.....	53
1.3.1.3. Endocannabinoides.....	54
1.3.1.4. Fitocannabinoides.....	57
1.3.1.5. Agonistas de receptores de cannabinoides sintéticos.....	59
1.3.2. Cannabinoides y cáncer.....	61
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	66
2.1. Hipótesis.....	67
2.2. Objetivos.....	67

3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	68
3.1. Material.....	69
3.1.1. Muestras de Pacientes.....	69
3.1.2. Líneas celulares.....	69
3.1.3. Cultivos celulares.....	69
3.1.4. Cannabinoides.....	71
3.1.5. Extracción de ARN.....	71
3.1.6. Transcripción inversa.....	72
3.1.7. Expresión génica.....	73
3.1.8. Inmunohistoquímica.....	74
3.1.9. Tinción del citoesqueleto.....	75
3.1.10. Migración celular.....	76
3.1.11. Proliferación celular.....	77
3.1.12. Análisis de datos.....	77
3.2. Métodos.....	77
3.2.1. Diseño experimental.....	77
3.2.2.1. Estudio proliferación, expresión génica y TEM con cannabinoides.....	79
3.2.2.2. Cultivo de células para tratamiento con TGF β y fitocannabinoides.....	80
3.2.2. Extracción de RNA total.....	81
3.2.3 Real Time-PCR.....	83
3.2.4. Análisis de expresión de receptores de cannabinoides mediante inmunohistoquímica.....	84
3.2.5. Tinción fluorescente de F-actina.....	86
3.2.6. Migración celular.....	87
3.2.7. Ensayos de proliferación celular.....	87
3.3 Análisis de datos.....	88
4. RESULTADOS.....	89
4.1 La sobreexpresión de CB1 y CB2 está asociada a mayor supervivencia en pacientes de cáncer de pulmón.....	90
4.2. Inmunohistoquímica.....	93

4.3. THC/CBD inhiben la proliferación y la expresión de EGFR en las células de cáncer de pulmón.....	98
4.4. THC/CBD inhiben la TEM en las células de cáncer de pulmón.....	101
4.5. Los cannabinoides inhiben la movilidad celular inducida por EGF en células de cáncer.....	106
5. DISCUSIÓN.....	109
6. CONCLUSIONES.....	120
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Clasificación de la OMS de los tumores pulmonares.....	20
Tabla 1.2: Estadios y supervivencia de los tumores pulmonares.....	22
Tabla 1.3: Causa de mortalidad por tipo de cáncer.....	30
Tabla 1.4: Causa de mortalidad por tipo de cáncer.....	30
Tabla 3.1: Composición de los cultivos celulares.....	75
Tabla 3.2: Reactivos para la extracción de ácidos nucleicos.....	76
Tabla 3.3: Reactivos para la síntesis de cDNA.....	77
Tabla 3.4: Reactivos utilizados para expresión de génica.....	78
Tabla 3.5: Sondas utilizadas en expresión génica.	79
Tabla 3.6: Anticuerpos y reactivos para inmunohistoquímica.....	80
Tabla 3.7: Reactivos para inmunofluorescencia y microscopía de fluorescencia.....	81
Tabla 3.8: Composición de la reacción de transcripción reversa.....	88
Tabla 3.9: Composición de la reacción de RT-PCR a tiempo real.....	89
Tabla 4.1: Características clínicas e histopatológicas de los pacientes con NSCLC.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Evolución de la clasificación de los NSCLC (izquierda); mutaciones <i>driver</i> adenocarcinomas(derecha).....	25
Figura 1.2: Plasticidad celular en la transición epitelio-mesenquimal y mesénquimo-epitelial.....	39
Figura 1.3: TEM y plasticidad epitelial.....	40
Figura 1.4: Señalización dependiente de Smad.....	46
Figura 1.5: Activación de la TEM y proceso de metástasis.....	48
Figura 1.6: Principales marcadores involucrados en el proceso de la TEM.....	48
Figura 1.7: TEM y diseminación metastásica.....	51
Figura 1.8: Cannabinoides y su clasificación según su disponibilidad en la naturaleza.....	55
Figura 1.9: Principales endocannabinoides y endovanilloides.....	56
Figura 1.10: Diagrama que muestra la biosíntesis y degradación de los dos principales AEA y 2-AG.....	58
Figura 1.11: Estructura química de los fitocannabinoides más representativos.....	59
Figura 1.12: Señalización en células cancerígenas mediada por cannabinoides.....	63
Figura 3.1: Tratamiento con cannabinoides y/o TGF- β y posterior PCR.....	82
Figura 4.1: Expresión de receptores de cannabinoides (CB1 y CB2) en 157 pacientes con NSCLC.....	101

Figura 4.2: Expresión de anti-CB1 y anti-CB2. Expresión por inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-CB1 y anti-CB2 en 3 casos diferentes de NSCLC.....	103
Figura 4.3: Detalle de la tinción de CB1 y CB2 en tejidos tumoral e infiltrado inflamatorio.....	106
Figura 4.4: Tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) inhibieron la proliferación y la expresión de EGFR en las células de cáncer de pulmón.....	108
Figura 4.5: THC/CBD inhibe la transición epitelio mesénquima (TEM) en las células de cáncer.....	111
Figura 4.6: Inhibición de la expresión génica de los genes relacionados con la TEM por THC y CBD.....	113
Figura: 4.7: THC y CBD inhiben la migración celular inducida por EGF en células de cáncer.....	115

ABREVIATURAS Y SIGLAS

2-AG:	2-araquidonilglicerol
μL:	microlitro
μm:	micrometro
μM:	micromolar
AC:	Adenilciclasa
ACEA:	Araquidonil-2-cloroetilamida
ACPA:	Araquidonilciclopropilamida
Actina F:	Actina filamentosa
AChR:	Receptor de Acetilcolina muscarínico
ADC:	Adenocarcinoma
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
AEA:	Anandamida/ N-araquidoniletanolamida
ALK:	Anaplastic Lymphoma Kinase (quinasa de linfoma anaplásico)
ALK:	Activin receptor-Like Kinase (quinasa similar a receptor de activina)
ARN:	Ácido Ribonucleico
ASMA:	Alpha smooth muscle actin (actina alfa de músculo liso)
ATCC:	American Type Culture Collection (Colección Americana de Tipos de Cultivos)
BrdU:	Bromodeoxiuridina
BSA:	Bovine Serum Albumin (albúmina de suero bovino)

CA:	California
CAFs:	Cancer-Associated Fibroblasts (Fibroblastos Asociado Cáncer)
c-AMP:	Adenosín Monofosfato Cíclico
CB1/2:	Receptor de cannabinoides tipo 1/2
CBD:	Cannabidiol
CBG:	Cannabigerol
CBV:	Cannabivarina
CDH1:	E-Cadherina
cDNA:	Complementary Deoxyrribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico complementario)
cfDNA:	Circulating free Deoxyrribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico circulante)
CGE:	Clonal Genome Evolution (evolución genómica clonal)
cm:	centímetro
COX-2:	Ciclooxygenasa-2
CO₂:	Dióxido de carbono
CTCs:	Circulating Tumor Cells (células tumorales circulantes)
ctDNA :	DNA tumoral circulante
DAB:	Diaminobencidina
DAGL:	Diacilglicerol lipasa
DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-diamino-2-fenilindol)
DEPC:	Dietil pirocarbonato

DMSO:	Dimetil sulfóxido
DNA:	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
dNTP:	Desoxirribonucleótidos trifosfato
E-cadherina:	Epithelial cadherin (cadherina epitelial)
eCBs:	Endocannabinoides
EE.UU.:	Estados Unidos
EGF:	Epidermal Growth Factor (factor de crecimiento epidérmico)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (receptor del factor de crecimiento epidérmico)
EPOC:	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ERK:	Extracellular-signal Regulated Kinase (quinasa regulada por señal extracelular)
GAPDH:	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)
GPR:	Receptores acoplados a Proteína G huérfanos
GWAS:	Genome-Wide Association Study (estudio de asociación del genoma completo).
HEPES:	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanosulfónico
HGF:	Human Growth Factor (Factor de Crecimiento Epidérmico)
HRP:	Horse Radish Peroxidase (peroxidasa de rábano)
IARC:	International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer)
ID1:	Inhibidor de proteínas de unión a DNA 1
INE:	Instituto Nacional de Estadística

JNK:	c-Jun N-terminal kinase (quinasa c-Jun N-terminal)
LCC:	Large Cell Carcinoma (carcinoma de células grandes)
M:	molar
MA:	Massachusetts
MAGL:	monoacilglicerol lipasa
MAPK:	Mitogen activated protein kinase (proteínas quinasas activadas por mitógeno)
miRNA:	micro RNA (micro ácido ribonucleico)
mL:	mililitro
mm:	milímetros
MO:	Missouri
mTOR:	Mammalian target of rapamycin (diana de la rapamicina en mamíferos)
mR:	Receptor metabotrópico
mRNA:	Messenger ribonucleic acid (ácido ribonucleico mensajero)
N-cadherina:	Neural cadherin (cadherina neural)
NCI:	National Cancer Institute (instituto nacional del cáncer)
NGS:	Next Generation Sequencing (secuenciación de nueva generación)
NSCLC:	Non-Small Cell Lung Cancer (cáncer de pulmón de células no pequeñas)
NSE:	Neuron-Specific Enolase
NT:	Neurotransmisor

NTRK:	Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase (Receptor Neurotrófico Tirosina Quinasa)
OH:	Ohio
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PBS:	Phosphate buffered saline (tampón salino de fosfatos)
PCR:	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PD-L1:	Programed Death Ligand-1 (ligando muerte programada-1)
PI3K:	Phosphatidylinositol 3–kinase (fosfatidilinositol 3–quinasa)
PKA/B:	Proteína kinasa A/B
PPARγ:	Peroxisome proliferator activated receptor gamma (receptor activado por proliferador de peroxisoma gamma)
PTX:	Toxina Pertussis
RNA:	Ribonucleic acid (ácido ribnucleico)
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute medium (solución de neutralización Roswell Park Memorial Institute)
RTK:	Receptor tyrosine kinase (receptor tirosina quinasa)
RT-PCR:	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción)
RT-PCR:	Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR a tiempo real)
SCLC:	Small Cell Lung Cancer (cáncer de pulmón de células pequeñas)
SEOM:	Sociedad Española de Oncología Médica
SQCC:	Squamous Cell Cancer (cáncer de células escamosas)

Smad:	Mothers against decapentaplegic homologs (homólogos de las proteínas madre contra decapentaplégico de <i>Drosophila</i> y la proteína SMA de <i>C. elegans</i>)
PCP-2:	Proteína Transportadora de esteroides-2
SD:	Standard Deviation (Desviación Estándar)
TAC:	Tomografía Axial Computerizada
TEM:	Transición Epitelio-Mesénquima
TGF-β:	Transforming Growth Factor beta (factor de crecimiento transformante beta)
TIL:	Tumor Infiltrating Lymphocytes (Linfocitos Infiltrantes del Tumor, linfocitos intratumorales)
TKI:	Tyrosine Kinase Inhibitor (Inhibidor de la Tirosina Quinasa)
TME:	Microambiente Tumoral (del inglés Tumor Microenvironment).
TME:	Mesenchymal-epithelial transition (transición mesénquima-epitelio)
TTF-1:	Factor de Transcripción Tiroidea 1
THC/ Δ⁹-THC:	Tetrahidrocannabinol
THCV:	Tetrahidrocannabivarina
VIM:	Vimentina
VEGF:	Vascular endothelial growth factor (factor de crecimiento endotelial vascular)
WHO:	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)
ZO-1:	Zonula Occludens 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de pulmón

Según datos de la OMS, una de las principales causas de muerte en el mundo es el cáncer. Más de 18,1 millones de personas fueron diagnosticadas de cáncer en el año 2020. Ese mismo año, 9,8 millones de personas murieron por alguna patología tumoral (1 de cada 6 defunciones en el mundo) Se prevé que para el año 2040 la cifra de personas diagnosticadas de cáncer podría llegar a los 27 millones. De entre todos los tipos de neoplasias, el cáncer de pulmón, sin ser el más abundante, es el de mayor morbi-mortalidad, con un índice de mortalidad a nivel mundial del 18,4%, afectando tanto a hombres como mujeres [1] [2][3].

Existe una relación directa entre el tabaquismo y la muerte por cáncer de pulmón. A pesar de que el consumo de tabaco parece haberse estabilizado los últimos años en los países desarrollados, sigue siendo la causa principal de muerte por cáncer de pulmón tanto en hombres como en mujeres. Concretamente, se considera que cerca de un 85% de los casos de cáncer de pulmón son causados directamente por el consumo de tabaco o sus derivados [4].

Existen otros factores de causa directa de contraer esta enfermedad como son la exposición a otros agentes carcinogénicos. Es el caso del gas radón, el asbesto, la contaminación del aire, el alquitrán, el hollín, etc., todos ellos con efectos sinérgicos con el consumo de tabaco. Aunque existe un riesgo aumentado entre familiares de primer orden de contraer la enfermedad, se calcula que solo el 8% de los casos el cáncer de pulmón se debe a factores hereditarios. Algunos estudios de genes candidato han identificado algunas enzimas en el citocromo P-450 como factor de riesgo [5].

Respecto a su frecuencia es el denominado cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) el más abundante, siendo el segundo tipo el cáncer de pulmón el de células pequeñas (SCLC) [6]. Bajo cualquiera de sus entidades, el cáncer de pulmón es un tipo de cáncer muy invasivo y de rápida diseminación.

Teniendo en cuenta estas cifras, queda patente que el cáncer de pulmón supone un grave problema de salud pública que requiere ser estudiado en profundidad, más aún, sabiendo que está en rápido crecimiento, para reducir su incidencia y mejorar su pronóstico.

1.1.1. Clasificación

El cáncer de pulmón se clasifica en base a su tipo histológico en dos grandes categorías. Según la clasificación realizada por la OMS, se describe el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (Tabla 1.1). Los primeros derivarían de células neuroendocrinas y los segundos provienen de células epiteliales.

Los SCLC representan el 15% de todas las neoplasias de pulmón diagnosticadas y están más ligados al consumo de tabaco [7]. Los NSCLC se pueden dividir a su vez en tres subtipos que, de forma general y atendiendo a su prevalencia, son: los adenocarcinomas (ADC) que representan el 40% de los casos diagnosticados; los carcinomas de células escamosas o epidermoides (SQCC) representando el 30%; y los carcinomas de células grandes (LCC) el 10%. De todos los tipos, el ADC es el tumor más frecuente y también el que más muertes causa.

1. INTRODUCCIÓN

TABLE 1. 2015 WHO Classification of Lung Tumors^{a,b,c}

Histologic Type and Subtypes	ICDO Code
Epithelial tumors	
Adenocarcinoma	8140/3
Lepidic adenocarcinoma ^a	8250/3 ^d
Acinar adenocarcinoma	8551/3 ^d
Papillary adenocarcinoma	8260/3
Micropapillary adenocarcinoma ^a	8265/3
Solid adenocarcinoma	8230/3
Invasive mucinous adenocarcinoma ^a	8253/3 ^d
Mixed invasive mucinous and nonmucinous adenocarcinoma	8254/3 ^d
Colloid adenocarcinoma	8480/3
Fetal adenocarcinoma	8333/3
Enteric adenocarcinoma ^a	8144/3
Minimally invasive adenocarcinoma ^a	
Nonmucinous	8256/3 ^d
Mucinous	8257/3 ^d
Preinvasive lesions	
Atypical adenomatous hyperplasia	8250/0 ^d
Adenocarcinoma in situ ^a	
Nonmucinous	8250/2 ^d
Mucinous	8253/2 ^d
Squamous cell carcinoma	8070/3
Keratinizing squamous cell carcinoma ^a	8071/3
Nonkeratinizing squamous cell carcinoma ^a	8072/3
Basaloid squamous cell carcinoma ^a	8083/3
Preinvasive lesion	
Squamous cell carcinoma in situ	8070/2
Neuroendocrine tumors	
Small cell carcinoma	8041/3
Combined small cell carcinoma	8045/3
Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3
Combined large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3
Carcinoid tumors	
Typical carcinoid tumor	8240/3
Atypical carcinoid tumor	8249/3
Preinvasive lesion	
Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia	8040/0 ^d
Large cell carcinoma	8012/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3
Sarcomatoid carcinomas	
Pleomorphic carcinoma	8022/3
Spindle cell carcinoma	8032/3
Giant cell carcinoma	8031/3
Carcinosarcoma	8980/3
Pulmonary blastoma	8972/3
Other and Unclassified carcinomas	
Lymphoepithelioma-like carcinoma	8082/3
NUT carcinoma ^a	8023/3 ^d
Salivary gland-type tumors	
Mucoepidermoid carcinoma	8430/3
Adenoid cystic carcinoma	8200/3
Epithelial-myoepithelial carcinoma	8562/3
Pleomorphic adenoma	8940/0

(Continued)

TABLE 1. (Continued)

Histologic Type and Subtypes	ICDO Code
Papillomas	
Squamous cell papilloma	8052/0
Exophytic	8052/0
Inverted	8053/0
Glandular papilloma	8260/0
Mixed squamous and glandular papilloma	8560/0
Adenomas	
Sclerosing pneumocytoma ^a	8832/0
Alveolar adenoma	8251/0
Papillary adenoma	8260/0
Mucinous cystadenoma	8470/0
Mucous gland adenoma	8480/0
Mesenchymal tumors	
Pulmonary hamartoma	8992/0 ^d
Chondroma	9220/0
PEComatous tumors ^a	
Lymphangioleiomyomatosis	9174/1
PEComa, benign ^a	8714/0
Clear cell tumor	8005/0
PEComa, malignant ^a	8714/3
Congenital peribronchial myofibroblastic tumor	8827/1
Diffuse pulmonary lymphangiomatosis	
Inflammatory myofibroblastic tumor	8825/1
Epithelioid hemangioendothelioma	9133/3
Pleuropulmonary blastoma	8973/3
Synovial sarcoma	9040/3
Pulmonary artery intimal sarcoma	9137/3
Pulmonary myxoid sarcoma with <i>EWSR1-CREB1</i> translocation ^a	8842/3 ^d
Myoepithelial tumors^a	
Myoepithelioma	8982/0
Myoepithelial carcinoma	8982/3
Lymphohistiocytic tumors	
Extranodal marginal zone lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	9699/3
Diffuse large cell lymphoma	9680/3
Lymphomatoid granulomatosis	9766/1
Intravascular large B cell lymphoma ^a	9712/3
Pulmonary Langerhans cell histiocytosis	9751/1
Erdheim-Chester disease	9750/1
Tumors of ectopic origin	
Germ cell tumors	
Teratoma, mature	9080/0
Teratoma, immature	9080/1
Intrapulmonary thymoma	8580/3
Melanoma	8270/3
Meningioma, NOS	9530/0
Metastatic tumors	

^aThe morphology codes are from the ICDO.¹ Behavior is coded /0 for benign tumors, /1 for unspecified, borderline or uncertain behavior, /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia, and /3 for malignant tumors.

^bThe classification is modified from the previous WHO classification¹ taking into account changes in our understanding of these lesions.

^cThis table is reproduced from the 2015 WHO Classification by Travis et al.¹

^dThese new codes were approved by the International Agency on Cancer Research/WHO Committee for ICDO.

^eNew terms changed or entities added since 2004 WHO Classification.¹

LCNEC, large cell neuroendocrine carcinoma; WHO, World Health Organization; ICDO International Classification of Diseases for Oncology.

Tabla 1.1: clasificación de la OMS de los tumores pulmonares.

El grado histológico de evolución del tumor se puede describir clasificándolo en 4 estadios. Esta clasificación se basa en la diseminación celular o metástasis y tiene una relación directa con el grado de malignidad y por tanto con la supervivencia a 5 años del enfermo (tabla 1.2).

En concreto, para establecer el estadio se aplica la clasificación TNM para la mayoría de los tumores de pulmón, pero sobre todo en los NSCLC. En dicha clasificación se valora el tamaño del tumor primario (T) y su diseminación hacia tejidos cercanos en una escala de 0 a 4, Tx si el tumor no puede ser evaluado y Tis si el tumor es *in situ*; la (N) describe la diseminación hacia los nódulos afectados (ganglios linfáticos) usando una escala de 0 a 3, Nx si los ganglios no pueden ser evaluados; y para las metástasis existentes (diseminación a otros órganos del cuerpo) se utiliza la letra (M) siendo M0 la inexistencia de metástasis y M1 la presencia de metástasis lejanas. Según la combinación de TNM obtenida se asigna al tumor un grado histológico. Para casos de SCLC se describe, de forma más simplificada, si la enfermedad está limitada o diseminada [8]

Estadio y tasa de supervivencia a 5 años	T	N	M
Carcinoma oculto	Tx	N0	M0
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA (50% a 73%)	T1a, b	N0	M0
Estadio IB (43% a 58%)	T2a	N0	M0
Estadio IIA (36% a 46%)	T1a, b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Estadio IIB (25% a 36%)	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA (19% a 24%)	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Estadio IIIB (7% a 9%)	T4	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
Estadio IV (2% a 13%)	Cualquier T	Cualquier N	M1a,b

Tabla 1.2: Estadios y supervivencia de los tumores pulmonares.

1.1.1.1. Clasificación molecular

La revolución tecnológica de las últimas dos décadas en el campo de la biología molecular ha permitido aumentar de forma relevante los conocimientos relacionados con la biología del cáncer [9]. La comunidad científica se ha volcado en el estudio a nivel genético y molecular de los acontecimientos que derivan en la aparición de un cáncer, así como su evolución y comportamiento. Gracias a las tecnologías de nueva generación de secuenciación masiva en paralelo (NGS) se puede analizar genomas enteros de células tumorales con un nivel de resolución sin precedentes y buscar cambios a nivel genético y molecular comparando con células de tejidos sanos.

Se han creado organismos a nivel mundial y articulado plataformas para trabajar de forma sinérgica en todos los aspectos que atañen al cáncer. Con organismos como “The cancer genome Atlas” o “International Cancer Genome Consortium” [10] [11] entre otros, se ha conseguido recabar una gran cantidad de información nueva sobre la biología del cáncer que ahora se está poniendo en común y analizando de manera pormenorizada.

Sabemos que el cáncer es una enfermedad genética, en el sentido más profundo del término, que se inicia por la aparición de mutaciones en el genoma de las células. Con las técnicas de NGS se ha demostrado de forma concluyente la hipótesis de que el cáncer es un proceso evolutivo impulsado por la selección natural actuando sobre mutaciones somáticas pre-existentes adquiridas de forma estocástica.

En este modelo Darwiniano de carcinogénesis (CGE) hay que distinguir entre las mutaciones *driver* que confieren una ventaja selectiva a las células del tumor que las poseen y las *passenger*, mutaciones somáticas que son adquiridas durante la evolución del tumor.

Desde un punto de vista genético, el modelo CGE permite clasificar cualquier gen involucrado en carcinogénesis, independientemente de su función biológica, como oncogén, si el proceso carcinogénico ha seleccionado mutaciones que implican ganancia de función, o como gen supresor, si, por lo contrario, el proceso carcinogénico ha seleccionado mutaciones que implican pérdida de función.

Las mutaciones *driver* proporcionan, o han proporcionado en algún momento de la evolución tumoral, una ventaja adaptativa fundamental a las células que las portan. Mientras que las mutaciones *passenger* no tienen ningún valor adaptativo, pero contienen, no obstante, información relevante para la clínica, como puede ser el tipo de inestabilidad genética que está

operando en el tumor [12]. También pueden aportar información sobre el potencial del tumor para evolucionar en el futuro adaptándose a nuevos cambios ambientales, como se ve frecuentemente, por ejemplo, en la aparición de poblaciones resistentes a determinados fármacos anticancerígenos.

Las mutaciones *driver* no implican a los mismos genes en los diferentes tipos tumorales ni ocurren con la misma probabilidad en el genoma. Se estima que el número de genes con mutaciones *driver* está entorno a los 200 en humanos, cifra muy baja si se compara con el acervo génico de los seres vivos, que contiene alrededor de 20.000 genes codificantes.

Las mutaciones *driver* ocurren en genes a los que se les permite adquirir habilidades tales como la capacidad de proliferación celular rápida, indefinida e independiente de señales externas. Esto implica alterar los mecanismos de señalización entre la membrana y el núcleo celulares, suprimir los mecanismos de senescencia inducidos por estrés replicativo, reactivar mecanismos preservadores de la longitud telomérica, y modificar el metabolismo energético. También pueden adquirir la capacidad de evadir los controles del sistema inmune, la capacidad de suprimir los mecanismos inductores de apoptosis, la capacidad de neo-vascularización del tejido tumoral en crecimiento (angiogénesis), y la capacidad de movilidad, extravasación, invasión y metástasis [13]. En el modelo de CGE, las características se adquieren mediante expansiones de clones celulares en las que la adquisición de una mutación confiere ventajas frente a otra sub-clona. En el momento del diagnóstico se estima que el número de mutaciones *driver* gira en torno a 10 [12].

Estos nuevos conocimientos sobre la biología del tumor están haciendo posible elaborar nuevas clasificaciones en base a la firma biológica de cada tumor de forma individualizada. Ahora ya se acepta que el NSCLC no es una

entidad única, sino que se trata de múltiples patologías con firmas moleculares particulares [14].

Asimismo, la aplicación de estos nuevos conocimientos está permitiendo encontrar nuevas dianas terapéuticas contra las que las nuevas generaciones de fármacos actúan de forma mucho más eficaz y directa.

El objetivo final al que se pretende llegar es practicar una medicina personalizada en la que cada paciente sea tratado con los fármacos específicos contra su tumor y que, además, se puedan ir modificando en cada momento según evolucione la biología del mismo.

De forma general, se puede decir que los SCLC acumulan normalmente mutaciones en *MYC*, *BCL2*, *c-KIT*, *p53* y *RB*, mientras que los NSCLC tienen normalmente mutaciones en *EGFR*, *RAS*, *CD44* y *p16*. En ambos casos se trata tanto de oncogenes como de genes supresores de tumores (Figura 1.1)[15].

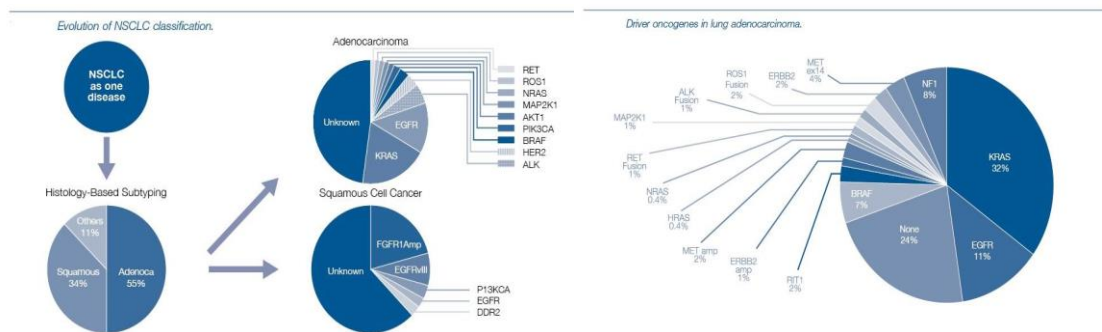


Figura1.1: evolución de la clasificación de los NSCLC (izquierda); mutaciones *driver* adenocarcinomas(derecha).

1.1.1.2. Cáncer de pulmón hereditario

El cáncer de pulmón es atribuible principalmente al uso del tabaco. Este hecho implica que existan pocas familias grandes con múltiples casos de

cáncer de pulmón que sea adecuadas para el análisis de ligamiento, o sea, para el estudio genético de la enfermedad en la herencia. Y aunque estas familias estuvieran disponibles para estudio, no es obvio que un solo gen con un amplio efecto sea responsable de los casos de cáncer observados. Por un estudio tradicional de ligamiento, se ha sugerido la existencia de un locus en el cromosoma 6q [16], aunque todavía no se ha identificado ningún gen.

Algunos genes supresores de tumores están asociados con aumentos sustanciales de riesgo de contraer cáncer de pulmón y, en personas portadoras de mutaciones en estos genes, el tabaquismo puede ser particularmente peligroso.

Genes vinculados al metabolismo de los carcinógenos del tabaco han sido estudiados como posibles factores de riesgo en el cáncer de pulmón hereditario, pero no han sido fácilmente vinculados al riesgo de contraerlo.

Recientemente, se ha relacionado estrechamente el riesgo de cáncer de pulmón con dos variantes alélicas, rs1051730 y rs8034191, que se encuentran dentro o de forma adyacente a los genes de la subunidad del receptor CHRNA3, CHRNA5 y CHRNB4 de la acetilcolina nicotínica [17] [18] [19]. En particular, el efecto de estos genes en el riesgo puede ser independiente de cualquier efecto que puedan tener sobre el comportamiento tabáquico, [20] y pueden ser importantes determinantes del riesgo en personas con una familia con antecedentes de cáncer de pulmón [21].

Recientemente se han identificado otros genes por estudios de asociación de genomas (GWAS) a gran escala, pero incluso estos genes que parecen estar altamente asociados con el riesgo, a menudo han sido estudiados en poblaciones de etnicidad única o limitada y no todos tienen un papel biológicamente definido o una base fisiopatológica con relación en el riesgo de cáncer de pulmón.

1.1.1.3. Cáncer de pulmón en no fumadores

Como ya hemos comentado aquí, fumar tabaco se considera el riesgo principal y el factor mejor establecido para el cáncer de pulmón en humanos, confirmado por un gran banco de datos de investigaciones epidemiológicas tanto prospectivas como retrospectivas que respaldan esta asociación [22]. El riesgo relativo de desarrollo de cáncer de pulmón en un fumador a largo plazo en comparación con un nunca fumador se estima que es de 10 a 30 veces superior [2].

Sin embargo, los no fumadores también contraen cáncer de pulmón. Según la OMS, la incidencia de cáncer de pulmón en los no fumadores es de aproximadamente el 20% de todos casos. Se han observado diferencias clínico-patológicas y diferencias a nivel molecular, lo que implica que ésta podría ser una enfermedad diferente en comparación con el cáncer de pulmón en fumadores. El SCLC rara vez se observa en personas que nunca fuman, mientras que entre los NSCLC el tipo histológico más común en los que nunca fuman es el adenocarcinoma [23].

El cáncer de pulmón en personas que nunca fuman es más común en mujeres y en personas más jóvenes y esto se confirma en numerosas series, sin embargo, no está claro si esta mayor incidencia en las mujeres se debe a la susceptibilidad inherente o a una mayor contribución de otros factores de riesgo diferentes al tabaco.

Factores de riesgo en no fumadores: el tabaquismo pasivo, exposición al radón, exposición ocupacional a carcinógenos (asbesto, hidrocarburos aromáticos policíclicos, sílice, metales pesados), vapores de aceite de cocina y quema de carbón en interiores, factores hormonales (estrógenos), contaminación del aire, factores infecciosos (infección por Virus del Papiloma

Humano y *Micobacterium tuberculosis*), diabetes mellitus y factores dietéticos [2][24].

Se ha demostrado que los pacientes no fumadores con cáncer de pulmón tienen una mejor supervivencia en comparación con los pacientes fumadores. En parte debido a que responden mejor a ciertos tipos de tratamientos personalizados. Para los tratamientos biológicos dirigidos contra una diana terapéutica, hay una gran diferencia en el resultado del tratamiento de no fumadores *versus* fumadores entre pacientes con NSCLC cuando se tratan con inhibidores de la tirosina cinasa del EGFR, pero esto debe atribuirse a la mayor incidencia de activación de mutaciones EGFR en la población de no fumadores [25].

1.1.2. Epidemiología: incidencia, prevalencia, mortalidad y supervivencia

La **incidencia** es el número de nuevos casos de una enfermedad en una población en un periodo determinado. Se suele expresar como el número de casos nuevos por 100.000 personas por año.

De acuerdo con los datos de la SEOM, se calcula que en el año 2020 se diagnosticaron en España 30.948 casos nuevos de cáncer de pulmón, 8632 en mujeres y 22.316 en varones (Sociedad Española de Oncología Médica, 2022)[26].

Este gran aumento en la incidencia del cáncer de pulmón es el reflejo del aumento de la población, de su envejecimiento.

Las estimaciones poblacionales indican que el número de casos nuevos probablemente aumente en más de un 50 % en las próximas décadas.

Se define la prevalencia como el número o proporción poblacional con una patología concreta durante un periodo de tiempo o en un momento

1. INTRODUCCIÓN

concreto. Se expresa normalmente como el número de pacientes diagnosticados con un tipo concreto de tumor que siguen vivos al cabo de un año del diagnóstico, a los 3 o a los 5 años. Se incluye por tanto a los pacientes que fueron diagnosticados en el pasado. La prevalencia es más elevada en los tumores con mayor supervivencia independientemente de que se diagnostiquen con más frecuencia.

El cáncer de pulmón es un tumor poco prevalente debido a su alta mortalidad que viene dada por el número de muertes ocurridas en un periodo de tiempo concreto y en una población determinada. Suele expresarse como el número de fallecimientos por año o como el número de fallecimientos por 100.000 personas por año.

De acuerdo con los datos de la Red Española de Registros de Cáncer, el cáncer es ya la segunda causa de muerte después de las enfermedades del aparato circulatorio en la población general española y la primera causa de muerte en varones en España. En 2020, 3 de cada 10 muertes en varones y 2 de cada 10 en mujeres en España fueron a causa del cáncer. En cifras supone 112.741 fallecimientos: 67.247 varones (26,9%) y 45.494 mujeres (18,6%). El tumor responsable del mayor número de muertes en 2020 en España en la población general fue el cáncer de pulmón (21.918 muertes). Siendo la primera causa de muerte por cáncer en el sexo masculino y la tercera en el femenino, después del cáncer de mama y del de colon (Tablas 1.3 y 1.4).

1. INTRODUCCIÓN

	Mujeres
Tumores	45.494
Tumor maligno de la mama	6.572
Tumor maligno de la tráquea, de los bronquios y del pulmón	5.303
Tumor maligno del colon	4.737
Tumor maligno del páncreas	3.603
Tumores malignos del tejido linfático, de los órganos hematopoyéticos y de tejidos afines, excepto leucemia	2.278
Tumor maligno de sitios mal definidos, secundarios y de sitios no especificados	2.169
Tumor maligno del ovario	2.036
Tumor maligno del estómago	1.971
Tumor maligno del hígado y vías biliares intrahepáticas	1.605
Tumor maligno de otras partes del útero	1.600
Tumor maligno del recto, de la porción rectosigmoide y del ano	1.502
Leucemia	1.461
Tumor maligno del encéfalo	1.304
Otros tumores malignos digestivos	1.287
Otros tumores de comportamiento incierto o desconocido	1.136
Tumor maligno de la vejiga	830
Tumor maligno del riñón, excepto pelvis renal	730
Otros tumores malignos de la piel y de los tejidos blandos	702
Tumor maligno del labio, de la cavidad bucal y de la faringe	691
Tumor maligno del cuello del útero	673
Melanoma maligno de la piel	424
Otros tumores malignos de las vías urinarias	370
Tumor maligno del esófago	362
Tumores malignos del hueso y de los cartílagos articulares	146
Otros tumores malignos respiratorios e intratorácicos	143
Tumor maligno de la laringe	97

	Hombres
Tumores	67.247
Tumor maligno de la tráquea, de los bronquios y del pulmón	16.615
Tumor maligno del colon	6.394
Tumor maligno de la próstata	5.922
Tumor maligno del páncreas	3.824
Tumor maligno de la vejiga	3.593
Tumor maligno del hígado y vías biliares intrahepáticas	3.416
Tumor maligno del estómago	2.946
Tumores malignos del tejido linfático, de los órganos hematopoyéticos y de tejidos afines, excepto leucemia	2.733
Tumor maligno de sitios mal definidos, secundarios y de sitios no especificados	2.565
Tumor maligno del recto, de la porción rectosigmoide y del ano	2.492
Leucemia	1.902
Tumor maligno del encéfalo	1.707
Tumor maligno del labio, de la cavidad bucal y de la faringe	1.708
Tumor maligno del esófago	1.461
Tumor maligno del riñón, excepto pelvis renal	1.386
Otros tumores de comportamiento incierto o desconocido	1.293
Otros tumores malignos digestivos	1.221
Otros tumores malignos de las vías urinarias	1.218
Tumor maligno de la laringe	1.084
Otros tumores malignos de la piel y de los tejidos blandos	967
Melanoma maligno de la piel	655
Otros tumores malignos respiratorios e intratorácicos	359
Tumores malignos del hueso y de los cartílagos articulares	182
Tumor maligno de la mama	79

MORTALIDAD POR TUMORES

	Ambos Sexos	Hombres	Mujeres
1º	Pulmón	Pulmón	Mama
2º	Colon	Colon	Colon
3º	Mama	Próstata	Pulmón
4º	Páncreas	Vejiga	Páncreas
5º	Próstata	Estómago	Estómago

Tablas 1.3 y 1.4: causa de mortalidad por tipo de cáncer.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbi-mortalidad del mundo, con prácticamente 10 millones de muertes relacionadas con tumores en el año 2020, de acuerdo con los datos proporcionados por la OMS. El tumor responsable del mayor número de fallecimientos a nivel global fue el cáncer de pulmón con 1,8 millones de muertes, 600.000 mujeres y 1,2 millones de hombres [27].

Las estimaciones sobre el número de fallecidos por cáncer de pulmón hechas por las Naciones Unidas para el año 2040 son poco alentadoras; aumentará en más del 62% según muestran los datos ofrecidos por GLOBOCAN 2023.

La supervivencia se define como el porcentaje de pacientes con una patología en concreto vivos con respecto a la población sana a un determinado periodo de haber sido diagnosticados de la enfermedad.

Aunque la supervivencia de los pacientes con cáncer en España se ha duplicado en los últimos 40 años, no es así para el cáncer de pulmón. A la dificultad de realizar un diagnóstico precoz en el cáncer de pulmón, hay que añadir el hecho de que esta neoplasia tiene la característica de diseminarse rápidamente a otros órganos, lo que aboca en una supervivencia muy baja en comparación con otros tipos de cáncer. Según los últimos datos publicados por REDECAN y EURO CARE-5, solo un 15% de los pacientes que sufren un cáncer de pulmón sobreviven más de 5 años. De acuerdo con datos del SEER 2005-2011 del NCI, el porcentaje de supervivencia a 5 años en pacientes con cáncer de pulmón en Estados Unidos es de 17,4% una cifra, aunque algo superior, también muy baja (NCI, 2015).

El cáncer de pulmón es una de las patologías tumorales con mayor incidencia (12%) y mortalidad (21%) y con una muy baja prevalencia a 5 años (5%).

Con estas cifras, queda patente que el cáncer de pulmón supone una patología grave que afecta a un número de personas cada vez mayor en ambos sexos y que supone un problema de salud de primer nivel al que hay que dedicar todos nuestros esfuerzos para paliar.

1.1.3. Diagnóstico

El cáncer de pulmón se diagnostica generalmente de forma tardía debido, principalmente, a su escasa sintomatología en la mayoría de los casos y a su localización en órganos internos que puede suponer un hándicap añadido. Más del 70% de los NSCLC se diagnostican cuando ya se han diseminado las células tumorales a los ganglios linfáticos (estadío IIA o IIB).

Los síntomas más comunes que cursan con la enfermedad incluyen tos seca, pérdida de peso, hemoptisis (tos con sangre en esputo), disnea (dificultad para respirar), bronquitis o neumonías recurrentes y dolor pectoral, todos ellos existentes en otras patologías de las vías aéreas diferentes al cáncer.

1.1.3.1. Diagnóstico histopatológico

El diagnóstico en base a las clasificaciones existentes, tanto histopatológicas como genéticas y moleculares, guarda una relación directa con la evolución natural de la enfermedad y el pronóstico de la misma. Un buen diagnóstico es, por tanto, crucial en el manejo terapéutico de los pacientes de cáncer de pulmón.

Son bastante comunes los casos en los que no se puede realizar una buena biopsia a los pacientes debido a la complicada localización del tumor (por proximidad o invasión de una vía mayor, de la pleura, etc.), por su pequeño tamaño (en la mayoría de los casos los nódulos tumorales son

inferiores a 1cm), por los riesgos asociados a la intervención (neumotórax, hemorragia, hemoptisis, etc.) o estado de salud general del paciente. Aunque en base a las pruebas de radiodiagnóstico se consigue un prediagnóstico preciso, el hecho de no conseguir material tumoral suficiente impide realizar un diagnóstico final con un perfil genético completo y robusto, limitando de esta forma en algunas ocasiones las opciones de tratamiento, conocimiento del pronóstico y seguimiento del curso de la enfermedad.

1.1.3.2. Inmunohistoquímica

Para realizar un diagnóstico histopatológico inequívoco es necesario ampliar el estudio microscópico con técnicas de inmunohistoquímica, en base a la presencia o ausencia de expresión proteica de marcadores característicos. Se ha consensuado que el marcador de mayor utilidad para diferenciar carcinomas escamosos de los adenocarcinomas (u otros) es el TTF-1, que es positivo en adenocarcinomas. En cambio, los carcinomas de células escamosas son positivos para la proteína p63 y para citoqueratina 5/6. La pareja de anticuerpos más aceptada en la literatura es la formada por los dirigidos frente a TTF-1 y p63, junto a otros como la napsina39 [28]. Otros marcadores utilizados para las células tumorales en un adenocarcinoma son citoqueratina 7 (positiva) y citoqueratina 20 (negativa); las del carcinoma epidermoide son negativas para TTF1 y las citoqueratinas 7 y 20 pero positivas frente a las citoqueratinas 5/6 y p63; mientras que los marcadores que determinan el subtipo neuroendocrino son NSE, cromogranina, sinaptofisina y CD56 [29].

La inmunohistoquímica se emplea también para detectar las proteínas presentes en los tumores que pueden ser diana terapéutica. Con la explosión de conocimiento en el campo de la inmuno-oncología de la última década, el número de dianas se ha visto aumentado de forma esperanzadora. Es el caso de PD-L1, ALK o ROS1, que se realizan de rutina a todos los NSCLC.

1.1.3.3. Diagnóstico molecular

A día de hoy, aunque básica, ya no es suficiente la distinción entre adenocarcinoma y carcinoma escamoso para la toma de decisiones clínicas. El descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas asociadas a alteraciones genéticas, junto al cada vez mayor número de ensayos clínicos en los que se testa la eficacia de los tratamientos dirigidos a subtipos de cáncer de pulmón definidos en base a su biología, están imponiendo la necesidad de realizar diagnósticos precisos en este tipo de cáncer. Esta precisión diagnóstica empuja a un cambio de enfoque de esta enfermedad a patólogos y oncólogos, que deben además trabajar con estas nuevas entidades.

En el diagnóstico molecular del cáncer de pulmón se realizan las pruebas de determinación de mutaciones en genes diana para los que existe una terapia dirigida, son indicadores de pronóstico o de predicción a un tratamiento. Se sabe que estas mutaciones genéticas juegan un papel crítico en la progresión del cáncer de pulmón hacia una enfermedad metastásica. Para poder administrar el fármaco, el paciente debe cumplir los perfiles para los que el medicamento está diseñado, de lo contrario, no solo no es eficaz, si no que incluso puede ser perjudicial por sus efectos secundarios.

La guía de la National Comprehensive Cancer Network de NSCLC recomienda realizar pruebas para siete biomarcadores susceptibles de terapias dirigidas [30]. Actualmente es obligatorio realizar las siguientes determinaciones para un correcto diagnóstico molecular: mutaciones en EGFR, KRAS, RET y BRAF, translocaciones en ROS1, ALK y NTRK1/2/3, skipping del exón 14 en TME, y tinción inmunohistoquímica de PD-L1. Se determina la existencia de mutaciones en genes cuyo estado mutacional está relacionado con la toma de decisiones clínicas ya sea por la existencia de un fármaco asociado o por ser indicativos de pronóstico, crecimiento del tumor o incluso respuesta a otras terapias. Se han identificado varios receptores de tirosina

quinasas (RTK) entre los que se incluyen los genes EGFR, HER2, RET, ALK, ROS1 y MET, como dianas terapéuticas en el cáncer de pulmón de células no pequeñas. Muchos otros genes implicados en cáncer están siendo investigados para valorar su posible uso en terapias (RRM1, ERCC1, ERBB1, AKT-1, MAP2K1, MEK, etc.) [31]; [32].

1.1.4. Tratamientos actuales

A pesar de las mejoras realizadas en el diagnóstico y la aparición de nuevas terapias dirigidas durante los últimos 15 años, la prognosis para pacientes con cáncer de pulmón es todavía muy pobre. El tratamiento que va a seguir un paciente va a variar según el tipo de tumor, su perfil biológico, estadio en el que se encuentra y las características del paciente. Actualmente, el cáncer de pulmón puede tratarse con cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y/o fármacos contra nuevas dianas biológicas, tanto para atajar el crecimiento tumoral como para paliar los síntomas de la enfermedad.

Los cánceres de pulmón microcíticos y los no microcíticos tienen distintos tratamientos puesto que se originan de células con orígenes diferentes, sufren procesos patogénicos diferentes y acumulan diferentes mutaciones.

Hasta la fecha, después de un diagnóstico de cáncer de pulmón, las únicas técnicas disponibles para controlar la progresión de la enfermedad, que no sean los síntomas clínicos, son las tomografías axiales computerizadas (TAC) periódicas. En casos de pacientes con cáncer de pulmón avanzado, las TAC de vigilancia pueden demostrar la progresión de la enfermedad. Repetir las biopsias de estas lesiones recurrentes/ progresivas nos permite determinar los mecanismos de resistencia a fármacos de terapias dirigidas. Este tipo de vigilancia puede pasar por alto la recurrencia/ resistencia temprana y la identificación de la enfermedad metastásica tratable, hecho que se podría evitar con la biopsia líquida. Además, repetir las biopsias es un método

invasivo, doloroso para el paciente y no exento de riesgos [33], aunque a veces necesario.

En los NSCLC el tratamiento varía dependiendo del estadio en que se encuentre el tumor. En estadios I y II se opta por la cirugía siempre y cuando el tumor sea accesible. En caso contrario se administra radioterapia y en el estadio II se acompaña de quimioterapia adyuvante. En tumores en estadio III, donde más del 70% de los casos de NSCLC son diagnosticados, se recomienda cirugía si es operable. Cuando no puede ser extirpado mediante cirugía se realiza radioterapia o quimioterapia. En el estadio IV, que representa un 40% de los nuevos casos diagnosticados de NSCLC, el tratamiento estándar incluye terapia de radiación en combinación con quimioterapia, o quimioterapia y terapia dirigida. La quimioterapia se compone de cisplatino o carboplatino y taxanos como docetaxel y la terapia dirigida es bevacizumab [4].

Los casos de SCLC tienen una mala solución quirúrgica, por lo tanto, en la etapa limitada, el tratamiento aplicado consiste en quimioterapia concomitante y radioterapia. En la etapa expandida, el tratamiento recomendado es únicamente quimioterapia como cisplatino o carboplatino junto con etopósido o irinotecán. Es frecuente que en estos tumores aparezca diseminación al sistema nervioso central, aplicándose en estos casos irradiación craneal profiláctica. Aproximadamente el 40% de los pacientes presentan estadio limitado y la mayoría, un 60%, se encuentran en estadio expandido[34].

Ha surgido un nuevo interés hacia los tratamientos biológicos o dirigidos diseñados para bloquear la célula de forma específica en vez de destruirla. Están principalmente enfocados a bloquear la generación y transmisión de señales de crecimiento y la neoangiogénesis. El funcionamiento de estos fármacos se focaliza en proteínas de la membrana plasmática o del citoplasma que favorecen la progresión tumoral, a las que se unen o bloquean sin afectar

al ADN nuclear. Para el tratamiento del cáncer de pulmón en combinación con quimioterapia se puede aplicar el uso Erlotinib que se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); Bevacizumab que se une al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) bloqueando de esa manera la angiogénesis. Crizotinib va dirigido contra el biomarcador ALK bloqueando una vía de señalización que promueve la división celular descontrolada [35].

La aparición en escena de estos y otros muchos fármacos biológicos, ha enriquecido el algoritmo de tratamiento lo que implica que se ha abierto el abanico de opciones terapéuticas. El manejo óptimo de los pacientes con NSCLC requiere que los tumores sean seleccionados para una serie de biomarcadores predictivos y pronósticos que permiten predecir la sensibilidad a una terapia dirigida en particular y estimar el pronóstico del paciente [36]. Los estudios se centran principalmente en las mutaciones del gen EGFR y en la fusión anormal del gen ALK que se inhibe con éxito con una serie de medicamentos inhibidores de tirosina quinasa (TKI) contra tumores EGFR mutados y Crizotinib contra tumores ALK mutados.

Durante la carcinogénesis se producen cambios genéticos y epigenéticos, induciendo al cáncer a convertirse en dependiente o "adicto" a la función continua de estos cambios. Además, debe hacer otras adaptaciones celulares, incluyendo mutaciones, para minimizar el "estrés oncogénico" inducido por estos cambios. Aunque las proteínas "oncogénicas mutadas" son posibles dianas terapéuticas, las otras adaptaciones celulares que están presentes en células tumorales, pero no en las normales, también se convierten en blancos terapéuticos específicos de cáncer. El cáncer necesita tanto los cambios oncogénicos como las adaptaciones celulares para tolerar esos cambios oncogénicos. Por lo tanto, ambos son objetivos terapéuticos potenciales [37][14].

Entre los 9 y 12 meses, en la mayoría de pacientes tratados con inhibidores de quinasas, se desarrollan resistencias a estos tratamientos, obligando al oncólogo a redirigir el tratamiento hacia otras estrategias que veremos más adelante [38].

1.2. Transición epitelio-mesénquima (TEM)

La transición epitelio-mesénquima (TEM) y el proceso reverso, la transición mesénquima-epitelio (TME), son procesos biológicos de plasticidad celular intrínsecos a las células por los que éstas pueden cambiar de forma dinámica su fenotipo de epitelial a otro más mesenquimal. La TEM/ TME es crítica para el desarrollo embrionario durante la formación de tejidos y órganos, la gastrulación, la formación de la cresta neural, entre otros muchos procesos[39]. Pero también tiene un papel fundamental en procesos fisiológicos normales como en la remodelación tisular, la curación de heridas, la fibrosis, etc. Además, como se ha visto en estos últimos años, la TEM juega un papel crucial en la progresión y la invasión tumoral [40].

Durante la TEM, las células sufren cambios fenotípicos en su estado de diferenciación y polaridad, así como cambios funcionales, aumentando su motilidad y otorgándoles de esta manera la posibilidad de migrar e invadir tejidos lejanos. Gracias a la TME, el proceso se revierte permitiendo a la célula asentarse en una localización diferente a su localización original en cuanto encuentra un microambiente favorable.

1. INTRODUCCIÓN

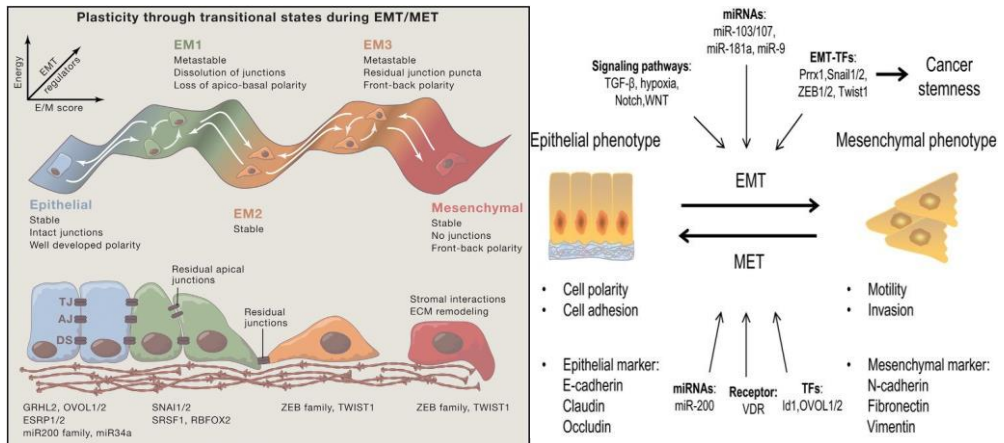


Figura 1.2: plasticidad celular en la transición epitelio-mesénquimal y mesénquimo-epitelial.[41]

El modelo reduccionista proponía que el cambio en la expresión de los marcadores epiteliales era dramático, poco plástico y no contemplaba los estados de TEM parciales, fenotipos intermedios “metaestables”, híbridos entre epiteliales y mesenquimales que hoy ya se sabe que existen (Figura 1.2) [42]; [43]. Los mecanismos que gobiernan las fases intermedias de la TEM no son lineales pues involucran a múltiples procesos y ocurren a diferentes niveles: epigenética, transcripción génica, localización celular, etc.

Así, la TEM se ejecuta en respuesta a factores de señalización pleiotrópicos que inducen la expresión de factores de transcripción específicos, miRNAs y regulación epigenética. El inicio y progresión de la TEM involucra a diferentes vías de señalización molecular y la señalización entre ellas. Se ha descrito la participación de vías como la vía TGF β –SMAD3, WNT– β -catenin, Notch, PI3K–AKT, NF- κ B, EGF y FGF, RAS-MAPK, AKT, entre otras.

1.2.1. Mecanismos celulares y moleculares de la TEM

A nivel celular, la TEM se caracteriza por la desaparición de uniones celulares y la remodelación del citoesqueleto en las células epiteliales, causando la pérdida de su polaridad apical-basal.

Para dar inicio y completar la TEM, diversos procesos moleculares son necesarios. Entre estos, y aun sin ser los únicos, se incluye la activación de factores de transcripción, la expresión de proteínas específicas en la superficie celular y la reorganización y expresión de proteínas del citoesqueleto. Muchos de los factores involucrados son también utilizados como biomarcadores para demostrar la transición de una célula epitelial al fenotipo mesenquimal por medio del proceso de TEM. (Figura 1.3).

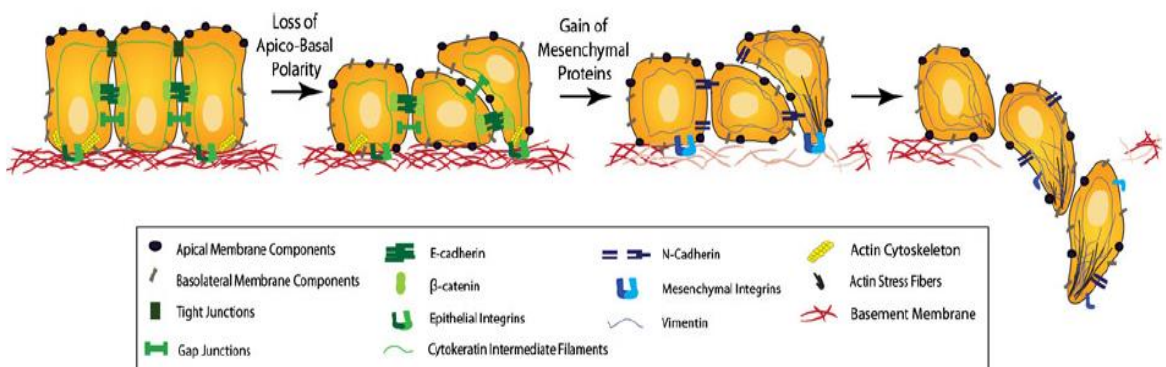


Figura 1.3: TEM y plasticidad epitelial. (Imagen modificada de [44]).

La TEM integra una serie de cambios en las células basales epiteliales que empieza con la disolución de uniones laterales célula-célula, uniones tipo estrechas (*tight*), uniones GAP y adherentes y pérdida de desmosomas, así como las uniones de adhesión de matriz celular a la membrana basal (hemidesmosomas). Consecuentemente, hay una pérdida de la polaridad apical-basal y se aboca finalmente a una degradación de la membrana basal.

Las proteínas de la superficie celular como E-cadherina e integrinas epiteliales que median las uniones intercelulares y uniones de las células con la membrana basal son reemplazadas por otras proteínas como N-cadherina que marcan el cambio a fenotipo mesenquimal. Así mismo, elementos del citoesqueleto son reorganizados y la actina del citoesqueleto es reemplazada por fibras de estrés de actina, los filamentos intermedios de citoqueratina son reemplazados por vimentina y las integrinas de unión son absorbidas por endocitosis. La membrana basal es degradada y la célula, libre de contactos, se mueve y es capaz de invadir el estroma. El conjunto de estos cambios lleva a la transición de una célula poligonal a una célula de morfología fusiforme. [44].

A nivel molecular, entre los eventos característicos de la TEM se incluye la pérdida de función o expresión de E-cadherina, la reducción de proteínas de uniones estrechas como las ocludinas, las claudinas y las citoqueratinas. Paralelamente, hay un aumento de expresión de marcadores mesenquimales como vimentina, fibronectina, α -actina de músculo liso (α -SMA) y N-cadherina [45].

Las células en proceso de TEM son capaces de degradar la membrana basal, producir una gran cantidad de componentes de la matriz extracelular, migrar y resistir la senescencia y la apoptosis [46].

Los marcadores celulares epiteliales y mesenquimales comúnmente utilizados para investigación están perfectamente caracterizados. Para el fenotipo epitelial cabría resaltar como marcador distintivo la E-cadherina y la citoqueratina. De igual manera, para el fenotipo mesenquimal, sus marcadores más distintivos serían la vimentina, la α -SMA y la N-cadherina, entre otros. Existen, como ya se ha apuntado, estadios intermedios o de transición donde únicamente una parte de las células ha pasado por TEM [47].

1.2.2. TGF β : señalización mediada por la superfamilia de ligandos

El *transforming growth factor-beta* (TGF- β) pertenece a una superfamilia de proteínas, las citoquinas, que controlan numerosas funciones biológicas. Existen tres isoformas de esta proteína siendo la TGF- β 1 la de mayor rango de funciones. Están implicadas en proliferación, apoptosis, diferenciación celular, hematopoyesis, angiogénesis, migración, entre otras, y tienen un papel fundamental en el desarrollo y la embriogénesis. El TGF- β puede ser activado por diferentes vías, como la vía de señalización dependiente de Smad y la independiente de Smad. Y puede inducir la activación de la TEM, migración y supervivencia de la célula [48][49]. De igual manera, el reordenamiento del citoesqueleto, polaridad celular y migración celular se regulan bajo la acción del TGF- β . Diversos estudios han mostrado que la estimulación de TGF- β en cultivos de células derivadas de carcinomas puede activar el proceso de TEM [50][51][52][53][54]. Esta proteína juega un rol importante en la activación de la red transcripcional induciendo la expresión de reguladores clave de TEM, entre ellos la familia de proteínas Snail y Slug, entre otros. El TGF- β es un importante supresor de proliferación de células epiteliales y, por lo tanto, de la tumorigénesis. Sin embargo, en algunos contextos puede ser también un regulador positivo de progresión tumoral y metástasis. Existen numerosos estudios *in vitro* que han demostrado que TGF β puede inducir TEM en algunos tipos de células cancerígenas [55]. En fases tardías de los tumores, la señalización con TGF β es redirigida pasando de suprimir la proliferación celular a activar el programa celular de la TEM, el proceso que confiere a las células cancerosas capacidades asociadas con un alto grado de malignidad [13].

La señalización mediada por ligandos de la familia TGF- β constituye la ruta inductora de TEM mejor caracterizada a través de las quinasas similares

a receptores de activinas (ALKs). Entre estos ligandos destacan las tres isoformas del TGF- β , particularmente, el TGF- β 1 media la progresión y la invasión tumorales. Esta señalización se produce a través de la formación de un complejo heterotetramérico de los receptores TGF- β tipo I y II (TGF- β RI y TGF- β RII), de los cuales existen varias copias en mamíferos. Cuando se produce la unión con el ligando, el TGF- β RII transfosforila al TGF- β RI, permitiendo su actividad quinasa. El receptor TGF- β tipo III (β -glicano y endogлина) y proteínas accesorias (como Cripto) modulan la afinidad de la unión al ligando [56][45].

En condiciones fisiológicas, el TGF- β tiene un papel inhibidor del crecimiento celular que previene el cáncer. Sin embargo, las células tumorales son insensibles a esta regulación del crecimiento. En muchos tipos de cáncer, esto se debe a la aparición de mutaciones en sus receptores o en sus principales proteínas mediadoras. En otros casos se debe a la expresión del inhibidor de proteínas de unión a DNA1 (ID1) y oncoproteínas, o puede que las rutas de señalización independientes de TGF- β lleguen a superar la acción antitumoral inicial de esta citoquina [57].

La vía TGF- β estimula varias redes de señalización involucradas en la determinación, crecimiento y diferenciación celular. Además, algunos de sus miembros pueden inhibir el crecimiento e inducir apoptosis en un gran número de tipos de células, especialmente células epiteliales [45].

La señalización mediada por los ligandos del TGF- β es traducida a través de un complejo de receptores celulares de superficie entre los que se destacan el T β RI (receptor beta tipo I) y el T β RII (receptor beta tipo II), que tienen actividad proteína quinasa en su dominio citoplasmático y forman heterodímeros para ser activos [45] [58]. Además, se ha reportado la existencia del T β RIII (receptor beta tipo III), que contribuye a mejorar la afinidad del T β RII por los respectivos ligandos. En mamíferos existen siete

receptores tipo I (ALK-1-7) y cinco receptores tipo II, por lo tanto, una gran variedad de combinaciones heteroméricas han sido reportadas. La unión del ligando estabiliza la formación de un complejo receptor tetramérico, constituido por un par de receptores tipo I y un par de receptores tipo II, en el cual los receptores tipo II con su respectiva actividad quinasa fosforila a los receptores tipo I. El receptor II tiene una actividad quinasa constitutiva. La unión del TGF- β al T β RII es reconocida por el receptor T β RI, uniéndose a él para formar un complejo. A continuación, el receptor T β RI es fosforilado por el T β RII, lo que estimula su actividad serina-treonina quinasa, con la subsiguiente fosforilación de distintas proteínas que actúan como efectores intracelulares; a partir de este punto existen dos vías por las cuales los miembros de la familia del TGF- β pueden desencadenar la respuesta celular: éstas son las vías de señalización dependiente de proteínas Smad y la independiente de proteínas Smad.

La vía de señalización dependiente de Smad (figura 1.4), involucra a las proteínas Smad 2 y 3 que, tras ser fosforiladas por el receptor T β RI activado, se unen a otro miembro de la familia, el Smad 4. Como resultado se produce su translocación al núcleo, donde interacciona de forma célula-específica con otros factores de transcripción, para finalmente regular la expresión génica mediante la acción de un conjunto de factores de transcripción considerados los “*TEM master genes*” (genes maestros de la TEM). Estos “*TEM master genes*” incluyen a Snail 1/2, Twist y ZEB 1/2 [59] y median la represión de E-cadherina, un evento crítico en el desarrollo de la TEM. Snail 1 (Snail) y Snail 2 (Slug) se unen al promotor del gen CDH1, codificante de E-cadherina, para reprimir su transcripción [60]. Twist regula la transcripción del gen SNAI2, codificante de Slug, de forma concertada con el complejo represor Polycomb 2 (PRC2) para reprimir la E-cadherina, así como también al inhibidor del ciclo

celular p16INK4 α [61]. Además, Twist es responsable de la expresión de varios miRNAs mediadores de la inhibición de la expresión de HOXD1 y así de sus genes diana, como RhoC, con un papel en la remodelación del citoesqueleto y la metástasis del cáncer. ZEB 1 y 2 se unen a las regiones bipartidas de la caja E que flanquean al gen CDH1 para reprimir su expresión [62]

Además, la expresión ectópica de ZEB induce la disociación de uniones adherentes por la represión de genes codificantes de placofilina-2 y ZO-3 [63]. También aumentan la expresión de genes codificantes de metaloproteinasas [64]. Pero la abundancia de ZEB en el promotor de CDH1 puede ser regulada por la familia de miRNAs (miR-200) y, a su vez, ZEB se une a la caja E de los promotores de miR-200 para crear un bucle de retro-alimentación que controla la TEM. La expresión de miR-200 intensifica la recolonización de células metastásicas, por lo que este bucle regulador es importante para mantener el fenotipo mesenquimatoso y demuestra la reversibilidad de la TEM [65].

No obstante, existen genes mesenquimales que no requieren la actuación de factores de transcripción y su expresión se activa directamente a través de la acción de Smad, como ocurre en los genes codificantes de vimentina, fibronectina y colágeno tipo I [47]; [66].

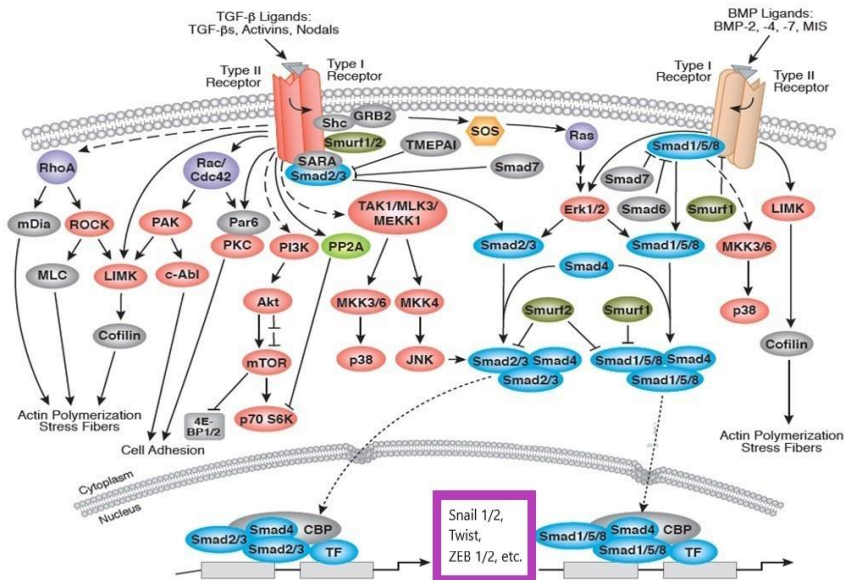


Figura 1.4: señalización dependiente de Smad (Modificado de [55]).

El TGF- β también activa otras cascadas de señalización independiente de Smad. Éstas incluyen MAPK tales como ERK, JNK (c-Jun-N-terminal quinasa) y p38 [67]. Se ha sugerido que TGF- β es capaz de inducir apoptosis mediante la producción de especies reactivas de oxígeno o activando las rutas JNK o de DAP quinasa (DAPK: Proteína quinasa asociada a muerte), así como interfiriendo con algunas rutas de supervivencia (como la fosfatidilinositol-3-quinasa, PI3-K), activando finalmente la ruta mitocondrial de la apoptosis. La señalización del TGF- β independiente de Smad incluye las rutas mediadas por Rho GTPasas, PI3K-Akt y MAPK. La activación de Rho, Rac y Cdc42 GTPasas conduce a la reorganización de actina y la formación de lamelipodios y filopodios [59]. Cabe mencionar que en un estadio temprano de la TEM se induce la expresión de PAR6, provocando el cambio en la polaridad apical-basal de las células al desencadenar la disolución sus uniones a través de RhoA, y una vez cumplida esta función, se degrada [68].

En cuanto a Akt, es activado por PI3K y resulta en la activación del complejo TOR de mamíferos. mTORC1 contribuye al incremento del tamaño celular, la síntesis proteica y la motilidad [69], mientras que mTORC2 es necesario para la migración y la invasión de las células mesenquimales. Akt también bloquea a GSK3 β y a la familia miR-200, causando la estabilización de Snail1 como represor de varios genes y evitando la inhibición de ZEB1/2, respectivamente [69].

Las rutas MAPK activadas por TGF- β incluyen a quinasas como ERK, p38 o JNK, si bien la actividad de estas rutas es más potente al ser activadas por receptores tirosina quinasa (RTKs). La señalización por ERK incrementa la transcripción inducida por TGF- β e inhibe a GSK3 β [70]. Y en cuanto a la señalización por p38 y JNK, induce la expresión de quinasas para su cooperación con Smad 3/4 [66].

La señalización de TGF- β mediada por las rutas de Smad o independiente de Smad, puede inducir la expresión directa o indirectamente de reguladores clave de la TEM. Estos factores incluyen Snail, Slug, ZEB1/delta EF1 y ZEB2/SIP1 los cuales son capaces de iniciar una red transcripcional coordinada que resulta en una supresión de marcadores de expresión epiteliales y un aumento en la expresión de marcadores mesenquimales.

Como resultado, las células cancerosas pierden uniones estrechas y de adhesión sufren una remodelación dramática del citoesqueleto y adquisición de características mesenquimales. Estas células tumorales de tipo fibroblástico y fusiforme exhiben un potencial aumentado de migración e invasión que les permite entrar a la circulación sanguínea a través de la membrana basal y así iniciar su metástasis a órganos distales [57] (Figuras 1.5 y 1.6).

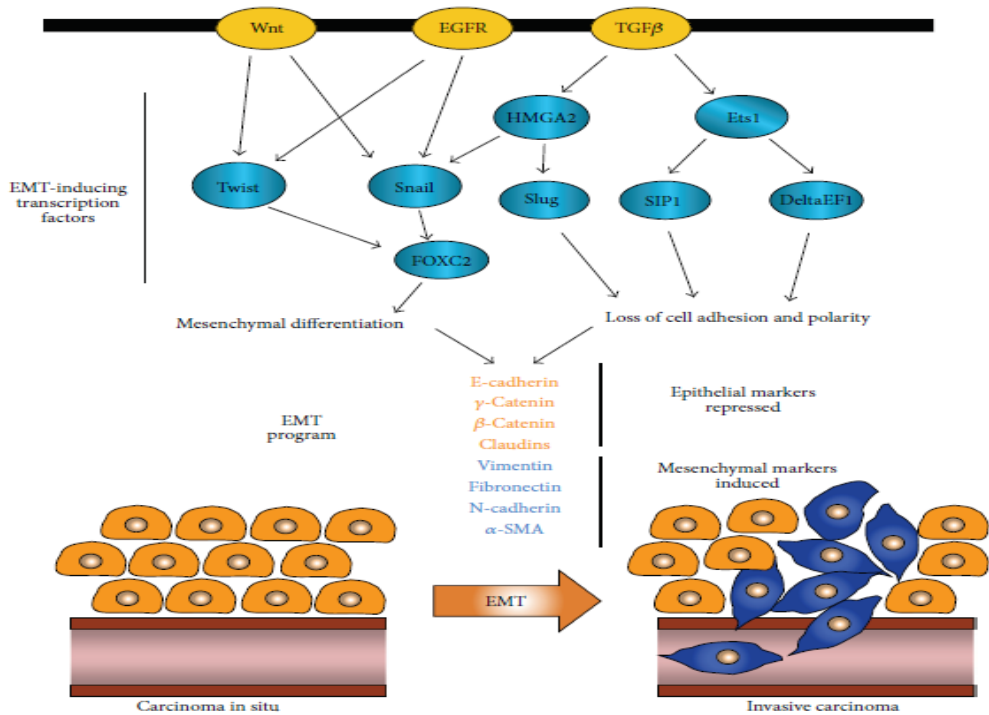


Figura 1.5: Activación de la TEM y proceso de metástasis [57].

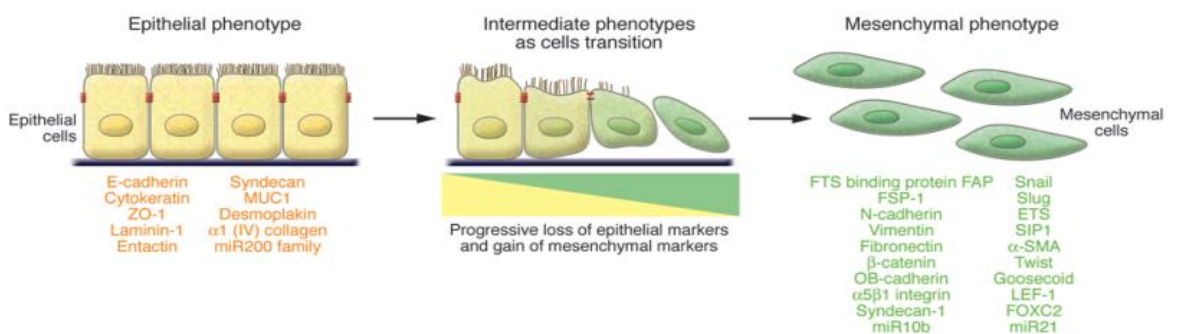


Figura 1.6: Principales marcadores involucrados en el proceso de la TEM [47]: Los marcadores celulares epiteliales y mesenquimales comúnmente utilizados para investigación están listados. Se observa el fenotipo epitelial con sus marcadores distintivos resaltando E-cadherina y citoqueratina. De igual manera se indica un fenotipo intermedio o de transición donde únicamente

una parte de las células ha pasado por TEM. También se representa el fenotipo mesenquimal y sus marcadores como vimentina, α -SMA, entre otros.

1.2.3. TEM y cáncer

La heterogeneidad molecular en los tumores surge de diferentes mutaciones *driver* o de vías de señalización alteradas. El tejido de origen también puede influir en la ejecución de la TEM. Cada tipo de cáncer tiene una propensión distinta a exhibir diversos estados TEM. Así, los cánceres que provienen de linajes del mesodermo o de células neurales muestran mayor perfil fenotípico TEM [41]

Durante el desarrollo tumoral, las células cancerígenas adquieren capacidades que les permiten mantener una proliferación continua, evadir la supresión de crecimiento, invadir tejidos y formar metástasis [13]. Una característica importante en la progresión de los carcinomas es la pérdida del fenotipo epitelial y la adquisición de características mesenquimales, las células tumorales sufren TEM/ MET [71]. Durante la TEM, las células cancerosas, además de modificar su repertorio adhesivo, pasan por cambios morfológicos de células epiteliales con polaridad apical-basal a fenotipos mesenquimales fusiforme con varias proyecciones migratorias que son requeridas para la invasión celular y la migración.[72].

Existen marcadores que pueden ser utilizados para valorar el proceso de TEM en las células. Estos marcadores indicarán los cambios que se desencadenan en este proceso de modificaciones fenotípicas. Entre ellos destacamos las cadherinas que son proteínas epiteliales de adhesión. En la progresión tumoral, las cadherinas presentan una pérdida de regulación de su expresión. Concretamente, la pérdida de expresión o función de E-cadherina y ganancia de N-cadherina representa un evento clave durante la conversión de células cancerosas epiteliales a células mesenquimales ganando la

capacidad de invadir tejidos y metastatizar órganos distantes. Un evento a resaltar en la TEM observado en varios tumores de origen epitelial es la pérdida de la expresión de E-cadherina dependiente de represores transcripcionales como Snail, Slug, Zeb y Twist, todos ellos inducidos durante la TEM [71].

La vimentina es una proteína estructural del citoesqueleto. La sobreexpresión de vimentina en cáncer está asociada a un aumento de la capacidad migratoria e invasiva de las células cancerosas; es principalmente utilizada como marcador de TEM junto con otros marcadores de este proceso. Esta proteína está expresada en el epitelio bronquial en el feto y, dicha expresión, disminuye al aumentar la edad. En el epitelio bronquial de un adulto la expresión de vimentina está restringida principalmente a las células basales. En cáncer de pulmón se ha detectado sobreexpresión de vimentina en adenocarcinomas y carcinomas de células gigantes. En NSCLC la sobreexpresión de vimentina puede considerarse un predictor de baja supervivencia en estos pacientes [73].

Las células tumorales, para poder invadir a los tejidos circundantes, deben desprenderse del tumor primario. Para conseguirlo, rompen los contactos célula-célula y remodelan los sitios de adhesión de la matriz. Estos procesos se observan también en condiciones no patológicas como en procesos del desarrollo como la gastrulación o la migración celular de la cresta neural, donde las células epiteliales diferenciadas se des-diferencian para poder migrar a un sitio distante y luego se re-diferencian a células epiteliales para formar una nueva estructura. La modulación de las propiedades adhesivas, migratorias y citoesqueléticas desempeñan un rol esencial en la diseminación de las células tumorales [73]. La TEM provee un mecanismo para que las células tumorales abandonen el tumor primario e invadan el tejido

local y vasos sanguíneos y linfáticos dando inicio de esta manera a la metástasis (Figura 1.7) [44].

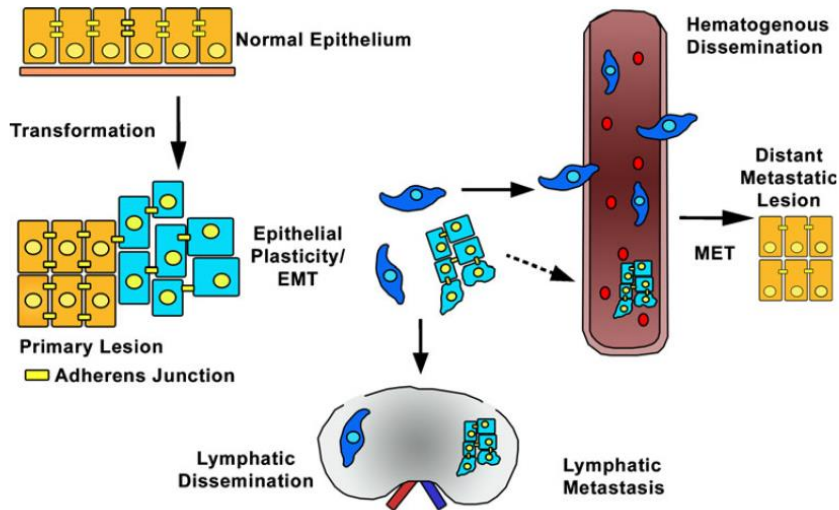


Figura 1.7: TEM y diseminación metastásica [44].

Durante la formación del tumor primario los cambios genéticos y epigenéticos en las células tumorales junto con las alteraciones en el microambiente tumoral promueven la TEM. La plasticidad epitelial y la TEM permiten a las células tumorales a liberarse de las células que las rodean e invadir los tejidos circundantes como células individuales o como *clusters* de células. Esta invasión local promueve la diseminación metastásica y se extiende hacia los nódulos linfáticos o vasos sanguíneos.

Un análisis del perfil de los marcadores de TEM en el que se encuentran las células de un tumor se postula como algo esencial para conocer el

pronóstico de la enfermedad, la progresión y abre un abanico de grandes oportunidades diagnósticas para los pacientes.

1.3. Sistema endocannabinoide

1.3.1. Sistema endocannabinoide o endocannabinoidoma

Complejidad, redundancia y promiscuidad podrían ser las tres características que mejor definen el sistema endocannabinoide o, como se le define actualmente, el endocannabinodoma.

El sistema cannabinoide endógeno está constituido, entre otros componentes, de al menos dos tipos de receptores unidos a proteínas G, los receptores de cannabinoides tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2), sus ligandos lipídicos intrínsecos (agonistas endógenos para estos receptores conocidos como endocannabinoides (eCBs)), entre los que se incluye la anandamida (AEA), y la maquinaria enzimática asociada, como los transportadores y las enzimas para su biosíntesis y degradación [74]. El sistema endocannabinoide está presente en vertebrados mamíferos y vertebrados no mamíferos y parece ser un sistema bien conservado entre especies y a lo largo de la evolución. Los endocannabinoides se encuentran presentes en diversos tejidos humanos como el sistema nervioso central, nervios periféricos, leucocitos, bazo, útero y testículos. Cumple por lo tanto numerosos roles en diferentes procesos fisiológicos [74].

La planta *Cannabis sativa* ha sido empleada durante miles de años en el ámbito médico, así como en el recreativo. Su consumo ejerce efectos psicoactivos porque actúa directamente sobre el sistema nervioso central y causa alteraciones en el estado de ánimo, la percepción y la conciencia, pero también tiene aplicaciones curativas como analgésico, antiinflamatorio, antiespasmódico y antiemético. Esta planta contiene tres clases principales de

moléculas bioactivas, los flavonoides, los terpenoides y los cannabinoides. Los cannabinoides son una familia de compuestos químicos complejos que llevan a cabo la mayoría de sus acciones al unirse y activar receptores específicos de proteínas G α i de los llamados receptores de cannabinoides, CB1 y CB2 [74]. De entre los más de 150 tipos de cannabinoides hasta ahora descritos, el compuesto más activo de esta planta es el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC, THC). Es también su principal componente psicotrópico y, aunque fue hallado en 1964, el descubrimiento del sistema endocannabinoide orquestado en su totalidad es mucho más reciente.

1.3.1.1. Receptores de cannabinoides

Los receptores de cannabinoides más estudiados son el CB1 (receptor central) y CB2 (receptor periférico) y tienen aproximadamente un 44% de homología. Tanto CB1 como CB2 son receptores acoplados a proteína G y tienen más de un ligando endógeno.

El receptor CB1 es un polipéptido de 476 aminoácidos. En humanos la ubicación genética del locus para este GPCR está en el cromosoma 6 posición 6q14-6q15 [75] y su secuencia está altamente conservada entre los vertebrados [76]. Los receptores CB1, clonados por primera vez del cerebro de rata en 1990 [77], están ampliamente distribuidos por todo el organismo encontrándose principalmente en el sistema nervioso central, en los ganglios basales, el hipocampo, la corteza y el cerebelo [78]. Estos receptores cumplen la función de mediadores de los efectos psicoactivos de los cannabinoides. Están presentes de forma abundante en áreas del cerebro relacionadas con el movimiento, el equilibrio, el dolor, la percepción sensorial, la cognición, la memoria, la emoción y las funciones autónoma y endocrina, así como también regulando el apetito en el hipotálamo, y la ingesta de alimento en centros de recompensa tales como el sistema límbico.

El receptor CB2 es un polipéptido de 360 aminoácidos, aislado por primera vez de células promielocíticas HL-60 en humanos en el año 1993, y está presente de igual manera en las terminaciones de nervios periféricos, así como en órganos extra-neurales como son los testículos, el útero, el endotelio vascular, los ojos, el bazo o el íleon, así como en tejidos importantes para el metabolismo energético como el adiposo, el hígado y el músculo esquelético [79]. Los receptores CB2 se expresan principalmente en el sistema inmune y en células de la periferia y así como en células neuronales. Se considera que la expresión de CB2 se restringe más a elementos particulares del sistema inmunológico, constituyendo un mediador en la liberación de citoquinas y en la migración de las células inmunes [80].

Se ha demostrado la participación de otros receptores en el cannabinoide, entre los que se incluyen los canales iónicos receptores transitorios de potencial (TRP) como TRPV1 y TRPM8, receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) alfa y gamma, receptores acoplados a proteína G huérfanos (GPR) como GPR55 o GPR18 [81], canales iónicos tales como los canales de calcio, canales iónicos de corriente de compuerta como los receptores de glicina, y receptores acoplados a proteína G no cannabinoicos como los receptores de acetilcolina muscarínicos (AChR) [82].

1.3.1.2. Cannabinoides

Los cannabinoides pueden ser clasificados en tres grupos en base a su fuente de producción: cannabinoides endógenos, fitocannabinoides y cannabinoides sintéticos (Figura 1.8).

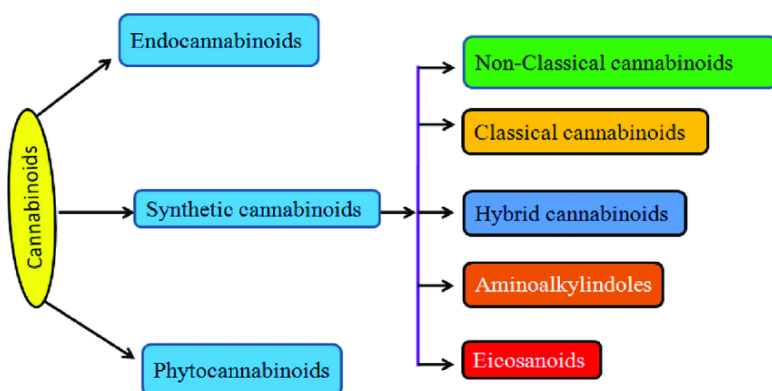


Figura 1.8: Cannabinoides y su clasificación según su disponibilidad en la naturaleza [83].

1.3.1.3. Endocannabinoides

Los ligandos endocannabinoides son mediadores lipídicos endógenos que imitan la acción del Δ^9 -THC, actuando como agonistas parciales de los receptores de este sistema y ejerciendo una función moduladora. Los endocannabinoides más bioactivos y mejor caracterizados son AEA [84] y 2-araquidonilglicerol (2-AG) [85], derivados del ácido araquidónico. Son considerados como los endocannabinoides principales en el cuerpo humano que actúan como potentes agonistas de los receptores CB1 y CB2. También existen otros tipos de cannabinoides que funcionan de un modo similar y pueden ayudar a volver a la homeostasis a un sistema endocanabinoide desregulado. Éstos son los fitocannabinoides, derivados de plantas, como el THC, el cannabidiol (CBD) o el cannabigerol (CBG), y los cannabinoides sintéticos, producidos artificialmente, como JWH133, WIN55212-2 o SR141716 [86].

1. INTRODUCCIÓN

Los endocannabinoides son producidos en nuestro cuerpo bajo demanda a partir de precursores fosfolipídicos cuya actividad depende de la activación de fosfolipasas específicas. Todos los endocannabinoides son eicosanoides, moléculas originadas de la oxidación de los ácidos grasos esenciales de 20 carbonos tipo omega-3 y omega-6. Estos endocannabinoides incluyen moléculas lipídicas con largas cadenas de ácidos grasos poliinsaturados, amidas, ésteres y éteres que se unen a los receptores CB1 y CB2 (Figura 1.9). Los endocannabinoides actúan como neuromoduladores o mensajeros retrógrados que afectan a la liberación de neurotransmisores en el tejido periférico y neural. Cumplen también un papel importante en la inflamación, sensibilidad a la insulina, metabolismo de grasas y energía [87].

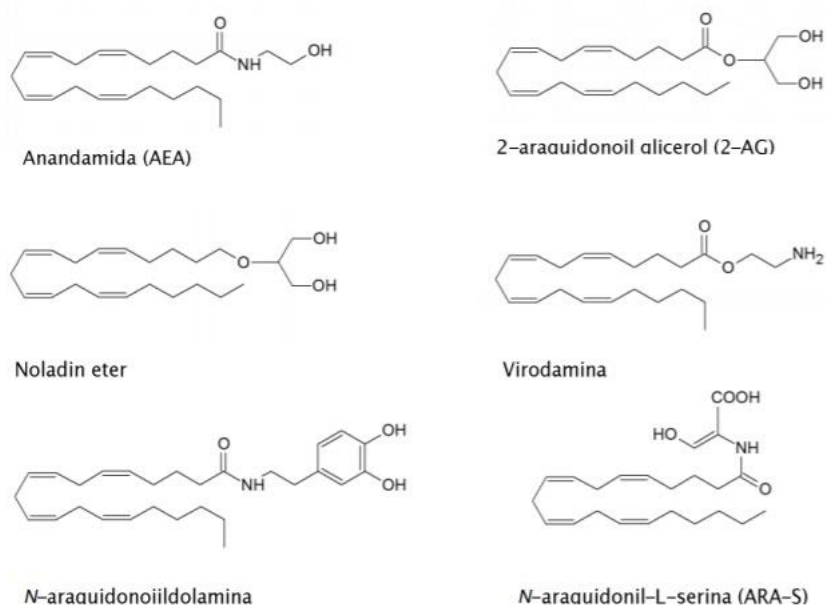


Figura 1.9: Principales endocannabinoides y endovanilloides. [88] .

La N-araquidonoilfosfatidiletanolaminafosfolipasa D tiene un papel integral en la biosíntesis de AEA, a partir de la cual se pueden seguir distintas

rutas hasta la producción de este ligando endógeno; mientras que la diacilglicerol lipasa (DAGL) es un enzima clave en la producción de 2-AG como responsable último de su formación. La degradación de estos ligandos está catalizada primariamente por la hidrolasa amida de ácidos grasos (FAAH) en el caso de AEA y, principalmente, por la monoacilglicerol lipasa (MAGL) en el caso de 2-AG. Además, la incorporación de los endocannabinoides del espacio extracelular al intracelular está mediada por transportadores de membrana de endocannabinoides, cuya identidad molecular no se ha establecido de forma concluyente [89]. Se ha visto que la proteína transportadora de esteroides 2 (SCP-2), se une a los endocannabinoides y puede regular sus concentraciones celulares [90]. Así, el sistema endocannabinoide puede ser activado por inhibidores de estos componentes del metabolismo celular y no sólo a través de los receptores (Figura 1.10).

Estos endocannabinoides afectan al estado de ánimo, apetito, sensación de dolor, memoria y la respuesta a la inflamación por mecanismos que no siempre cursan con la unión a los receptores CB1 o CB2. Hay flexibilidad en sus acciones, lo cual hace al sistema endocannabinoide complejo de entender [80].

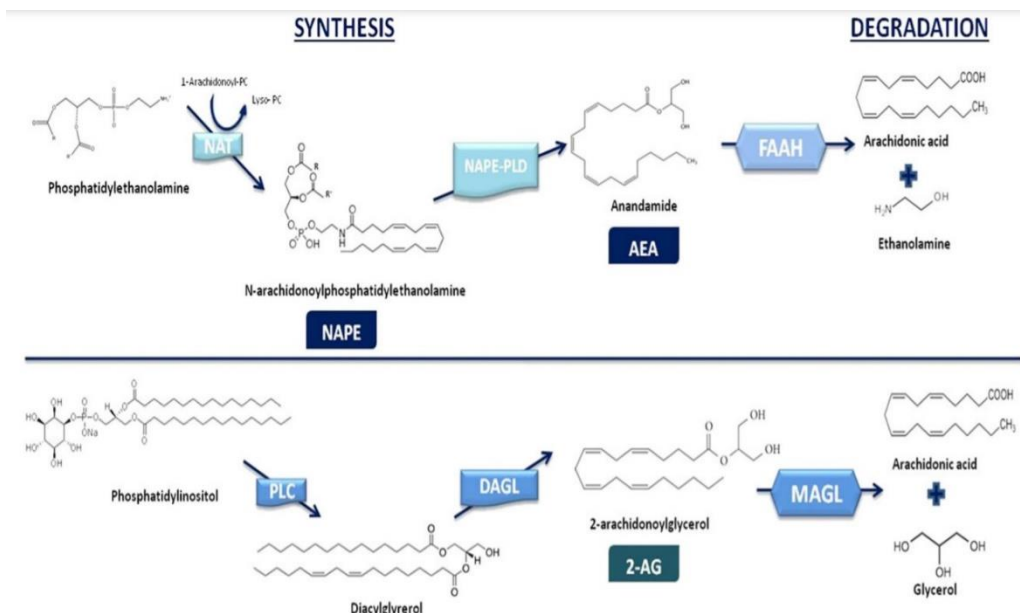


Figura 1.10: Diagrama que muestra la biosíntesis y degradación de los 2 principales AEA y 2-AG [89].

1.3.1.4. Fitocannabinoides

Los fitocannabinoides provienen en cantidades significativas del metabolismo secundario de la planta *Cannabis sativa* y son concentrados en una resina viscosa que es producida en los tricomas, las estructuras glandulares de la planta. Desde un punto de vista químico, los fitocannabinoides pertenecen a la familia química de los terpenoides, un conjunto de moléculas orgánicas que ejercen su función en las plantas principalmente como pigmentos, olor y sabor (Figura 1.11). Además, muchos terpenoides presentan propiedades medicinales como agentes antimicrobianos y/o antiinflamatorios [91]. En la actualidad se han identificado más de 120 fitocannabinoides distintos [92]. Los cannabinoides naturales con mayor prevalencia son el Δ^9 -tetrahidrocannabinol, cannabidiol

y cannabinol. El Δ^9 -THC tiene similar afinidad de unión por los receptores CB1 y CB2. Otros fitocannabinoides encontrados en la planta son cannabigerol (CBG), cannabivarina (CBV) y tetrahidrocannabivarina (THCV).

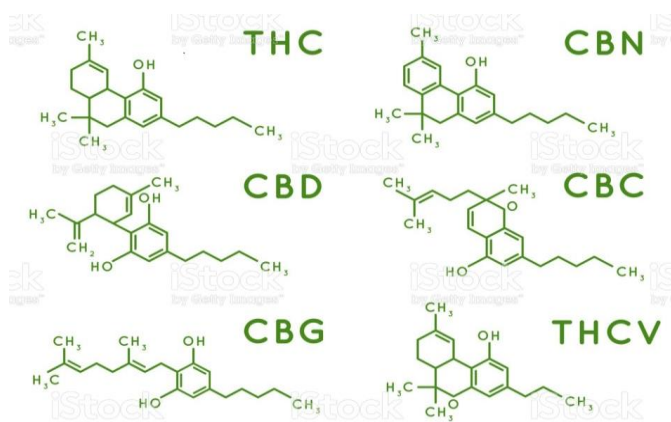


Figura 1.11: Estructura química de los fitocannabinoides más representativos [93].

El THC activa los receptores CB1 y CB2 y, por su afinidad al receptor CB1, se asemeja al endocannabinoide anandamida actuando como agonista de este receptor. Los agonistas de receptores CB1, como el THC, pueden actuar a través de los receptores CB1 presinápticos para inhibir la liberación de neurotransmisores de igual manera que los endocannabinoides liberados de manera endógena. El THC tiene una alta afinidad por el receptor CB1 que se encuentra principalmente en regiones del cerebro involucradas en coordinación y actividad motora, por lo tanto, es posible que la actividad del THC en los receptores en estas regiones explique los efectos agudos que se presentan al utilizar *Cannabis sativa* [94]. Así como el THC, su análogo THCV también es capaz de unirse con una alta afinidad a los receptores CB1 y CB2, lo cual se ha demostrado en estudios de afinidad [88].

El CBD puede interactuar con los receptores CB1 y CB2 a bajas concentraciones [95]. En contraste con el THC, el CBD tiene relativamente baja afinidad por ambos receptores CB1 y CB2. Sin embargo, a pesar de su baja afinidad, hay evidencia de que el CBD puede mitigar algunos efectos del THC al actuar como un agonista indirecto aumentando la actividad del receptor CB1 [94].

1.3.1.5. Agonistas de receptores de cannabinoides sintéticos

Los cannabinoides sintéticos son un grupo de moléculas capaces de actuar selectivamente sobre los receptores cannabinoides o modular alostéricamente su actividad. Son también capaces de modificar los niveles de los endocannabinoides. En la última década hemos asistido a un auge exponencial de variedades de miméticos del THC de síntesis, tanto por el uso como medicamento como por el uso de nuevas drogas de recreo.

Atendiendo a su estructura química, los agonistas de cannabinoides se pueden dividir en 4 clases: cannabinoides clásicos, cannabinoides no clásicos, derivados eicosanoides o aminoalquilindoles [96].

Los clásicos son cannabinoides botánicos (THC, CBD, etc.) y sus análogos de síntesis. HU-210, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC y desacetil-L-nantradol son cannabinoides sintéticos que se comportan como agonistas del receptor CB1/CB2 (sin selectividad CB1/ CB2). Otros agonistas selectivos de CB2 que se han sintetizado modificando estructuralmente la molécula de THC son JWH-133, JWH-139 y HU-308 y L-759633 y L-759656, eficaces en el rango nanomolar [97].

Los no clásicos son un grupo constituido por análogos del Δ^9 -THC sin anillo de pirano (sintetizados por la compañía Pfizer en su mayoría). Son AC-bicíclicos y ACD-tricíclicos. El análogo bicíclico, CP55940, un importante agonista de cannabinoides, tiene además una afinidad similar por los

receptores CB1 y CB2 y es altamente potente *in vivo*. CP55244 y CP47497 son otros cannabinoides destacables que entran en esta categoría.

Los derivados de los eicosanoides derivan estructuralmente de los endocannabinoides producidos por las células de origen animal. La anandamida, que es un ligando cannabinoide endógeno, se descubrió originalmente en el cerebro de mamíferos y otros tejidos y actúa de forma similar al THC. La metanandamida, su isómero R-(+) es nueve veces más específica de CB1 que el isómero S-(-). El 2-arachidonoylglycerol, otro endocannabinoide bien estudiado, tiene afinidades por CB1 y CB2. Otros compuestos de este grupo son araquidonil-2-cloroetilamida (ACEA) y arachidonilciclopropilamida (ACPA).

Los aminoalquilindoles, que no están relacionados estructuralmente con los cannabinoides botánicos, los mimetizan y pueden presentar afinidades selectivas a uno u otro receptor. El R-(+)-WIN55212 es el compuesto más conocido en esta serie. Presenta una alta afinidad por ambos receptores cannabinoides, pero es más selectivo para CB2 [98]. Tiene efectos farmacológicos similares como el THC *in vivo*. JWH-015 y L-768242 también muestran afinidad hacia CB2.

Los cannabinoides sintéticos son usados ampliamente como agentes farmacológicos *in vivo* e *in vitro* para obtener más información del mecanismo de acción de los cannabinoides y de esa manera poder evaluar su potencial en uso clínico. Estos cannabinoides han mostrado actividad pro-tumoral y anti-neoplásica dependiendo del tipo de agonistas, tejidos diana, ruta de administración, dosis y duración del tratamiento [83].

Otros compuestos están representados por diarilpirazol que funciona de manera antagonista a los receptores cannabinoides. SR141716A es un potente antagonista de CB1 y SR144528 es un antagonista de CB2. AM251 y AM281

son análogos de SR141716A que bloquean los efectos mediados por el receptor CB1 [99].

1.3.2. Cannabinoides y cáncer

Está establecido que los pacientes oncológicos se pueden beneficiar de los efectos de los cannabinoides reduciendo los efectos secundarios graves de los quimioterápicos que se usan en la actualidad. Se usan de forma habitual para suprimir la emesis y la náusea y para aliviar el dolor.

No obstante, el potencial terapéutico de los cannabinoides en oncología no puede restringirse a sus acciones paliativas puesto que numerosos estudios en modelos animales de cáncer han aportado evidencias de que el THC y otros cannabinoides tienen efectos anti-tumorales en mama, próstata, ovario y otros.[100][101][102][103][104][105][106].

Los receptores CB1 y CB2 están ampliamente distribuidos por lo que regulan funciones fisiológicas que incluyen el desarrollo neural, procesos neuromoduladores, el metabolismo de energía, así como funciones cardiovasculares y respiratorias. De igual manera se ha observado *in vivo* e *in vitro* que los receptores CB1 y CB2 están implicados en la proliferación, motilidad, invasión, adhesión y apoptosis de las células tumorales [103]. La activación de los receptores CB1 y CB2 conlleva varios eventos: uno de ellos es la alteración de los canales de Ca^{2+} y K^{+} ; también se observa la modulación de los niveles de adenil ciclasa (AC) y AMP cíclico (c-AMP) en la mayor parte de tejidos y modelos estudiados; de igual manera, se observa una regulación de la familia de MAPKs, como ERK1/2, p38, MAPK y c-Jun (Figura 1.12). Estos eventos darán paso a la muerte o supervivencia de la célula [83]. Es importante comprender que los receptores de cannabinoides se encuentran

expresados y activados de diferente manera en los distintos tumores ya que cada receptor tiene un mecanismo de señalización diferente.

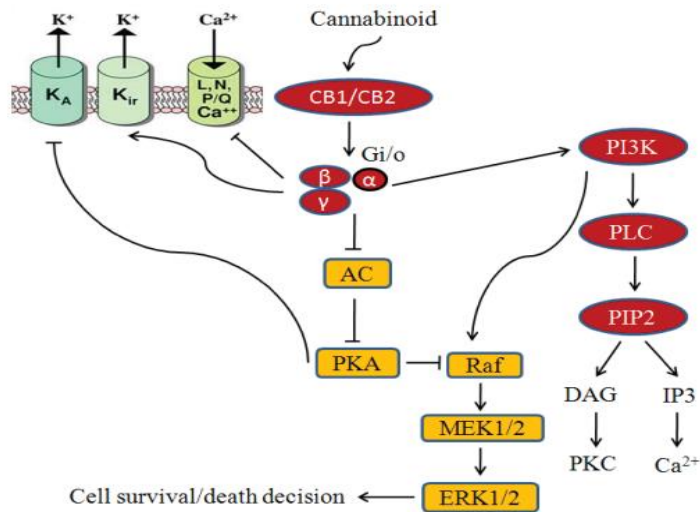


Figura 1.12: Señalización en células cancerígenas mediada por cannabinoides. Los cannabinoides activan los receptores $CB1$ y $CB2$ que a su vez modulan diversas rutas de señalización que terminarán en la muerte o supervivencia de la célula. [83].

Uno de los mecanismos por el cual los cannabinoides inhiben el crecimiento tumoral es disminuyendo la densidad vascular en los tumores, según se ha visto en modelos *in vitro*. El THC, al unirse a los receptores $CB1$ y $CB2$, inhibe la supervivencia vascular-endotelial de la célula y su migración actuando como antiangiogénico. Estudios *in vivo* muestran que la reducción de crecimiento tumoral, metástasis, proliferación celular y angiogénesis en ratones involucra principalmente a los receptores $CB2$. Un ejemplo de ello es el agonista de $CB2$, JWH-133, que reduce el crecimiento y número de tumores

y metástasis al inhibir la proliferación celular y disminuir la angiogénesis en ratones inyectados con diferentes líneas celulares de cáncer de mama [107].

Se ha observado que los cannabinoides pueden detener el desarrollo tumoral sin efectos adversos, al tener como diana específica a los receptores CB1 y CB2. Estudios enfocados en evaluar la actividad pro-apoptótica y regresión tumoral de CBD en las líneas celulares A549 y H640 sugieren la participación y aumento de expresión de ciclooxigenasa (COX-2), mediadora en los procesos de inflamación que puede estimular la progresión de cáncer, y del receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR- γ), receptor nuclear que actúa como factor de transcripción y regula principalmente la diferenciación celular, el desarrollo y metabolismo [108] [109]. En cáncer de pulmón se ha observado que CBD tiene un papel de inhibición de invasión en células A549 *in vivo* e *in vitro*. Se ha observado también el papel de Δ^9 -THC en la inhibición del crecimiento de adenocarcinoma de pulmón de Lewis mediante la inhibición de síntesis de DNA y, por consiguiente, la supresión de crecimiento y metástasis de las líneas celulares A549 y SW-1573 *in vivo* e *in vitro* [110].

Diversos estudios muestran la implicación y efectos de cannabinoides en cáncer de pulmón. El CBD inhibe la proliferación celular y el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo*. De igual manera tiene efectos en la inducción de apoptosis a través de la regulación de COX-2 y PPAR- γ [108][111]. Así mismo, el cannabinoide THC puede estar implicado en la inhibición de angiogénesis y la invasión a otros tejidos al inhibir la vía de factor endotelial de crecimiento (EGF) [112]. En concordancia con lo anterior, el tratamiento con THC inhibe el crecimiento y proliferación tumoral en la línea celular A549 y en ratones inmunodeficientes [113].

La modulación de los receptores de cannabinoides representa un componente integral de los procesos fisiológicos ubicuos y aparece como un

objetivo atractivo para el tratamiento de enfermedades neoplásicas. Sin embargo, en la actualidad, aún queda por aclarar si los cannabinoides pueden alcanzar alguna relevancia clínica para el tratamiento del cáncer sistémico.

A pesar de muchos efectos beneficiosos, varios estudios han planteado dudas sobre los efectos anticancerosos de los cannabinoides con hallazgos que sugieren que los cannabinoides incluso apoyan el crecimiento y la propagación del cáncer (próstata, glioblastoma, hígado y mama) [114][115].

Los cannabinoides parecen provocar un aumento sinérgico de la acción antitumoral de los quimioterápicos convencionales, al tiempo que contrarrestan algunos de sus efectos adversos. De hecho, varios estudios publicados recientemente demostraron que el THC y el CBD potencian los efectos citostáticos de un número considerable de fármacos quimioterápicos [116][117].

Se ha demostrado que los cannabinoides palían los efectos adversos del agente quimioterapéutico cisplatino. En este contexto, se encontró que el agonista de CB2 LEI-101 disminuye la nefrotoxicidad del cisplatino en un modelo murino [118].

Con respecto a los efectos anticancerígenos sistémicos de los cannabinoides, es de particular interés su interacción sinérgica con varios fármacos citostáticos, así como su propiedad para suprimir la metástasis y la neovascularización asociada a tumores.

Sin embargo, la principal deficiencia y desafío es la falta de conocimiento clínico sobre la seguridad y eficacia de los regímenes de dosificación de cannabinoides que pueden producir efectos sistémicos contra el cáncer. Hasta la fecha, solo se ha llevado a cabo un estudio piloto clínico publicado en 2006 que indicó que el THC administrado por vía intracraneal es seguro en pacientes con glioblastoma [119] .

1. INTRODUCCIÓN

Con respecto a la seguridad y eficacia de los cannabinoides, el estudio observacional multicéntrico más grande publicado hasta la fecha recientemente (1615 pacientes de 30 centros) especificó nabiximols (Sativex[™]), una combinación de THC y CBD, como un tratamiento eficaz y seguro para pacientes con esclerosis múltiple con espasticidad moderada a severa [121].

Tomados en conjunto, los cannabinoides pueden respaldar el arsenal futuro para el tratamiento de enfermedades cancerosas más allá de su uso paliativo, como inhibidores del crecimiento del cáncer, como refuerzos citostáticos, como antimetastáticos y como inhibidores de la neovascularización tumoral, dado que los estudios clínicos superarán los informes de casos y proporcionarán evidencia de considerables beneficios sistémicos.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Las investigaciones realizadas en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* parecen indicar un posible efecto terapéutico de los agonistas de cannabinoides más allá de los efectos paliativos a nivel analgésico, antiemético o antianorético, en el cáncer de pulmón. Atendiendo a esta hipótesis nos proponemos evaluar si la expresión de los receptores CB1 y CB2 de cannabinoides podría correlacionarse con la fisiopatología de la enfermedad. Por otra parte, dada la relevancia del proceso de la TEM en la diseminación de dicha patología nos proponemos evaluar si dichos fármacos pueden tener algún efecto modulando dicho proceso en un modelo *in vitro*.

2.2. Objetivos

1. Estudiar si existe una correlación entre la expresión de CB1 y CB2 y el pronóstico de una cohorte de pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón.
 - 1.1. Generar una cohorte bien caracterizada histológicamente de pacientes con cáncer de pulmón.
 - 1.2. Evaluar la expresión de receptores CB1 y CB2 en dicha cohorte y buscar correlaciones entre diferentes variables clínico-patológicas y el grado de expresión de dichos receptores.
2. Establecer los efectos de los agonistas de cannabinoides THC y CBD en un modelo *in vitro* desarrollado a partir de líneas celulares de referencia para el estudio del cáncer de pulmón. En estos modelos evaluaremos los efectos de dos agonistas de cannabinoides, el THC y el CBD a nivel de proliferación, regulación de la TEM y de la capacidad de migración de dichas células.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Muestras de pacientes

Todos los pacientes proporcionaron su consentimiento informado para la realización de este estudio, que se llevó a cabo de acuerdo con la declaración de Helsinki, así como con las leyes y requisitos reglamentarios locales aplicables. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital General Universitario de Valencia.

Para los estudios de expresión génica, se incluyeron un total de 157 muestras de tumores procedentes de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) que provenían del Hospital General Universitario de Valencia, con la colaboración y supervisión del Dr. Carlos Camps, Jefe de Servicio de Oncología de dicho Hospital. Para los estudios de inmunohistoquímica, se utilizaron 25 muestras de tumores de paciente diagnosticados de adenocarcinoma de pulmón proporcionadas por el Dr. Antonio Cremades, Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de la Ribera.

3.1.2. Líneas celulares

Con la finalidad de testar los efectos de los agonistas de los receptores de cannabinoides, THC y CBD, se emplearon tres líneas celulares tumorales humanas comerciales de cáncer de pulmón: A549, H460 y H1792. Estas líneas celulares se adquirieron de la ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD, USA). Son células epiteliales alveolares de carcinoma NSCC.

3.1.3. Cultivos celulares

Las células se cultivaron en frascos de 25cm² en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI)1640 suplementado con suero bovino fetal libre de

3. MATERIAL Y MÉTODOS

endotoxinas (FBS, 5% para las A549 y las H469, 10% para las células H1792), HEPES al 1%, L-glutamina (4 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (10 µg/mL) y anfotericina B (0,25 µg/mL) (ver tabla 3.1).

Las incubaciones se realizaron en una incubadora a 37°C, 5% CO₂ (Forma Scientific Inc., Marietta, OH, EE.UU).

Tabla 3.1: Composición de los cultivos celulares.

MATERIAL	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Línea celular A-549	ATCC, Barcelona, España	CCL-185
Medio RPMI 1640	Euroclone, Milán, Italia	ECB9006
Suero Bovino Fetal	Gibco, Waltham. MA, EE.UU.	Gibco™ A104910
Tampón Hepes	Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.	H4034-100G
Anfotericina B	Euroclone, Milán, Italia	ECM0010D
Penicilina-estreptomicina	Gibco, Waltham, MA, EE.UU.	Gibco™15140122
L-glutamina	Gibco, Waltham, MA, EE.UU.	Gibco™25030149
PBS	Euroclone, Milán, Italia	ECB4053
Tripsina	Gibco, Waltham, MA, EE.UU.	Gibco™ 25300062
DMSO	Euroclone, Milán, Italia	EMR385250
TGFβ1	Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.	T7039-2UG
Frascos de 75cm ²	SPL Life Sciences Co., Ltd., Gyeonggi-do, Corea	70075
Frascos de 25cm ²	SPL Life Sciences Co., Ltd., Gyeonggi-do, Corea	70025
Placas de 12 pocillos	Sarstedt AG & Co. Sarstedtstraße, Nümbrecht, Alemania	83.3921.005

3.1.4. Cannabinoides

Para el presente estudio, los cannabinoides empleados fueron los fitocannabinoides THC y CBD. Estos fitocannabinoides fueron remitidos al laboratorio en polvo liofilizado con una pureza del 95% por lo que se prepararon soluciones madre a una concentración de 150 mM con disolvente etanol para después ser utilizadas en los tratamientos. Fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). THC 1,0 mg/mL en solución de metanol ref: T2386 y CBD 1,0 mg/mL en solución de metanol ref: C6395-1 mL

3.1.5. Extracción de ARN

Para la extracción de ácidos nucleicos de las células en cultivo, se utilizó los reactivos que se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2: Reactivos para la extracción de ácidos nucleicos.

MATERIAL	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
TRizol®	Ambion, Waltham. MA, EE.UU.	15596018
Cloroformo	Merck, Darmstadt, Alemania	102445
Glucógeno	Invitrogen, Waltham, MA, EE.UU.	10814010
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Alemania	109634
Etanol absoluto	Merck, Darmstadt, Alemania	107017
Agua DEPC	Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.	693520

Como instrumentos se utilizaron: un termobloque Thermomixer C (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y una centrifuga Sorvall Legend Micro 17R (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

La concentración de RNA se determinó por espectrofotometría utilizando los espectrofotómetros Nanodrop 2000 y Qubit 4 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). La integridad del RNA se evaluó por electroforesis capilar utilizando un Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

La integridad del RNA se evaluó por electroforesis capilar utilizando un Bioanalyzer 2100 de Agilent Technologies..

3.1.6. Transcripción inversa

Para sintetizar ADN complementario (cDNA) se utilizaron hexámeros random usando reactivos RT TaqMan (Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante (tabla 3.3). Como instrumento se utilizó un termociclador Life Pro (Lan Technics, Navarra, España).

Tabla 3.3: Reactivos para la síntesis de cDNA.

MATERIAL	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
TaqMan® RT	Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.	N8080234
Buffer x 10	Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.	N8080234
Cl ₂ Mg	Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.	N8080234
DNTPs	Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.	N8080234
Random hexamers	Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.	N8080234
Reverse Transcriptase	Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.	N8080234
RNAse inhibitor	Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.	N8080234
Agua DEPC	Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.	693520

3.1.7. Expresión génica

La determinación de los niveles de expresión medidos por reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o cuantitativa (q-PCR) se llevó a cabo utilizando reactivos *Assays on Demand* para los genes estudiados (Applied Biosystems, Tres Cantos, Madrid, España) (tabla 3.4).

Tabla 3.4: Reactivos utilizados para expresión de génica.

MATERIAL	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
RT-PCR TaqMan® <i>Gene Expression</i>	Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.	4448509
Master-mix	Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.	4324020
<i>TaqMan Gene Expression Assay</i> para GAPDH	Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.	4333764F
<i>TaqMan Gene Expression Assay</i> para VIM	Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.	4331182
<i>TaqMan Gene Expression Assay</i> para ASMA	Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.	4331182
<i>TaqMan Gene Expression Assay</i> para E-cadherina	Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.	4331182

Las sondas utilizadas para el estudio de expresión génica son sondas TaqMan VIC y SYBR Green® (Applied Biosystems, Tres Cantos, Madrid). Las descripciones de cada gen se detallan en la tabla 3.5.

Tabla 3.5: Sondas utilizadas en expresión génica.

REACTIVOS (Anticuerpo)	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
CB1	Abcam	ab23703
CB2	Abcam	ab3561
EGFR	Abcam	ab131498
CDH1 (E-caherina)	Abcam	ab219332
CDH2 (N-cadherina)	Abcam	ab245117
VIM (Vimentina)	Abcam	ab137321
SNAIL	Abcam	ab180714
SLUG	Abcam	ab106077

El instrumento utilizado fue un termociclador 7900HT (Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.) así como el software del termociclador SDS RQ (Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.). Y para cuantificar el resultado se utilizó el *software* SDS RQ Manager (Applied Biosystems, Waltham, CA, EE.UU.).

3.1.8. Inmunohistoquímica

Para las tinciones inmunohistoquímicas se utilizaron anticuerpos primarios de 2 casas comerciales diferentes, Agilent Technologies y Abcam, y un único anticuerpo secundario común de la casa Agilent Technologies. El resto de reactivos necesarios para realizar las tinciones también fueron de la casa Agilent Technologies (tabla 3.6).

Tabla 3.6: Anticuerpos y reactivos para inmunohistoquímica.

MATERIAL	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Anti-CB1	Abcam	Ab23703
Anti-CB2	Abcam	Ab3561
EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)	Agilent Technologies	K800521-2
EnVision FLEX+, Mouse, High pH (Link)	Agilent Technologies	K800221-2
Bloqueante Peroxidasa	Agilent Technologies	
EnVision FLEX Hematoxylin (Link)	Agilent Technologies	K800821-2
EnVision FLEX+ Rabbit (LINKER) (Dako Autostainer Instr.), Mo a Rb	Agilent Technologies	K801921-2
DAB	Agilent Technologies	

Para fotografiar las laminillas teñidas se utilizó un microscopio digital Leica DMD108 (Leica, Wetzlar, Germany). Y se utilizó el *software* de análisis de imagen Image-Pro Plus (Media Cybernetics Inc., Roper Technologies, Lakewood Ranch, Florida, EE.UU.).

3.1.9. Tinción del citoesqueleto

Los filamentos de actina (F-actina) en líneas celulares de cáncer de pulmón se visualizaron utilizando faloidina conjugada a rodamina (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) (tabla 3.7).

Tabla 3.7: Reactivos para inmunofluorescencia y microscopía de fluorescencia.

MATERIAL	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Faloidina-rodamina	Invitrogen™	R415
Células A549	ATCC, Barcelona, España	CCL-185
Formaldehído	VWR International, Lovaina, Bélgica	1.03999.1000
Tritón X-100	Merck, Darmstadt, Alemania	108603
BSA	Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.	A9418
Faloidina + rodamina	Invitrogen, Waltham, MA, EE.UU.	R415
DAPI	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.	H-1200-10
PBS	Euroclone, Milán, Italia	ECM4053
Cristales, laminillas cubreobjetos D=12mm	Marienfeld GmbH & Co. KG. Lauda-Königshofen, Alemania	1000200
Placa de 24 pocillos	Sarstedt AG & Co. Sarstedtstraße, Nümbrecht Alemania	94.6000.14

Se utilizó el microscopio de fluorescencia DM2500 (Leica, Wetzlar, Germany).

3.1.10. Migración celular

El crecimiento y la migración celular fueron grabadas usando un microscopio de contraste de fases Nikon Eclipse (Minako, Tokio, Japón). La

migración celular se cuantificó respecto del control usando un software de imagen (Scion Image Alpha 4.0.3.2).

3.1.11. Proliferación celular

En los ensayos de proliferación celular se utilizaron kits comerciales *BrdU Cell Proliferation Assay Kit* de Merck Millipore, Darmstadt, Germany, referencia 2750.

Se utilizó en programa de imagen ACD See 7.0 de ADCSEE Company para verificar la viabilidad y la cantidad celular existente.

3.1.12. Análisis de datos

El análisis de datos de pacientes se realizó mediante el software SPSS (IBM Corp., Armonk, NY). El resto de datos se analizaron mediante el paquete informático GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3.2. Métodos

3.2.1. Diseño experimental

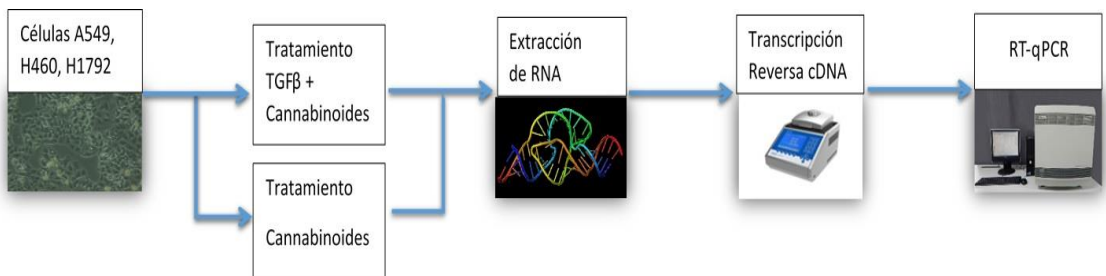


Figura 3.1: tratamiento con cannabinoides y/o TGF-β y posterior PCR.

Para la determinación de los niveles de expresión de CB1 y CB2 se utilizó una cohorte de 157 pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón. Se extrajo el RNA de muestras de tejido fresco y se analizó la expresión de dichos genes por real time RT-PCR. Como estándar interno se utilizó el GAPDH. Se calculó el $\Delta\Delta Ct$ para dichos genes y los pacientes se dividieron en expresión alta (ΔCt por encima de la mediana) y baja (ΔCt por debajo de la mediana). Se realizó un estudio multivariante para buscar correlaciones entre la expresión de dichos genes y las características fisiopatológicas de los pacientes incluidos.

Los estudios *in vitro* se realizaron con las líneas celulares A549, H1792 y H460. Las células se cultivaron y fueron tratadas con TGF β 5ng/ml, para inducir en ellas la TEM. Para estudiar el efecto de los cannabinoides, se adicionaron las mezclas correspondientes una hora antes de adicionar el TGF β . Los tratamientos se mantuvieron 48 horas con el objetivo de analizar el efecto en la TEM. Las mezclas utilizadas fueron: CBD/THCV (9:1) a una concentración de 10 μM , 1 μM y 0,1 μM respectivamente, y la mezcla de CBD/THC (1:1) a una concentración de 3 μM . Una vez tratadas las células se analizó mediante RT-PCR a tiempo real la expresión de los genes EGFR, VIM, ASMA, E-cadherina, N-cadherina, SLUG y SLIM en las muestras. La morfología se estudió mediante tinción fluorescente del citoesqueleto utilizando faloidina conjugada con rodamina.

3.2.2. Cultivo celular

Para los estudios de proliferación celular, cambios fenotípicos celulares inducidos por genes de TEM, cambios de expresión génica inducidos por cannabinoides y estudios de migración, se utilizaron líneas celulares tumorales comerciales de pulmón A549, H460 y H1792. Los cultivos celulares se realizaron en frascos de cultivo de 25cm² (T25) con medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal libre de endotoxinas (FBS, 5% para

las A549 y las H469, 10% para las células H1792), HEPES al 1%, L-glutamina (4 mM), 1% penicilina (100 U/mL), 1% estreptomicina (10 µg/mL), 1% de fungizona, anfotericina B (0,25 µg/mL) y tampón HEPES Buffer 1M.

En primer lugar, se estudió el número óptimo de células a sembrar según la durabilidad de las mismas y para tratar de evitar un crecimiento excesivo en el espacio disponible en las sucesivas experimentaciones. Para ello, tras una incubación de 24 horas en un frasco T25 en atmósfera humidificada a 37°C, se siguió el protocolo de levantamiento celular para despegar las células del frasco de cultivo. Se aspiró el medio de cultivo inicial, se lavó rápidamente con 5mL de PBS previamente atemperado a 37° y se agregó 1mL tripsina y se incubó el frasco a 37°C en atmósfera humidificada al 5% de CO₂ durante 3 minutos. Se neutralizó la tripsina agregando 9mL de medio RPMI 1640 suplementado previamente atemperado para resuspender las células. De dicha suspensión, se tomaron 10µL para realizar un conteo celular. Se fotografió a 10 aumentos todos los pocillos usando el microscopio óptico invertido y el programa de imagen ACD See 7.0 y se verificó la viabilidad y la cantidad celular existente.

Se trabajó sembrando con 60.000 células por pocillo en placas de cultivo de 12 pocillos pues es el volumen celular que mejor se adapta a los tiempos requeridos para el experimento (Figura: 13).

3.2.2.1. Estudio proliferación, expresión génica y TEM con cannabinoides

Las células fueron expuestas a concentraciones de 10 µM -0,1 µM de THC o CBD, individualmente o en combinación (ratio 1:1), durante 48 horas. Estos compuestos, el THC y el CBD, se prepararon a una concentración de 150 mM, diluidos en etanol.

El cultivo de las placas en crecimiento se prolongó hasta 24 horas. Transcurrido este tiempo, se cambió el medio y se pre-trataron las placas con las mezclas de cannabinoides C1 (THC: CBD en proporción 1:1), C2 (THC: CBD en proporción 9:1) y C3 (THC: CBD en proporción 1:9) y se incubó 1 hora a 37 °C en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂. A continuación, se trataron las células con TGF- β a 5 ng/mL para inducir la TEM y se incubaron 48 horas más en las mismas condiciones anteriormente mencionadas.

3.2.2.2. Cultivo de células para tratamiento con TGF- β y fitocannabinoides

En un principio, se realizaron 3 mezclas de cannabinoides para la realización de los experimentos: la primera mezcla (C1) se compuso por CDB y THC en proporción (1:1); la segunda (C2) por THC y CBD en proporción (9:1); y la tercera (C3) por THC y CBD en proporción (1:9). Las 3 mezclas a concentraciones de 10 μ M, 1 μ M y 0,1 μ M. Las concentraciones fueron ajustadas basándose en datos de estudios previos realizados por nuestro laboratorio según los cuales una concentración de 100 μ M o superior no era compatible con la vida de las células cultivadas. Tras probar las diferentes combinaciones, se optó finalmente por utilizar para nuestros experimentos únicamente la mezcla de THC/ CBD en proporción 1:1 y a una concentración de 10 μ M, tanto en la forma individual como en las mezclas.

Trascurridas 24 horas de incubación de las placas a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂, se realizó un cambio de medio de un volumen de 1,5mL por pocillo y se prosiguió a pre tratar las células con las mezclas de cannabinoides mencionadas agregando 1,5 μ L de las mismas. Se pre incubaron durante una hora a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

Con el objetivo de inducir TEM en las líneas celulares, las células fueron estimuladas con 15 ng/ μ L de TGF- β en presencia o ausencia de 10 μ M THC/CBD durante 48 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la observación de las células y a la realización de fotografías a 10x de cada uno de los pocillos de las placas utilizando el microscopio óptico y el programa de imagen ACD See 7.0.

Las células en cultivo se lisaron con TRIzol® a razón de 200.000 células/mL y se recogieron en microtubos de 1,5 mL para proceder a la extracción de RNA.

3.2.2. Extracción de RNA total

Para poder cuantificar los niveles de expresión de los genes implicados en la TEM (CDH1, CDH2, VIM, SNAIL y SLUG), en la proliferación celular (EGFR) o genes como CB1 y CB2, se realizaron extracciones totales de RNA de los cultivos celulares y de muestras de tumores congelados utilizando el método de TRIzol®. Así, se procedió a aspirar el medio de las placas de 12 pocillos para seguidamente lisar las células en cultivo con 500 μ L de TRIzol. Se resuspendieron y recogieron en tubos Eppendorf de 1,5mL previamente etiquetados. Para la separación de fases se agregaron 100 μ L de cloroformo a cada tubo y se realizó una centrifugación de 15 minutos a 12.000g a 4°C. A continuación, se tomó el mayor volumen posible de la fase acuosa, que contiene ácidos nucleicos, y se pasó a un nuevo tubo de 1,5mL al cual se había añadido previamente 1 μ L de glucógeno. Después se adicionaron 250 μ L de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos, se homogeneizaron suavemente los tubos y se dejaron las muestras en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo de reposo, se realizó un enfriamiento durante 15 minutos a -80°C para favorecer la precipitación de RNA. Paso seguido se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a

3. MATERIAL Y MÉTODOS

12.000g a 4°C y se desechó el sobrenadante. Se realizaron 2 lavados con 500µL de etanol al 75% centrifugando 5 minutos a 7.500g a 4°C y desechando el sobrenadante sin arrastrar el *pellet*. Acto seguido se llevaron a secar los tubos en el termobloque durante 10 minutos a 40°C. Se resuspendió el sedimento con 30µL agua DEPC y se llevaron los tubos a incubación en el termobloque durante 5 minutos a 65°C para diluir completamente el RNA.

La concentración de RNA se determinó por espectrofotometría utilizando los espectrofotómetros Nanodrop 2000 y Qubit 4. Solo las extracciones con una ratio de pureza 260/280 nm superior a 1,8 fueron consideradas para su análisis. La integridad del RNA se evaluó por electroforesis capilar utilizando un Bioanalyzer. Solo se consideraron como buenas las extracciones con un RIN de aproximadamente 10 para determinar los niveles de expresión génica.

El proceso de transcripción inversa se realizó en el termociclador. Se ajustó el volumen de la muestra para tener una concentración final de 100ng/µL para realizar la transcripción inversa en una placa de 96 pocillos. Se preparó la mezcla madre con los componentes de la reacción de retrotranscripción de TaqMan® RT para llegar a un volumen de 10µL por pocillo como se muestra en la tabla 3.8. El proceso de transcripción inversa constó de una incubación a 25 °C durante 10 minutos, seguida de un ciclo a 42 °C durante 30 minutos y, finalmente, una incubación a 95 °C durante 5 minutos para inactivar a la transcriptasa reversa.

Tabla 3.8: Composición de la reacción de transcripción reversa.

Componentes	Volumen	Concentración final
Buffer de RT (10x)	1,0µl	1x
MgCl ₂ 25mM	0,7µl	1,75mM
Mezcla de dNTPs	2,0µl	500 µM/dNTP
Random hexamers	0,5µl	2,5µM
<i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i> (50U/µl)	0,5µl	2,5U/µl
Inhibidor de RNAasa (20U/µl)	0,5µl	1U/µl
RNA + Agua DEPC	4,8µl	

Para sintetizar el DNA complementario (cDNA) desde el RNA extraído se utilizaron *random hexamers* utilizando el kit high capacity cDNA transcription kit suministrado por Applied Biosystems (Madrid, España) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.2.3 Real Time-PCR

Los niveles de expresión de genes se determinaron por RT-PCR como se comentó anteriormente usando los reactivos Assay on Demand para los genes CB1, CB2, EGFR, CDH1, CDH2 y VIM. Como house-keeping se utilizó el gen GAPDH

Para la determinación de la expresión de dichos genes se utilizó el cDNA obtenido de las extracciones de RNA de las células A549, H460 y H1792. Para llevar a cabo cada reacción de PCR se utilizó la siguiente composición para un volumen final de 10µL (tabla 3.9).

Tabla 3.9: Composición de la reacción de RT-PCR a tiempo real.

Componentes	Volumen	Concentración
Master Mix (2x)	5,0μL	1x
<i>TaqMan Gene Expression Assays</i> (20x)	0,5μL	1x
cDNA	1,0μL	
Agua DEPC	3,5μL	

Una vez preparadas las muestras a procesar en una placa de 380 pocillos, se introdujeron en el termociclador a tiempo real con las condiciones de amplificación siguientes: una etapa inicial a 50 °C durante 2 minutos, una incubación a 95 °C de 10 minutos, y 40 ciclos a 95 °C para desnaturalizar el DNA durante 15 segundos, seguidos de 60 °C durante 1 minuto. Los resultados de la reacción de PCR a tiempo real fueron ajustados con la ayuda del *software* del termociclador ABI 7500 SDS 2.0. El análisis de las gráficas de PCR junto con la preparación de los valores obtenidos para su cuantificación se realizó también con el *software* del termociclador.

Como control endógeno se utilizó el gen 3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) para calcular las expresiones relativas de los genes. Se trataron los datos en bruto y se aplicó el método comparativo $\Delta\Delta C_t$ para realizar los cálculos numéricos.

3.2.4. Análisis de expresión de receptores de cannabinoides mediante inmunohistoquímica

Con las muestras de adenocarcinomas de pulmón, fijadas en formol e incluidas en parafina, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas con anticuerpos policlonales de conejo IgG anti-CB1 y anti-CB2. Tras realizar varias, la dilución final utilizada para estos anticuerpos fue 1:100. Los reactivos de

todo el protocolo de inmunohistoquímica se aplicaron en exceso pero en sus concentraciones ideales. Para realizar las tinciones, una vez fijado el protocolo óptimo, se utilizó el robot Autostainer+, asegurando una perfecta reproducibilidad y minimizando los posibles errores de manipulación.

El protocolo que se aplicó se modificó con respecto al protocolo de rutina en algunos pasos cruciales: la recuperación antigénica se llevó a cabo en un medio a pH 9 durante 20 minutos a 90°C; se incubaron las laminillas con bloqueante de la peroxidasa durante 5 minutos; el anticuerpo primario, aplicado en exceso, se incubó durante 30 minutos a 25°C; el anticuerpo secundario anti-mouse/ anti-rabbit HRP (Horse Radish Peroxidase) se incubó también en exceso durante 20 minutos a 25°C; Se utilizó DAB (Diaminobencidina) como cromógeno durante 10 minutos en dos tandas de 5 + 5 minutos; la contratinción se realizó con hematoxilina durante 6 minutos. Las laminillas se montaron con DPX en base tolueno.

Tanto las laminillas teñidas por inmunohistoquímica para CB1 y CB2 como las laminillas con tinciones de Hematoxilina-Eosina, realizadas como control de presencia de tejido tumoral, se visualizaron al microscopio digital. A su vez, se realizaron fotografías de las diferentes zonas del tejido, tanto tumorales como sanas, de todas las tinciones.

Tras el análisis con el software de análisis de imagen de las fotografías tomadas con el microscopio digital, se establecieron 3 niveles de intensidad de tinción. Un primer nivel "0" correspondiente a un nivel de tinción negativo; "1" correspondiente a un nivel de tinción positivo medio; y "2" correspondiente a un nivel de tinción positivo alto.

3.2.5. Tinción fluorescente de F-actina

Con el objetivo de observar el citoesqueleto de las líneas celulares comerciales de cáncer de pulmón A549, H460 y H1792 durante el proceso de TEM inducido, así como los cambios que pudieran darse con el uso de los cannabinoides se analizaron las diferentes muestras con microscopía de fluorescencia utilizando faloidina conjugada con rodamina.

Las células se cultivaron en una placa de 24 pocillos de 2cm² sobre cristales, se sembraron 60.000 células/pocillo con un volumen total de 750µL por pocillo. Se incubaron a 37°C en atmósfera humidificada al 5% de CO₂ durante 24 horas hasta la sub-confluencia. Transcurrido el tiempo de incubación de las placas se realizó un cambio de medio. Se dividieron en dos grupos, uno expuesto a THC + CBD a una concentración de 10 M y otro no. Posteriormente, tras 2 horas de incubación, los dos grupos fueron expuestos a TGF-β (15 ng/mL). Y 48 horas después, se lavaron las células con un tampón de lavado precalentado con fosfato salino (PBS) a pH 7.4. Después, las muestras se fijaron en formaldehído al 3,7% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se permeabilizaron las células con Triton X-100 en PBS a concentración 0,1% durante 3 a 5 minutos. Para reducir la tinción de fondo no específica, las muestras se pre-incubaron con PBS conteniendo 1% de suero bovino fetal (BSA) durante 20 a 30 minutos. A continuación, para cada muestra se añadió una solución *stock* metanólica de 5 µL de faloidina diluida en 200 µL de PBS. La mezcla se incubó durante 20 minutos. Finalmente, las células se lavaron y los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las muestras se visualizaron con un microscopio de fluorescencia usando los filtros Texas Red®-X y DAPI y se realizaron fotografías de todas las muestras.

3.2.6. Migración celular

El ensayo de cicatrización de heridas (*Scratch Assay* o *Wound Healing Assay*) se llevó a cabo cultivando las líneas celulares tumorales comerciales de A549, H460 y H1792 hasta la confluencia en placas de 6 pocillos. Posteriormente, los cultivos se rascaron produciendo una cicatriz usando una punta de pipeta estéril de 10 μ L. Las células arrastradas sobrantes se retiraron del cultivo lavando 3 veces con PBS estéril.

Las células se cultivaron posteriormente en la presencia o ausencia de THC o CBD o en combinación en medio de cultivo libre de suero con 10 ng/mL de EGF durante 48 horas.

El crecimiento y la migración celular fueron grabadas usando un fotomicroscopio de contraste de fases. La migración celular se cuantificó respecto del control (cultivos rascados pero no expuestos a EGF) usando el *software* de imagen.

3.2.7. Ensayos de proliferación celular

La proliferación de las células comerciales A549, H460 y H1792 se evaluó mediante un *kit* comercial de inmunoensayo para incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU). Las células se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos a 5.000 células por pocillo y cultivadas durante 24 horas en medio de cultivo con BrdU durante 48 horas en presencia o ausencia de THC y CBD individualmente o en combinación (ratio 1:1) a 10-100 μ M.

Se eliminó el medio de cultivo, se fijaron las células y se evaluó la incorporación de BrdU con un anticuerpo anti-BrdU determinando la absorbancia a 450/550 nm según las instrucciones del fabricante.

3.3 Análisis de datos

La comparación de las variables categóricas se llevó a cabo usando el test no-paramétrico Mann-Whitney U o el test de Kruskal-Wallis. La supervivencia se analizó por el método de Kaplan-Meier y las diferencias entre grupos se estableció por el test de log-rank, utilizando el software SPSS. Un p-valor inferior a 0,05 se consideró indicativo de significación estadística.

Los datos *in vitro* se muestran como medias $\pm$ la desviación estándar (SD) y se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de comparación múltiple de Tukey. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

La concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) se calculó usando el software Graphpad Prism.

4. RESULTADOS

4.1 La sobreexpresión de CB1 y CB2 está asociada a mayor supervivencia en pacientes de cáncer de pulmón

En este trabajo incluimos una cohorte de 157 pacientes con NSCLC que fue caracterizada en función a la edad, género, tabaquismo, estadio tumoral, TMN, grado e histología. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Características clínicas e histopatológicas de los pacientes con NSCLC.

	N	%
Edad (mediana)	61 (35-81)	
Género		
Hombre	136	86,6
Mujer	21	13,4
Fumador		
Nunca	16	10,2
Exfumador	64	40,8
Activo	77	49,0
Estadio		
IA	13	8,3
IB	62	39,5
IIA	5	3,2
IIB	29	18,5
IIIA	32	20,4
IIIB	12	7,6
IV	4	2,5
TNM		
T1	21	13,4
T2	88	56,1
T3	32	20,4
T4	16	10,2
N0	89	56,7
N1	21	13,4
N2	25	15,9
NX	2	1,3
M0	151	96,2
M1	6	3,8
Grado		
Bien diferenciado	23	14,6
Moderadamente diferenciado	83	52,9
Pobremente diferenciado	51	32,5
Histología		
Epidermoide	79	50,3
Adenocarcinoma	57	36,3
Células Gigantes	5	3,2
Adenoescamoso	6	3,8
Carcinoide	1	0,6
Microcítico	1	0,6
No-diferenciado	6	3,8
Neuroendocrino	2	1,3

La expresión de los niveles de (Δ Ct) de CB1 y CB2 se calcularon en comparación a la expresión del gen GAPDH tal y como se detalla en la sección de métodos.

Del análisis multivariante que se realizó entre los niveles relativos de expresión de CB1 y CB2 y el resto de variables, no se encontraron asociaciones con significado estadístico para los siguientes parámetros: género ($p=0,057$ y $p=0,267$ respectivamente), progresión ($p=0,159$ y $p=0,209$), edad ($p=0,69$ y $p=0,835$), tabaquismo ($p=0,223$ y $p=0,512$), estadio ($p=0,317$ y $p=0,961$) e histología ($p=0,65$ y $p=0,55$).

Sí se encontró, sin embargo, una asociación entre Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y la expresión de CB2 ($p=0,02$) pero no para la de CB1 ($p=0,758$).

Un análisis de supervivencia se realizó en base a los datos de (Δ Ct) de CB1 y CB2 (figura 4.1). Los pacientes con una (Δ Ct) de CB1, CB2 o CB1 y CB2 igual o superior a la media de (Δ Ct) de la cohorte, tuvieron una supervivencia superior que los pacientes con valores de (Δ Ct) inferiores a la media de la cohorte ($p=0,035$, $0,126$ y $0,025$ respectivamente).

4. RESULTADOS

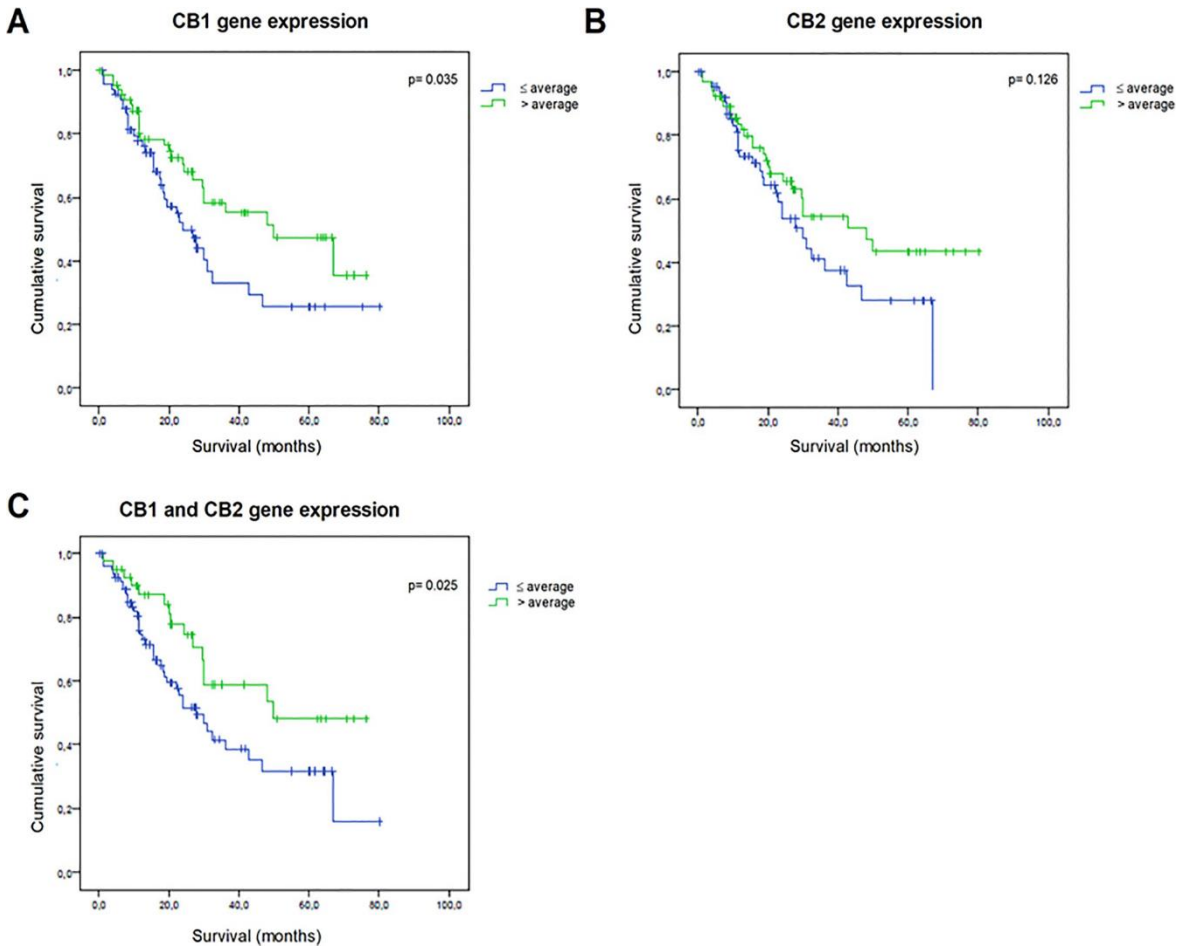


Figura 4.1: Expresión de receptores de cannabinoides (CB1 y CB2) en 157 pacientes con NSCLC. Análisis de supervivencia de pacientes con NSCLC según si sus valores Δ Ct de CB1 (A), CB2(B) o CB1/CB2 (C) eran superiores o inferiores a la Δ Ct media de toda la cohorte.

4.2. Inmunohistoquímica

Una vez analizados los datos de RT-PCR, decidimos estudiar el perfil de expresión de CB1 y CB2. Para ello, realizamos un estudio inmunohistoquímico utilizando 25 muestras de tumores de pacientes con NSCLC bien caracterizadas. Las muestras fueron diagnosticadas previamente en el

4. RESULTADOS

Hospital de Alzira y en Patológica Laboratorio, con sus correspondientes baterías de tinciones inmunohistoquímicas de rutina (TTF1, P63, CK7, CK20 y CK5/6), así como sus determinaciones moleculares necesarias para el diagnóstico de precisión en los casos que se requería (mutaciones en genes diana etc.).

Los resultados obtenidos pueden resumirse en la siguiente Figura 4.2.

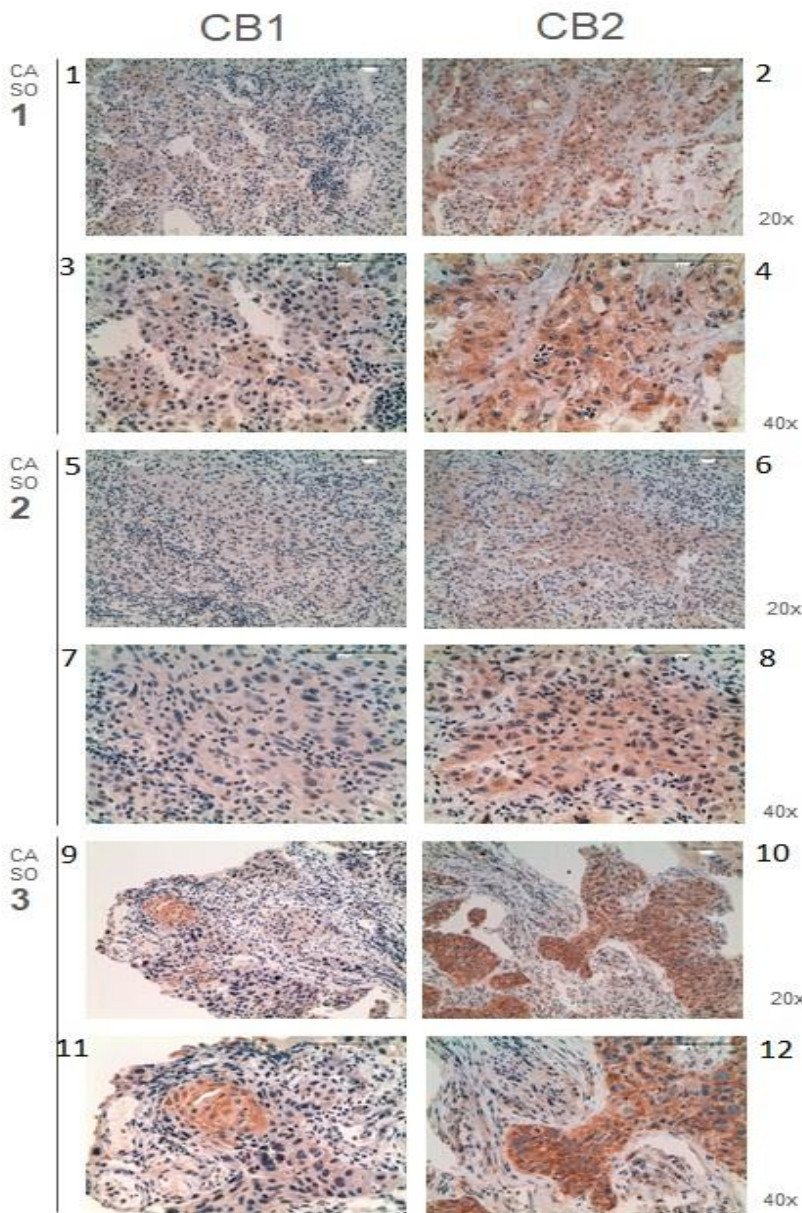


Figura 4.2: Expresión de anti-CB1 y anti-CB2. Expresión por inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-CB1 y anti-CB2 en 3 casos diferentes de NSCLC. En los 3 casos se observó con ambos anticuerpos una tinción citoplasmática delimitada a la zona tumoral, siendo CB2 más potente que CB1.

Se obtuvieron resultados similares en todas las tinciones realizadas con los 2 anticuerpos policlonales de conejo IgG anti-CB1 y anti-CB2 de Abcam antibodies®. Se repitió el protocolo modificado, puesto a punto *ex profeso*, que era el óptimo en cuanto a calidad de resultados de las tinciones.

Tanto las laminillas teñidas por inmunohistoquímica para anti-CB1 y anti-CB2, como las laminillas con tinciones de hematoxilina-eosina, se visualizaron al microscopio digital. A su vez, se realizaron fotografías de las diferentes zonas del tejido, de las regiones tumorales y de las regiones sanas, de todas las tinciones.

Los objetivos fueron varios: por un lado, se analizó qué zonas del tejido se tiñeron con los distintos anticuerpos en cada muestra, para verificar si los anticuerpos elegidos (anti-CB1 Y anti-CB2) eran, o no, suficientemente específicos a la hora de marcar el tejido sano versus el tumoral; por otro lado, y una vez comprobado que la hipótesis anterior se cumplía en la inmensa mayoría de las muestras, se pasó al análisis de los diferentes tipos celulares teñidos tanto en el tejido sano como en el tumoral; una vez anotados los diferentes tipos celulares teñidos, se prosiguió analizando el patrón de tinción celular observado, es decir, qué zonas de la célula resultaron positivas o negativas, pudiendo definir si se trataba de un patrón de tinción de membrana, citoplasmático, nuclear o peri-nuclear; se comparó también el tipo de tinción atendiendo a si se trataba de una tinción homogénea o granular; y, finalmente, analizando las fotografías con un software de análisis de imagen, Image ProPlus, se realizaron mediciones morfométricas de las diferentes tinciones: área tumoral vs. sana teñida e intensidad de dicha tinción pudiendo establecer 3 niveles de intensidad de tinción (0, 1+ y 2+).

En todas las tinciones realizadas, ambos anticuerpos (anti-CB1 y anti-CB2) tiñeron las muestras de NSCLC únicamente en las zonas tumorales, dejando el

resto de las zonas sin teñir (paneles 1 a 12). Los patrones de tinción fueron similares para los dos anticuerpos, tanto anti-CB1 como anti-CB2 demostraron una especificidad elevada, permitiendo diferenciar entre tejido tumoral versus tejido sano.

De los tipos celulares marcados, cabe destacar que se conservó la especificidad. Se tiñeron las células tumorales mayoritariamente. De forma puntual, aparecen teñidos los núcleos de algunos neumocitos en tejido sano, aunque es difícil de evaluar debido a la morfología de dichas células. También se observó alguna célula del sistema vascular con tinción citoplasmática positiva débil como las células endoteliales, también difíciles de evaluar debido a la morfología aplanada de las mismas.

Las células del sistema inmunitario adyacente al tejido tumoral no aparecieron teñidas, a excepción de los macrófagos. Los linfocitos intra-tumorales (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TILs), los infiltrados linfocitarios peri-tumorales, así como los acúmulos de linfocitos extra-tumorales dieron negativo en la tinción con anti-CB1 y anti-CB2 (paneles 3, 4, 5, 9, 10, 11 y 12).

Se observó una tinción citoplasmática con refuerzo de membrana en algunas preparaciones. Mayoritariamente fue uniforme, aunque se vio, en algunas raras ocasiones, alguna célula tumoral y probablemente algún macrófago con una tinción granular, siendo siempre esta citoplasmática. Tras el análisis con el software de análisis de imagen de las fotografías tomadas con el microscopio digital, de forma general, se constató que la tinción con anti-CB1 era menos intensa que con anti-CB2.

Así, las tinciones realizadas con anti-CB1 fueron predominantemente de nivel 1 en las regiones tumorales en las que hubo reacción y de nivel 0 en el resto del tejido. Con el anticuerpo Anti-CB2, las regiones tumorales teñidas

fueron más intensas, clasificables en el nivel 2 de intensidad (Figura 4.3, paneles A y B).

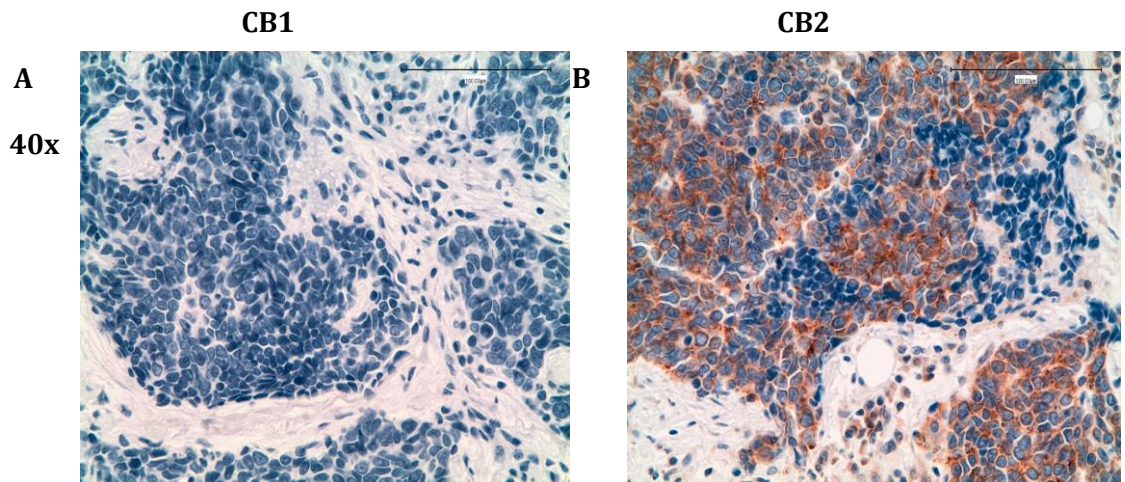


Figura 4.3: Detalle de la tinción de CB1 y CB2 en tejidos tumoral e infiltrado inflamatorio.

4.3. THC/CBD inhiben la proliferación y la expresión de EGFR en las células de cáncer de pulmón

A continuación, nos propusimos estudiar si los agonistas de cannabinoides THC y CBD podían tener algún efecto en lo relativo a la proliferación de células cancerígenas. Para ello, utilizamos un modelo in vitro desarrollado con tres líneas de células cancerígenas de referencia como son las células A549, H460 y H1792. Todas las líneas celulares incluidas presentaron una expresión significativa de los receptores CB1 y CB2, siendo la expresión de CB1 mayor que la de CB2 ($6,58 \pm 1,29$ -fold, $n=6$, $p=0,0136$; $3,15 \pm 1,07$ -fold, $n=6$, $p=0,016$; y $2,15 \pm 0,45$ -fold, $n=6$, $p=0,00247$, para A549, H460 y H1792 respectivamente). Utilizamos un rango de concentraciones entre 10 y 100 μM , dado que estudios piloto desarrollados por nosotros utilizando MTS

demonstraron un efecto citotóxico de ambos compuestos para concentraciones superiores a 100 μM .

Tanto el THC como el CBD de manera aislada o en combinación, inhibieron significativamente la proliferación de las células A549 de una manera dosis dependiente (Figura 4.4A). con una IC_{50} para THC y CBD de 27,25 μM y 37,71 μM respectivamente. La combinación de ambos cannabinoides redujo significativamente la IC_{50} hasta 12.94 μM , demostrando de esta manera un efecto aditivo de estas sustancias. Se encontraron resultados similares para las células H460 (IC_{50} de 30,64 μM , 39,78 μM y 8,04 μM respectivamente, Figura 4.4B) y para las células H1792 (IC_{50} de 33,39 μM , 46,41 μM y 14,55 μM respectivamente, Figura 4.4C). En todos los casos, el efecto anti-proliferativo de THC/CBD fue inhibido por la toxina Pertussis (PTX) a 100 ng/mL. En base a los datos calculados, se acordó utilizar una dosis IC_{50} de 30 μM para THC y CBD administrados en solitario y una C_{50} de 10 μM administrados en combinación para los experimentos posteriores.

Los dos agonistas de cannabinoides inhibieron la expresión de EGFR en las líneas celulares de A549, H460 y H1792 (Figura 4.4D)

4. RESULTADOS

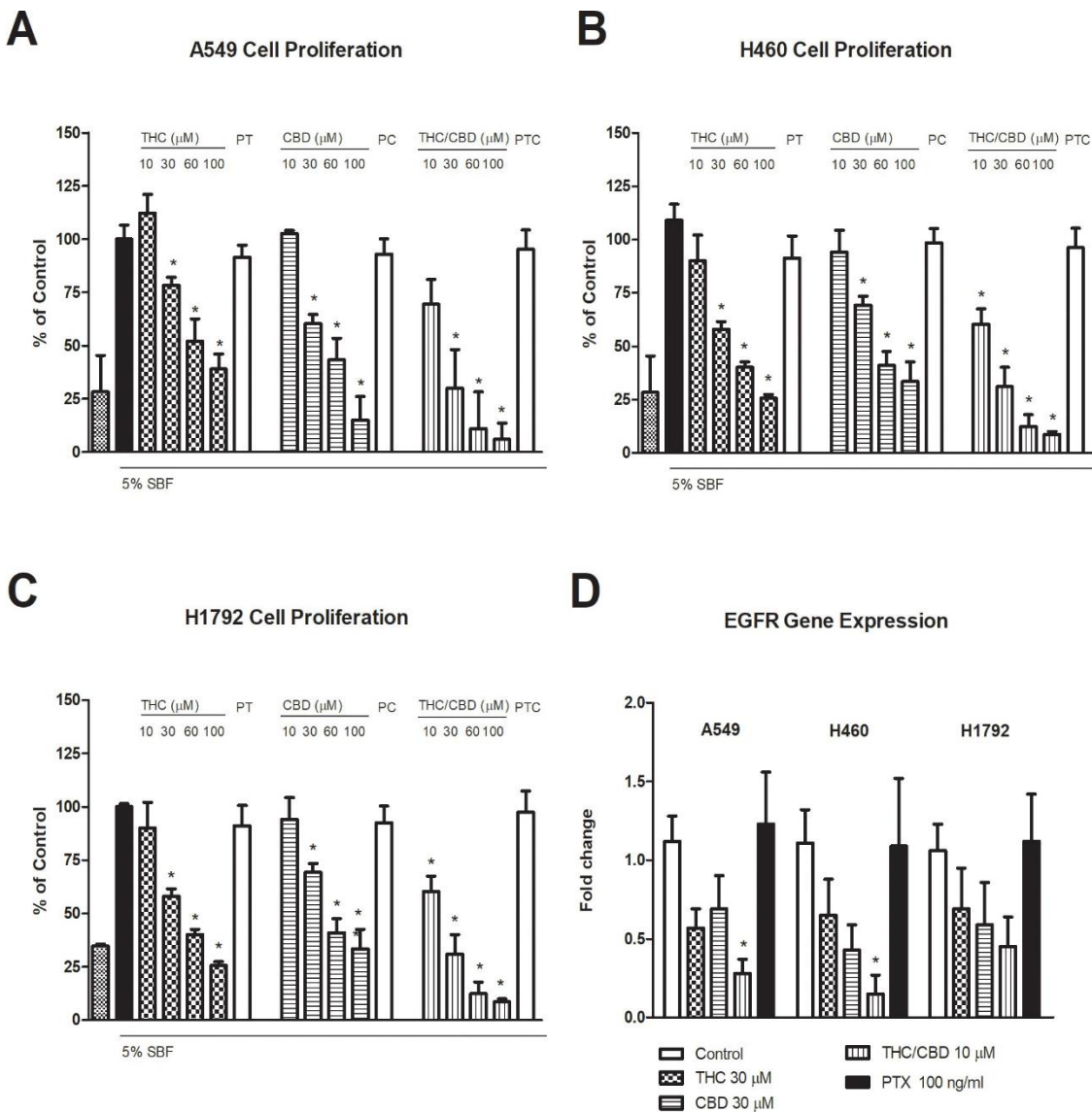


Figura 4.4: Tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) inhibieron la proliferación y la expresión de EGFR en las células de cáncer de pulmón. La proliferación de las células A549 (A), H460 (B) o H1792 (C) tratadas con 10–100 μ M de THC, CBD o CBD/THC. PT (100 μ M THC en presencia de PTX 100 ng/mL). PC (100 μ M CBD en presencia de PX 100 ng/mL). PTC (100 μ M THC/CBD en presencia de PTX 100 ng/mL). Expresión de EGFR en células

tratadas con 30 μ M THC o CBD, o 10 μ M THC/CBD en presencia o ausencia de 100 ng/mL PTX (D). Los resultados están expresados en la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes. Cada condición fue evaluada en seis réplicas de tres pocillos independientes. # $p < 0,05$ frente a el grupo control.

4.4. THC/CBD inhiben la TEM en las células de cáncer de pulmón

A fin de evaluar si los agonistas de cannabinoides THC y CBD, podían tener algún efecto modulador en la TEM, aplicamos un sistema *in vitro* utilizando las células A549, H460 y H1792 estimuladas con TGF- β a 15 ng/ml durante 48 horas en presencia o ausencia de dichos fármacos a las concentraciones indicadas en el apartado anterior. En este modelo evaluamos los cambios morfológicos con un microscopio óptico de contraste de fases.

Las células expuestas a 15 ng/ μ L de TGF- β (Figura 4.5B, 4.5J y 4.5R) se separaron más entre ellas y adquirieron una morfología más cilíndrica o en huso que las células control (Figura 4.5A, 4.5I y 4.5Q). En las células expuestas a TGF- β tratadas con 10 μ M THC/CBD este cambio de morfología se revirtió (Figura 4.5C, 4.5K y 4.5S). No se observó efecto en la adición de 10 μ M THC/CBD en las células no expuestas a TGF- β (Figura 4.5D, 4.5L y 4.5T). Estos efectos se encontraron por igual en las 3 líneas celulares de cáncer de pulmón estudiadas. No obstante, estos efectos se observaron con mayor evidencia en las líneas celulares A549 y H1792 que en la línea celulares H460.

Realizamos a continuación un estudio de citoesqueleto marcando la F-actina mediante fluorescencia utilizando faloidina acoplada a rodamina. En las células control no expuestas a TGF- β o THC/CBD, la F-actina marcada con faloidina se organizó en haces corticales estrechamente asociados a con

adhesiones célula-célula (Figura 4.5E, 4.5M y 4.5U). Tras la incubación con TGF- β durante 48 horas, las fibras de F-actina se ensamblaron en haces paralelos más estrechos (fibras de estrés de actina) que cruzaron la superficie celular (Figura 4.5F, 4.5N y 4.5V). Estos cambios se revirtieron en los cultivos tratados con 10 μ M THC/CBD (Figura 4.5G, 4.5O y 4.5W). De manera interesante, las células A549 tratadas con THC/CBD en ausencia de TGF- β mostraron una mayor adhesión célula-célula y unos haces de actina más estrechos que los de las células control (Figura 4.5H). Este efecto no se observó para las células H460 o las H1792, en las que no se observó un efecto de la adición de 10 μ M THC/CBD *per se* (Figura 4.5P y 4.5X).

4. RESULTADOS

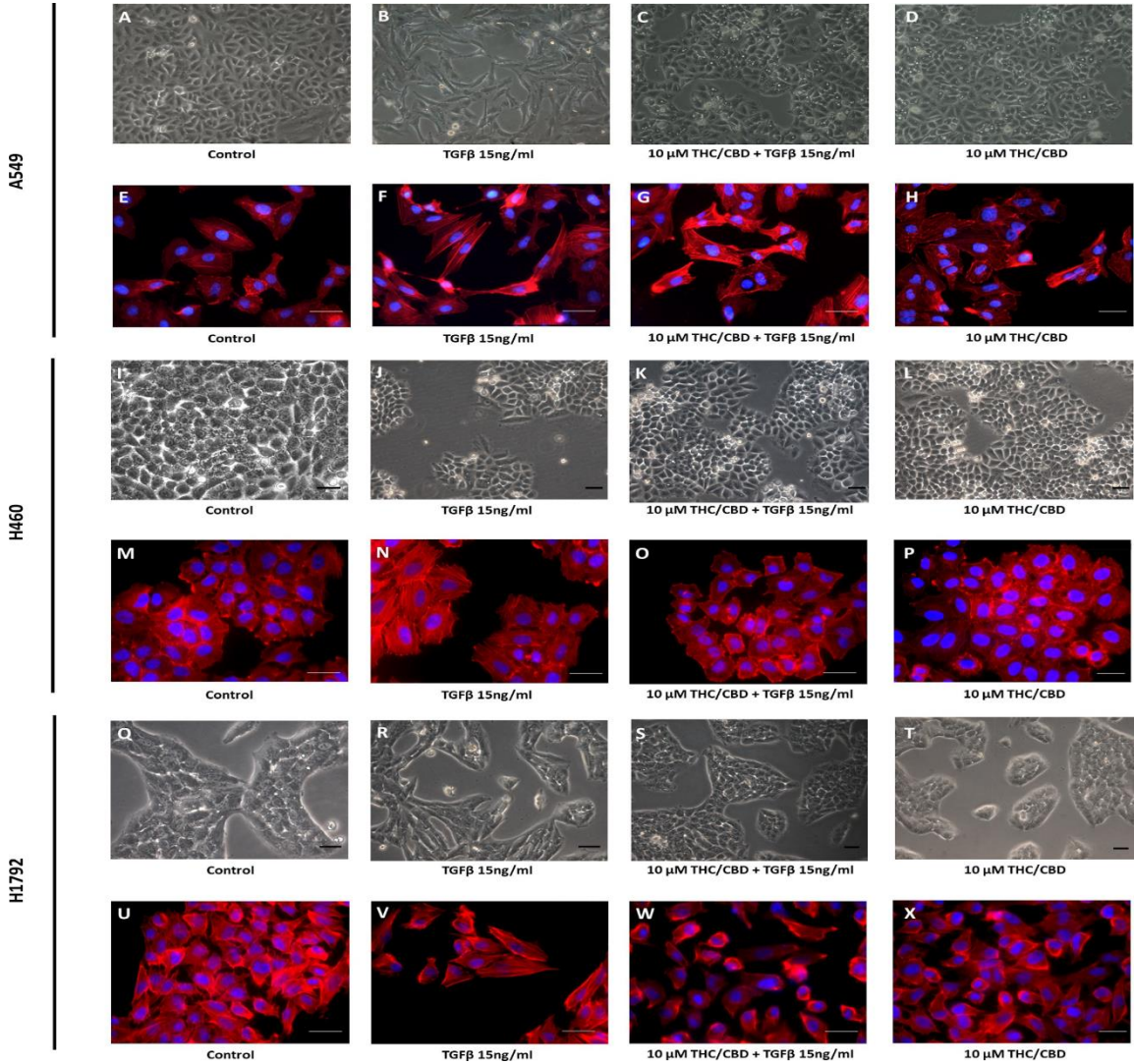


Figura 4.5: THC/CBD inhibe la transición epitelio mesénquima (TEM) en las células de cáncer. Las líneas celulares A549, H460 y H1792 fueron cultivadas en presencia o ausencia de 10 μM THC/CBD, y/o 15 ng/mL de TGF-β. Se muestran las imágenes representativas de fluorescencia de F-actina de la morfología celular. Todos los experimentos se realizaron por sextuplicado y se evaluaron cinco campos por condición. Barra de escala igual a 25 μm.

Los cambios observados en la morfología celular fueron coherentes con los de la expresión de los marcadores de TEM estudiados CDH1, CDH2 y VIM (Figura 4.6A-4.6C). La expresión de CDH1 estuvo significativamente disminuida ($0,25 \pm 0,15$, $0,30 \pm 0,27$ y $0,46 \pm 0,19$ -fold para las células A549, H460 y H1792, respectivamente), mientras que para CDH2 ($6,45 \pm 1,36$, $3,86 \pm 1,20$ y $2,75 \pm 0,97$ -fold para las células A549, H460 y H1792, respectivamente) y para VIM ($7,59 \pm 0,69$, $4,15 \pm 0,20$ y $3,91 \pm 0,39$ -fold para las células A549, H460 y H1792 respectivamente) la expresión se vio aumentada en las células estimuladas con TGF- β en comparación con el control. Estos cambios se vieron significativamente revertidos por CBD y THC en administración única (30 μ M) o en combinación (10 μ M), que restauraron los valores de expresión a valores cercanos a los encontrados en células estimuladas con CBD o THC, pero no con las células estimuladas con TGF- β . La tendencia de la expresión relativa encontrada en estas tres líneas celulares incluidas en esta investigación fue similar.

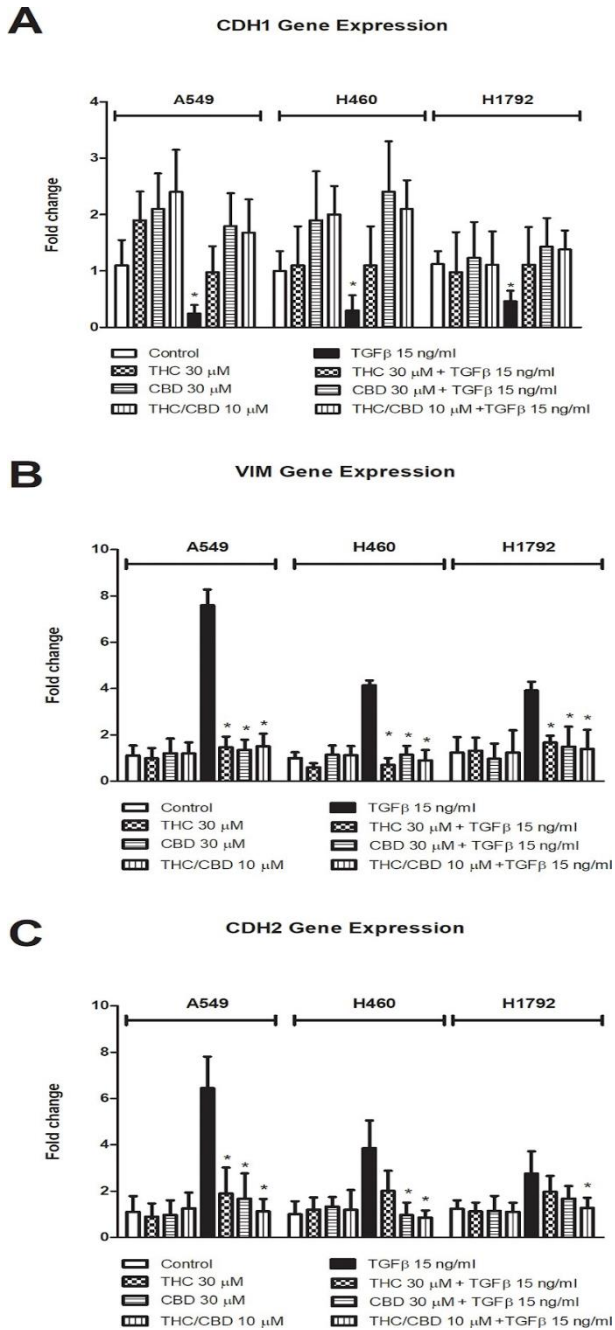


Figura 4.6: Inhibición de la expresión génica de los genes relacionados con la TEM por THC y CBD. Las células A549, H460 and H1792 fueron tratadas con 30 μ M THC o CBD, o 10 μ M THC/CBD y/o 15 ng/mL TGF- β . Los niveles de

expresión relativa de los genes CDH1 (A), VIM (B) y CDH2 fueron calculados por RT-PCR usando GAPDH como gen control endógeno. Los resultados son medias $\pm$ SD de tres experimentos independientes. Cada condición fue evaluada en seis réplicas. Se utilizó el método comparativo $\Delta\Delta C_t$ para el análisis de los datos. #p < 0,05 versus el grupo control.

4.5. Los cannabinoides inhiben la movilidad celular inducida por EGF en células de cáncer

A fin de evaluar si THC y CBD podían tener algún efecto inhibitorio en la invasión celular, establecimos un modelo *in vitro* de cicatrización utilizando las tres líneas celulares empleadas en los experimentos anteriores. Dichas células fueron cultivadas hasta confluencia en placas de 6 pocillos y se realizó un defecto utilizando una punta de pipeta de 10 μ L. Las células se estimularon con EGF a 20 ng/mL en presencia o ausencia de los agonistas de cannabinoides THC y CBD a las dosis establecidas anteriormente. A las 48 horas se analizó en porcentaje de área ocupada por las células en relación al grupo control (células estimuladas en ausencia de fármacos. Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente figura. Tal y como puede observarse, el EGF estimuló la migración celular en los 3 tipos celulares analizados (Figura4.7). Ambos cannabinoides THC y CBD inhibieron la movilidad celular en solitario o en combinación, aunque se encontraron diferencias discretas entre ellos. La inhibición producida por los dos cannabinoides testados se acercó al 30% comparado con las células no tratadas y estimuladas con EGF.

4. RESULTADOS

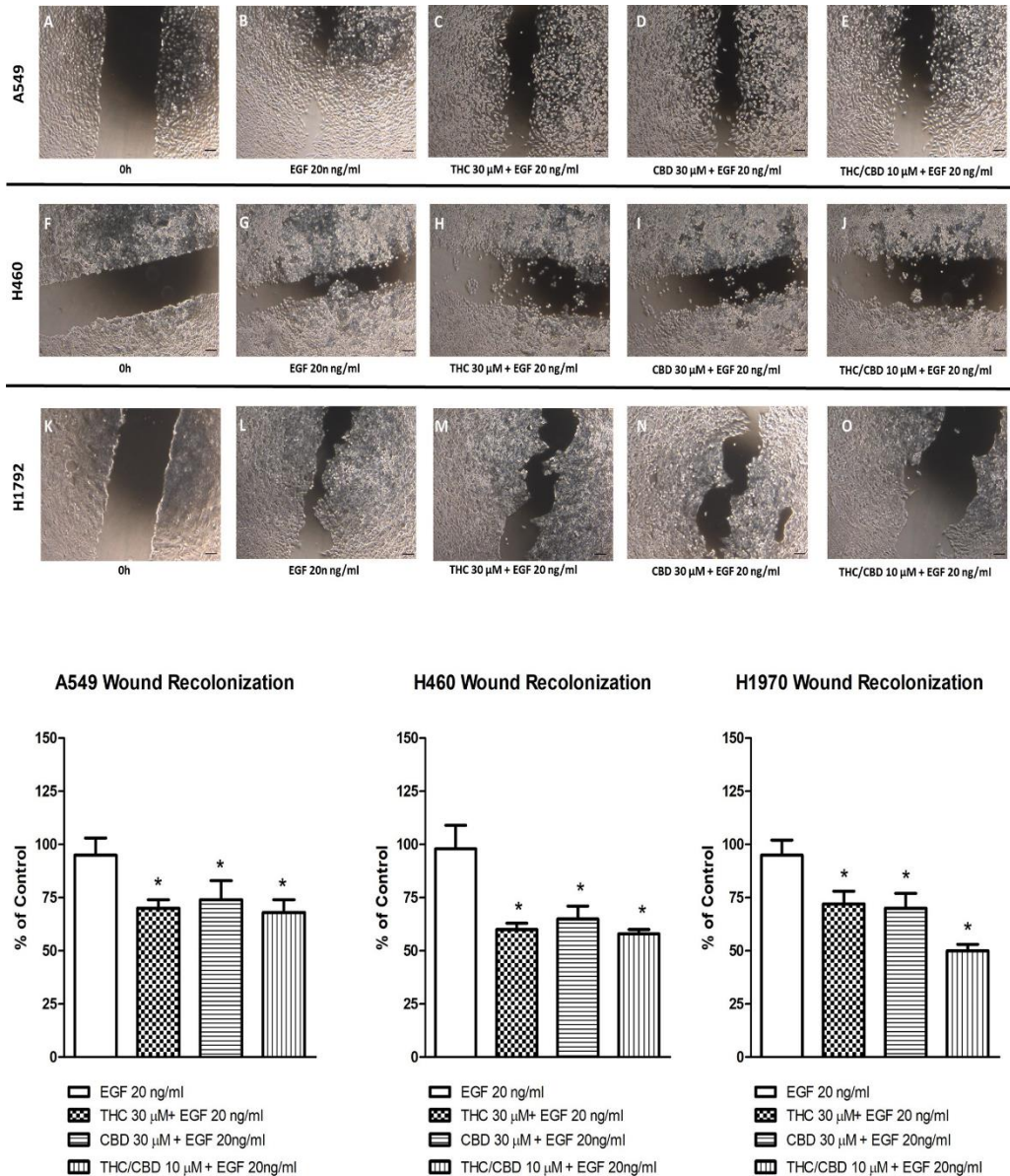


Figura 4.7: THC y CBD inhiben la migración celular inducida por EGF en células de cáncer. Las células A549, H460 y H1792 fueron cultivadas hasta confluencia. Tras el “scratching” se cultivaron las células en presencia o ausencia de 30 μ M THC o CBD, o 10 μ M THC/CBD. Se utilizó una concentración de 20 ng/mL de EGF para inducir la migración. Las células se cultivaron durante

4. RESULTADOS

48 horas. Se tomaron imágenes de contraste de fases en 5 campos de cada pocillo. Las áreas totales de cicatriz se midieron utilizando el software Scion Image, y se calculó el porcentaje de recolonización de la cicatriz. Los resultados se muestran en medias $\pm$ SD de tres experimentos independientes. #p < 0,05 versus grupo control. La barra de escala es igual a 50 μ m.

5. DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) es el tipo de cáncer de mayor mortalidad en España. Es una enfermedad agresiva que está estrechamente asociada al tabaquismo y que se disemina con frecuencia. Tanto es así, que es muy habitual diagnosticar pacientes con metástasis. Aunque los primeros ensayos clínicos parecían indicar una mayor efectividad de la radioterapia frente a otros tratamientos [122] [123], debido a las bajísimas tasas de supervivencia, la quimioterapia ha emergido como tratamiento de elección para esta enfermedad. No obstante, algunas características del NSCLC, como la sobre-actividad de EGFR, reducen la eficacia limitada de la misma [124]. Desgraciadamente, el uso de inhibidores selectivos de EGFR o anticuerpos monoclonales de contra EGFR ha fracasado por la aparición de resistencias entre otras causas, por lo que otras terapias contra esta enfermedad están bajo investigación.

Casi dos tercios de los pacientes con NSCLC albergan una mutación conductora oncogénica, aproximadamente la mitad de los cuales tienen una lesión terapéuticamente abordable, lo que amplía las opciones de tratamiento y conduce a mejoras en la supervivencia y la seguridad en comparación con la quimioterapia convencional [125]. A pesar del creciente número de opciones de tratamiento disponibles, la recaída sigue siendo inevitable. Un diagnóstico tardío y la resistencia al tratamiento son algunas de las causas de su gravedad [126].

Aunque el tratamiento con terapias dirigidas mejora los resultados en pacientes con NSCLC, las respuestas a estos agentes son generalmente incompletas y temporales generándose resistencias a los mismos. Estas resistencias pueden clasificarse en resistencia intrínseca, resistencia adaptativa y resistencia adquirida [127]. La resistencia intrínseca, implica una

baja respuesta al tratamiento inicial y está relacionada con mutaciones conductoras (*driver*) que son insensibles a la terapia, como ocurre con las inserciones del exón 20 de EGFR, que generalmente son insensibles a los inhibidores de tirosina quinasa (TKI) de EGFR disponibles actualmente. En el caso de la adaptativa, se da una respuesta inicial parcial a la terapia, hasta que las células tumorales experimentan cambios adaptativos tempranos que permiten su supervivencia y persistencia continua después de la terapia. La resistencia adquirida probablemente surge de una combinación de selección de alteraciones genéticas preexistentes dentro de una población de células tumorales inicialmente heterogénea y de la adquisición de nuevas alteraciones bajo la presión selectiva impuesta por la terapia.

Por otra parte, los mecanismos de resistencia se pueden clasificar como *on-target* y *off-target*.

La resistencia al objetivo (*on-target*) ocurre cuando se altera el objetivo principal del fármaco, lo que limita la capacidad del fármaco para inhibir la actividad de su objetivo. La resistencia fuera del objetivo (*off-target*) se produce por la activación de eventos de señalización colaterales que son paralelos o posteriores a la señalización de la oncoproteína impulsora. Estos eventos de señalización colaterales evitan el requisito de la oncoproteína impulsora para la supervivencia y el crecimiento celular [127].

El microambiente tumoral (TEM) desempeña un papel fundamental en la progresión del tumor y la resistencia a los medicamentos, siendo de especial relevancia el rol de los CAFs en la generación, no solo de la progresión del tumor, sino de la adquisición de resistencias. Así, las interacciones dinámicas entre las células tumorales y los componentes estromales dentro del TME influyen en la respuesta a la terapia con TKI y potencian las conexiones y redundancias dentro de los fenotipos moleculares e histológicos que subyacen a la resistencia.

Los CAF establecen una comunicación cruzada positiva y recíproca con células tumorales, estimulando la proliferación tumoral, la invasión e incluso promoviendo la resistencia a los medicamentos [128] [129]. Por ejemplo, la secreción de múltiples factores de acción paracrina de los CAF, incluido el HGF, promueve la activación de ERK y la consiguiente resistencia a EGFR-TKI en células tumorales de NSCLC. Acción que se puede revertir y restaurar la sensibilidad la sensibilidad celular.

Los CAF pueden también promover la TEM al secretar factores de crecimiento tras estar expuestos a terapias citotóxicas. De esta manera, los niveles elevados de N-cadherina e integrina $\beta 1$, que son mediadores de la adhesión del tumor a la matriz extra-celular, se han asociado con la resistencia a EGFR TKI mediante la activación de la vía PI3K-AKT [130].

Existe actualmente una alta actividad en la investigación del estudio de fármacos contra elementos del microambiente tumoral, como los CAFs o las células mesenquimales, que podrían aportar beneficios en el tratamiento de varios tipos de cáncer. Y es en esta línea en la que podrían ser de relevancia los agonistas de receptores de cannabinoides. Estos fármacos se han utilizado en modelos *in vivo* e *in vitro* en cáncer de mama y de próstata entre otros [105] [131]. Los cannabinoides activan la proteína específica G acoplada a receptores CB1 y CB2. Aunque la expresión de CB1 haya sido asociada al cerebro y CB2 con el sistema inmunitario, ambos receptores se expresan con más o menos intensidad en todos los órganos (placenta, hígado, células endometriales, músculo liso y riñón). Aunque la expresión de CB1 y CB2 en el NSCLC ha sido evaluada, a nuestro entender, ningún estudio ha explorado la correlación entre sus niveles de expresión y las características histopatológicas y clínicas de los pacientes con NSCLC. Nuestros resultados indican que la EPOC está significativamente asociada con la expresión de CB2 ($p=0,02$) pero no con CB1 ($p=0,758$). CB2 sí mantiene una relación con el tabaquismo; la adicción a

la nicotina, por ejemplo, se inhibe con antagonistas de CB2 en ratón [132] y los niveles de mRNA de CB2 aumentan tras dejar de fumar marihuana [133]. Puesto que el tabaquismo es el causante mayor de la EPOC, se necesita realizar nuevos estudios de esta asociación para comprender mejor la relación entre la EPOC y el cáncer de pulmón [134].

Es de destacar que los estudios clínicos en relación al valor pronóstico de la expresión de CB han aportado resultados discrepantes. En tumores del sistema nervioso, hay una relación entre la alta expresión de CB1 y CB2 en astrocitomas, y CB2 con glioblastomas y la alta malignidad [135] [136]. En contraste, La alta expresión de CB2 está asociada con un aumento de la invasión de macrófagos en tumores cerebrales*. De hecho, la alta expresión de CB1 está asociada con un aumento de la agresividad de los cánceres de colon y próstata [137]. En contraste, la alta expresión de CB1 y CB2 indican periodos de supervivencia libres de enfermedad mayores en pacientes con hepatocarcinomas [138], mientras que una expresión menor de CB1 se correlaciona con una menor supervivencia en pacientes con carcinomas ductales pancreáticos [139]. En este trabajo, pacientes con NSCLC con mayor expresión de CB1 y CB2 muestran mayor supervivencia, lo que apoya un potencial uso como biomarcadores.

Los tratamientos antitumorales más novedosos y efectivos que están surgiendo en esta última década se basan en su especificidad de acción frente a las células tumorales. La efectividad de estos tratamientos es mucho mayor comparado con los tratamientos genéricos que se han venido utilizando hasta ahora. De aquí deriva el término de “medicina de precisión”, cuyo objetivo final es tratar cada tumor según su perfil biológico particular, mejorando la efectividad de los fármacos administrados y evitando así, en gran parte, los efectos secundarios. Una condición para abordar el estudio de una nueva diana terapéutica es pues la especificidad de la sustancia empleada contra la

diana en cuestión. En este trabajo, hemos demostrado que los NSCLC expresan de forma específica anticuerpos anti-CB1 y anti-CB2, no haciéndolo el resto de entidades celulares de los tejidos. Estos resultados avalan el estudio de la expresión de receptores CB1 y CB2 como potenciales biomarcadores de pronóstico genuino en el entorno del NSCLC y, a su vez, por su significado biológico, posibles dianas farmacológicas.

Una vez caracterizado el papel de los receptores de cannabinoides como posibles biomarcadores, nos planteamos estudiar si, además, pueden servir como diana terapéutica efectiva. Para ello, hemos utilizado un modelo *in vitro* con células A549, H460 y H1792. Aunque se trata de un modelo simple, que no representa al microambiente tumoral, supone una primera aproximación experimental al estudio del papel de los agonistas de cannabinoides en el NSCLC destinado a encauzar las siguientes decisiones. Así, este primer abordaje persigue estudiar los efectos de estos compuestos en un modelo sencillo para luego ir añadiendo niveles de complejidad. En dicho modelo hemos utilizado THC y CBD como agonistas de CB1 y CB2. Se trata de agonistas de cannabinoides sintéticos ampliamente utilizados cuya farmacología es bien conocida. Además, los hemos usado en combinación, aunque el THC tiene marcados efectos antiinflamatorios, su uso es limitado por los efectos no deseados a nivel de sistema nervioso central. El CBD se utiliza en combinación con el THC puesto que potencia estos efectos y, además, inhibe estos efectos perniciosos del THC. Esta combinación ya se utiliza en clínica y está comercializada con el nombre de Sativex®, que es una mezcla a partes iguales de THC y CBD que se administra para combatir el dolor crónico en pacientes oncológicos y no oncológicos [140] así como para mitigar los efectos secundarios de la quimioterapia [141]. Así mismo han demostrado un efecto marcado en el tratamiento de algunas enfermedades desmielinizantes, como por ejemplo para mitigar los espasmos en la esclerosis múltiple [142], siendo además siendo evaluados en otras patologías como el Parkinson, Alzheimer,

el síndrome de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, los traumatismos cerebrales, la epilepsia o el glioblastoma [143].

Aunque se ha reportado que los agonistas de receptores de cannabinoides inhiben la proliferación en modelos experimentales de cáncer de mama, próstata y hueso[104], poco se sabe en relación a los efectos de la combinación de THC/CBD, así como de los mecanismos celulares y moleculares implicados. Nuestros resultados indican que el THC y el CBD inhiben la proliferación celular de forma dosis dependiente. Además, el CBD potencia el efecto anti-proliferativo del THC en las células A549, H460 y H1792, en concordancia con artículos previos [83] [101]. La combinación más efectiva en este sentido, se corresponde con la mezcla a proporción 1:1 de THC y CBD. Esta mezcla, utilizando dosis menores de THC, se asemeja a la utilizada en el fármaco Sativex®. Se potencia el CBD frente al THC y se consigue asimismo minimizar los efectos a nivel del SNC producidos por la actividad psicoactiva del THC.

Con el desarrollo de la “medicina de precisión”, la terapia molecular dirigida se ha utilizado ampliamente en el campo de la oncología, especialmente en el cáncer de pulmón de células no pequeñas. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un objetivo bien reconocido y eficaz para las terapias de NSCLC; la terapia dirigida de EGFR con inhibidores de tirosina quinasa de EGFR (EGFR-TKI) ha logrado una eficacia clínica muy importante en los últimos años. Desafortunadamente, la resistencia a los EGFR-TKI ocurre inevitablemente debido a varios mecanismos después de un periodo de terapia. La sobreexpresión o mutación del gen EGFR promueve significativamente el crecimiento y la división celular en el NSCLC. Algunas de estas mutaciones se han identificado como impulsores oncogénicos del NSCLC y confieren una mayor sensibilidad a los inhibidores de la tirosina quinasa EGFR (EGFR-TKI). Sin embargo, después de 9 a 12 meses de tratamiento con

EGFR-TKI de primera generación, los pacientes desarrollan resistencia adquirida. Los fármacos de segunda y tercera generación también acaban produciendo resistencia a los medicamentos a través de la adquisición de nuevas mutaciones [124]. No obstante, el EGFR se ha erigido como la diana clave para el tratamiento de NSCLC. En nuestros estudios hemos encontrado que, tanto el THC como el CBD, también reducen la expresión de EGFR en los tres tipos de líneas celulares analizados. Se sabe que ambos cannabinoides inhiben la vía de EGFR que modula la proliferación de las células tumorales [144] [145] [124]. Sería necesario ver si esta reducción se produce también a nivel proteico y si tiene algún efecto funcional. Todo esto supone una limitación del modelo y son necesarios nuevos experimentos para profundizar en estos aspectos.

El cáncer de pulmón tiene una gran propensión a diseminar e invadir otros tejidos. Experimentos previos han demostrado que el THC inhibe la migración EGFR-inducida de las células A549 y metástasis subcutánea en ratones con inmunodeficiencia combinada severa. En el cáncer de pulmón, la TEM/ MET es crucial en proceso de metástasis. Se trata de procesos biológicos de plasticidad celular intrínsecos a las células por los que éstas pueden cambiar de forma dinámica su fenotipo de epitelial a otro más mesenquimal. Son mecanismos críticos para el desarrollo embrionario, en procesos fisiológicos normales como en la remodelación tisular, la curación de heridas, la fibrosis, etc. y, como se ha constatado últimamente, en la diseminación de las células tumorales. Las proteínas clave en la TEM/ MET están bien caracterizadas y se conoce el papel que desempeñan durante el proceso. Así, la N-cadherina, la vimentina y la α -SMA son las moléculas distintivas que se sintetizan en las células de fenotipo mesenquimal y la E-cadherina y la citoqueratina en el epitelial.

La familia de las proteínas TGF- β están implicadas en proliferación, apoptosis, diferenciación celular, hematopoyesis, angiogénesis, migración, entre otras funciones fisiológicas. Es también un mediador bioquímico fundamental en cáncer de pulmón. Este hecho, unido a que el proceso de TEM/ MET es clave en la evolución de un proceso tumoral, decidimos desarrollar un modelo para verificarlo con células A549 estimuladas con TGF- β . Para ello cultivamos células A549, H460b y H1792 con TGF a 5 ng/ml. Esta dosis es similar a la utilizada por otros autores. Hemos utilizado un único mediador inductor de la EMT, el TGF- β , dado que aunque el microambiente tumoral existen muchas otras moléculas que intervienen, esta es sin duda la de mayor relevancia y el que mejor caracteriza el TEM en cáncer de pulmón.

Nuestros resultados relacionados con la migración celular están en línea con los previamente reportados. Ambos agonistas de cannabinoides inhibieron la migración celular mediada por EGF en las líneas celulares A549, H460 y H1792. El CBD tiene un efecto aditivo en la inhibición de la migración de las células mediada por el THC, lo que apoya el beneficio del uso combinado de ambos cannabinoides. La metástasis en tumores epiteliales implica una serie de cambios fenotípicos conocidos como TEM. Los cannabinoides han demostrado ser inhibidores de la TEM en tumores gástricos, endometriales y NSCLC. Sin embargo, esta importante propiedad de los cannabinoides no ha sido estudiada en profundidad. Por esta razón, hemos explorado el efecto de THC/CBD en la TEM en células de cáncer tratadas con TGF- β *in vitro*.

La diseminación de un tumor desde su localización primaria a una diferente ocurre de forma natural en la gran mayoría de los tumores y es un síntoma de mala evolución de la enfermedad. Evitar la metástasis tumoral es uno de los grandes desafíos en la oncología moderna. La migración celular es indicativa de la existencia de metástasis y el poder detectarla es primordial para dirigir el tratamiento del paciente. Existen varios sistemas para medir la

migración celular. En nuestro trabajo, hemos optado por el por realizar ensayos de cicatrización de heridas (*Scratch Assay* o *Wound Healing Assay*) con las líneas diferentes líneas celulares. Se trata de la técnica de referencia para el estudio de migración. Hemos aplicado como inductor el EGF, un potente activador de la migración, en presencia o ausencia de THC/ CBD. Nuestros resultados muestran cómo el EGF fue efectivo induciendo la migración y los cannabinoides consiguieron, no obstante, inhibirla. Además, la combinación de ambos cannabinoides, THC y CBD, fue más efectiva que su uso por separado.

El resultado del estudio de la remodelación del citoesqueleto de células cultivadas y tratadas con/ sin TGF- β y con/ sin cannabinoides, que posteriormente se observó al microscopio con fluorescencia, fueron coherentes con los datos obtenidos de expresión de genes característicos de la TEM. La combinación de THC/CBD inhibió los cambios morfológicos observados a nivel de organización del citoesqueleto, así como a nivel de la expresión de marcadores característicos de la EMT, incluyendo la disminución de CDH1 y el aumento de CDH2 y VIM. De manera interesante, en células A549, en ausencia de TGF- β y expuestas a CBD y THC, se observa un incremento de la adhesión célula-célula y una reducción del grosor de las vainas de actina en comparación con el control. Estos efectos se pueden explicar por el fenotipo mesenquimal de las células A549 que son de origen epitelial; de hecho, estas células producen TGF- β *. Por lo tanto, THC y CBD suprimen el fenotipo basal de TEM, lo que potencia la importancia de los cannabinoides como medicamentos.

En este estudio, hemos utilizado un modelo simple y que no representa la complejidad del microambiente tumoral, que no ha sido analizado. No obstante, se trata de un modelo de referencia necesario para sentar los principios de comportamiento e interacción entre los diferentes actores. Y

poder de esta manera orientarnos para utilizar posteriormente modelos más representativos. Para sufragar algunas de las posibles carencias existentes del modelo primario, planificamos realizar experimentos con CAFs aislados de pacientes en combinación con células de cáncer. Para ello, vamos a utilizar sistemas de cultivo 3-D con esferoides, ya que, a nuestro parecer, representan la complejidad de la lesión en humanos mejor que los modelos animales.

En resumen, nuestros resultados apoyan el estudio del uso de agonistas de receptores de cannabinoides como apoyo a las terapias existentes en NSCLC, dado que podrían contribuir a la inhibición de la proliferación y diseminación de células cancerígenas.

6. CONCLUSIONES

Pese a las limitaciones que presenta este estudio, los resultados obtenidos apoyan la investigación con relación a los agonistas de cannabinoides como posibles agentes farmacológicos para complementar las terapias existentes para el tratamiento del cáncer de pulmón, ya que podrían tener efectos beneficiosos en relación a la inhibición de la TEM, diseminación y proliferación de las células cancerígenas.

De manera más concreta, los resultados obtenidos permiten establecer las siguientes conclusiones:

En el estudio de la cohorte de pacientes,

- 1- En todas las muestras estudiadas, hemos detectado niveles significativos de expresión de los receptores CB1 y CB2. Con respecto a la correlación entre las diferentes variables clínico-patológicas y los niveles de expresión de dichos genes, únicamente hemos encontrado una correlación significativa entre el diagnóstico de EPOC y la expresión de CB2.
- 2- Con respecto a la supervivencia de los pacientes, hemos encontrado una correlación positiva entre niveles de expresión elevados de CB1, CB2 o de ambos genes y la supervivencia de los pacientes incluidos, lo que apunta a una posible relación entre dichos niveles y el tiempo de supervivencia.
- 3- Hemos encontrado expresión significativa en la expresión de los dos receptores estudiados a nivel proteico, como demuestran los estudios de inmunohistoquímica. Nuestros resultados parecen indicar una tinción positiva para ambos receptores para las áreas tumorales, mientras que la tinción fue negativa en las zonas sanas circundantes. Las células tumorales fueron las que se tiñeron mayoritariamente, apareciendo tinciones residuales en algunos neumocitos y en algunas

6. CONCLUSIONES

células endoteliales. Con respecto a las células del sistema inmune, únicamente los macrófagos fueron positivos para la inmunotinción.

En el modelo de líneas celulares,

- 4- La proliferación se ve inhibida por los efectos de los cannabinoides siendo la combinación más efectiva de la THC:CBD (1:1).
- 5- Los cannabinoides se pueden considerar una diana terapéutica efectiva puesto que tanto el THC como el CBD reducen la expresión de EGFR.
- 6- Los cannabinoides han demostrado ser también inhibidores de la TEM actuando sobre el citoesqueleto y la expresión de genes como VIM, CDH1 y CDH2 en A549.
- 7- Ambos agonistas de cannabinoides inhiben la capacidad de migración de EGF en modelos celulares A549, H460 y H1792.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] “Las cifras del cáncer en España 2020 Hombres,” 2020.
- [2] J. Malhotra, M. Malvezzi, E. Negri, C. La Vecchia, and P. Boffetta, “Risk factors for lung cancer worldwide,” *Eur. Respir. J.*, vol. 48, no. 3, pp. 889–902, Sep. 2016.
- [3] “Cancer Tomorrow.” [Online]. Available: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?cancers=39&single_unit=1000000. [Accessed: 03-Feb-2021].
- [4] H. Lemjabbar-Alaoui, O. U. Hassan, Y.-W. Yang, and P. Buchanan, “Lung cancer: Biology and treatment options.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1856, no. 2, pp. 189–210, Dec. 2015.
- [5] J. Wang *et al.*, “Genetic predisposition to lung cancer: comprehensive literature integration, meta-analysis, and multiple evidence assessment of candidate-gene association studies,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 8371, 2017.
- [6] V. Boolell, M. Alamgeer, D. N. Watkins, and V. Ganju, “The Evolution of Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 7, pp. 1815–1846, 2015.
- [7] I. Petersen and A. Warth, “Lung cancer: developments, concepts, and specific aspects of the new WHO classification.,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 142, no. 5, pp. 895–904, May 2016.
- [8] W. D. Travis *et al.*, “The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 10, no. 9, pp. 1243–1260, 2015.
- [9] C. Hasovits and N. Pavlakis, “FO R U M RARE MOLECULAR SUBSETS AMONG LUNG TUMOURS -WHAT MAKES THEM STAND APART FROM THE COMMON?,” *CancerForum*, vol. 39, no. 1, 2015.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [10] “The Cancer Genome Atlas (TCGA).” [Online]. Available: <https://www.genome.gov/Funded-Programs-Projects/Cancer-Genome-Atlas>. [Accessed: 17-Jan-2021].
- [11] “Welcome | ICGC Data Portal.” [Online]. Available: <https://dcc.icgc.org/>. [Accessed: 17-Jan-2021].
- [12] L. B. Alexandrov *et al.*, “Signatures of mutational processes in human cancer,” *Nature*, vol. 500, no. 7463, pp. 415–21, Aug. 2013.
- [13] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of Cancer: The Next Generation,” 2011.
- [14] J. E. Larsen and J. D. Minna, “Molecular Biology of Lung Cancer : Clinical Implications,” *Clin. Chest Med.*, vol. 32, no. 4, pp. 703–740, 2012.
- [15] W. Pao and N. Girard, “New driver mutations in non-small-cell lung cancer,” *Lancet Oncol.*, vol. 12, no. 2, pp. 175–180, 2011.
- [16] J. E. Bailey-Wilson *et al.*, “A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 75, no. 3, pp. 460–74, Sep. 2004.
- [17] A. L. Marshall and D. C. Christiani, “Genetic susceptibility to lung cancer--light at the end of the tunnel?,” *Carcinogenesis*, vol. 34, no. 3, pp. 487–502, Mar. 2013.
- [18] R. J. Hung *et al.*, “A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25,” *Nature*, vol. 452, no. 7187, pp. 633–637, 2008.
- [19] C. I. Amos *et al.*, “Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1,” *Nat.*

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Genet.*, vol. 40, no. 5, pp. 616–22, May 2008.
- [20] R. J. Hung *et al.*, “Inherited predisposition of lung cancer: a hierarchical modeling approach to DNA repair and cell cycle control pathways,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 16, no. 12, pp. 2736–44, Dec. 2007.
- [21] W. D. Foulkes, “Inherited Susceptibility to Common Cancers,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 20, pp. 2143–2153, 2008.
- [22] “Smoking and lung cancer: An overview.,” p. 1985, 1985.
- [23] A. Thomas *et al.*, “Clinical and Genomic Characteristics of Small Cell Lung Cancer in Never Smokers: Results From a Retrospective Multicenter Cohort Study,” *Chest*, vol. 158, no. 4, pp. 1723–1733, 2020.
- [24] M. Torres-Durán *et al.*, “Small cell lung cancer in never-smokers,” *Eur. Respir. J.*, vol. 47, no. 3, pp. 947–953, Mar. 2016.
- [25] A. M. Chapman, K. Y. Sun, P. Ruestow, D. M. Cowan, and A. K. Madl, “Lung cancer mutation profile of EGFR, ALK, and KRAS: Meta-analysis and comparison of never and ever smokers,” *Lung Cancer*, vol. 102, pp. 122–134, 2016.
- [26] Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) and Red Española de Registros del Cáncer (REDECAN), *Las cifras del cáncer en España.2022.* 2022.
- [27] F. Islami, L. A. Torre, and A. Jemal, “Global trends of lung cancer mortality and smoking prevalence,” *Transl. lung cancer Res.*, vol. 4, no. 4, pp. 327–38, Aug. 2015.
- [28] J. J. Gómez *et al.*, “Recomendaciones para la determinación de

- biomarcadores en el carcinoma de pulmón no microcítico avanzado. Consenso nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica,” *Rev. Esp. Patol.*, vol. 45, no. 1, pp. 14–28, 2012.
- [29] D. Montezuma, R. Azevedo, P. Lopes, R. Vieira, A. L. Cunha, and R. Henrique, “A panel of four immunohistochemical markers (CK7, CK20, TTF-1, and p63) allows accurate diagnosis of primary and metastatic lung carcinoma on biopsy specimens,” *Virchows Arch.*, vol. 463, no. 6, pp. 749–754, 2013.
- [30] D. S. Ettinger *et al.*, “Non–Small Cell Lung Cancer, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology,” *J. Natl. Compr. Cancer Netw.*, vol. 20, no. 5, pp. 497–530, May 2022.
- [31] G. Bepler *et al.*, “Randomized international phase III trial of ERCC1 and RRM1 expression-based chemotherapy versus gemcitabine/carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 19, pp. 2404–2412, 2013.
- [32] S. J. Park, S. More, A. Murtuza, B. D. Woodward, and H. Husain, “New Targets in Non–Small Cell Lung Cancer,” *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 31, no. 1, pp. 113–129, 2017.
- [33] Z. Zhang, N. Ramnath, and S. Nagrath, “Current Status of CTCs as Liquid Biopsy in Lung Cancer and Future Directions,” *Front. Oncol.*, vol. 5, p. 209, 2015.
- [34] M. Früh, D. De Ruysscher, S. Popat, L. Crinò, S. Peters, and E. Felip, “Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up,” *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 24 Suppl 6, no. SUPPL.6, 2013.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [35] R. García-Campelo *et al.*, “SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) 2015,” *Clin. Transl. Oncol.*, vol. 17, no. 12, pp. 1020–1029, 2015.
- [36] E. Thunnissen, K. van der Oord, and M. den Bakker, “Prognostic and predictive biomarkers in lung cancer. A review,” *Virchows Arch.*, vol. 464, no. 3, pp. 347–358, Mar. 2014.
- [37] L. E. Hendriks *et al.*, “Oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up,” *Ann. Oncol.*, vol. 34, no. 4, pp. 339–357, 2023.
- [38] Z. Chen, C. M. Fillmore, P. S. Hammerman, C. F. Kim, and K.-K. Wong, “Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 14, no. 8, pp. 535–546, Jul. 2014.
- [39] I. Pastushenko *et al.*, “Identification of the tumour transition states occurring during EMT,” *Nature*, vol. 556, no. 7702, 2018.
- [40] I. Pastushenko and C. Blanpain, “EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis,” *Trends Cell Biol.*, vol. 29, no. 3, pp. 212–226, Mar. 2019.
- [41] T. Z. Tan *et al.*, “Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 6, no. 10, pp. 1279–93, Oct. 2014.
- [42] M. A. Nieto, R. Y. Y. J. Huang, R. A. A. Jackson, and J. P. P. Thiery, “Emt: 2016,” *Cell*, vol. 166, no. 1, pp. 21–45, 2016.
- [43] Tam WL & Weinberg, “The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer,” *Nat Med.*, vol. 19, no. 11, pp. 1438–1449, 2013.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [44] D. S. Micalizzi, S. M. Farabaugh, and H. L. Ford, "Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 15, no. 2. Springer, pp. 117–134, Jun-2010.
- [45] D. M. Gonzalez and D. Medici, "Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition.," *Sci. Signal.*, vol. 7, no. 344, p. re8, Sep. 2014.
- [46] J. Banyard and D. R. Bielenberg, "The role of EMT and MET in cancer dissemination," *Connect. Tissue Res.*, vol. 56, no. 5, pp. 403–413, 2015.
- [47] R. Kalluri and R. A. Weinberg, "The basics of epithelial-mesenchymal transition.," *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 6, pp. 1420–8, Jun. 2009.
- [48] F. Moheimani *et al.*, "Disruption of β -catenin/CBP signaling inhibits human airway epithelial-mesenchymal transition and repair," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 68, pp. 59–69, 2015.
- [49] M. Yilmaz and G. Christofori, "EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 28, no. 1–2, pp. 15–33, 2009.
- [50] H. Ko, "Geraniin inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and suppresses A549 lung cancer migration, invasion and anoikis resistance," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 25, no. 17, pp. 3529–3534, Sep. 2015.
- [51] Y. Li, A. X. Gao, and L. Yu, "Monitoring of TGF- β 1-Induced Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells Epithelial-Mesenchymal Transformation Process by Measuring Cell Adhesion Force with a Microfluidic Device," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 178, no. 1, pp.

114–125, 2016.

- [52] R. Derynck, B. P. Muthusamy, and K. Y. Saetern, “Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 31, pp. 56–66, Dec. 2014.
- [53] J.-R. Yu *et al.*, “TGF- β /Smad signaling through DOCK4 facilitates lung adenocarcinoma metastasis,” *Genes Dev.*, vol. 29, no. 3, pp. 250–61, Feb. 2015.
- [54] M. Saitoh, “Epithelial-mesenchymal transition is regulated at post-transcriptional levels by transforming growth factor- β signaling during tumor progression,” *Cancer Sci.*, vol. 106, no. 5, pp. 481–8, May 2015.
- [55] E. Meulmeester and P. Ten Dijke, “The dynamic roles of TGF-beta in cancer,” *J. Pathol.*, no. October 2010, pp. 205–218, 2010.
- [56] Y. Liu, Z. Qin, K. Yang, R. Liu, and Y. Xu, “Cripto-1 promotes epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer via Wnt/ β -catenin signaling,” *Oncol. Rep.*, vol. 37, no. 3, pp. 1521–1528, 2017.
- [57] P. Papageorgis, “TGF ?? signaling in tumor initiation, epithelial-to-mesenchymal transition, and metastasis,” *J. Oncol.*, vol. 2015, 2015.
- [58] C. Signaling, “TGF- β Signaling,” *Cell Signal. Technol.*, no. November 2012, pp. 1–2, 2010.
- [59] K. Steinestel, S. Eder, A. J. Schrader, and J. Steinestel, “Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition,” *Clin. Transl. Med.*, vol. 3, p. 17, 2014.
- [60] A. Villarejo, Á. Cortés-Cabrera, P. Molina-Ortíz, F. Portillo, and A. Cano, “Differential role of snail1 and snail2 zinc fingers in E-cadherin

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- repression and epithelial to mesenchymal transition,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 2, pp. 930–941, 2014.
- [61] E. Casas, J. Kim, A. Bendesky, L. Ohno-Machado, C. J. Wolfe, and J. Yang, “Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis,” *Cancer Res. Cancer Res. January*, vol. 1, no. 711, pp. 245–254, 2011.
- [62] A. Eger *et al.*, “DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells,” *Oncogene*, vol. 24, no. 14, pp. 2375–2385, 2005.
- [63] C. Vandewalle *et al.*, “SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 20, pp. 6566–6578, 2005.
- [64] A. Miyoshi *et al.*, “Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells,” *Br. J. Cancer*, vol. 90, no. 6, pp. 1265–1273, Mar. 2004.
- [65] C. P. Bracken *et al.*, “A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition,” *Cancer Res.*, vol. 68, no. 19, pp. 7846–54, Oct. 2008.
- [66] S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, “Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition,” *Natl. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 3, pp. 178–196, 2014.
- [67] J. H. Lee and J. Massagué, “TGF- β in developmental and fibrogenic EMTs,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 86, no. September, pp. 136–145, 2022.
- [68] B. Ozdamar, R. Bose, M. Barrios-Rodiles, H. R. Wang, Y. Zhang, and J. L. Wrana, “Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors

- controls epithelial cell plasticity," *Science* (80-.), vol. 307, no. 5715, pp. 1603–1609, 2005.
- [69] S. Lamouille, E. Connolly, J. W. Smyth, R. J. Akhurst, and R. Derynck, "TGF- β -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion," *Development*, vol. 139, no. 10, pp. 1259–1273, 2012.
- [70] A. Marchetti *et al.*, "ERK5/MAPK is activated by TGF β in hepatocytes and required for the GSK-3 β -mediated Snail protein stabilization," *Cell. Signal.*, vol. 20, no. 11, pp. 2113–2118, 2008.
- [71] G. Breier, M. Grosser, and M. Rezaei, "Endothelial cadherins in cancer," *Cell Tissue Res.*, vol. 355, no. 3, pp. 523–527, Mar. 2014.
- [72] B. O. Sun, Y. Fang, Z. Li, Z. Chen, and J. Xiang, "Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression.," *Biomed. reports*, vol. 3, no. 5, pp. 603–610, Sep. 2015.
- [73] A. Satelli and S. Li, "Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 68, no. 18, pp. 3033–46, Sep. 2011.
- [74] R. G. Pertwee, "Targeting the endocannabinoid system with cannabinoid receptor agonists: pharmacological strategies and therapeutic possibilities.," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 367, no. 1607, pp. 3353–63, Dec. 2012.
- [75] M. R. Hoehe *et al.*, "Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15," *New Biol.*, vol. 3, no. 9, pp. 880–885, 1991.
- [76] M. Valenti *et al.*, "The endocannabinoid system in the brain of

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carassius auratus and its possible role in the control of food intake," *J. Neurochem.*, vol. 95, no. 3, pp. 662–672, 2005.
- [77] L. A. Matsuda, S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young, and T. I. Bonner, "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA," *Nature*, vol. 346, no. 6284, pp. 561–564, 1990.
- [78] K. Soderstrom, E. Soliman, and R. Van Dross, "Cannabinoids Modulate Neuronal Activity and Cancer by CB1 and CB2 Receptor-Independent Mechanisms," *Front. Pharmacol.*, vol. 8, p. 720, 2017.
- [79] R. Al-Zoubi, P. Morales, and P. H. Reggio, "Molecular Sciences Structural Insights into CB1 Receptor Biased Signaling."
- [80] S. S. du Plessis, A. Agarwal, and A. Syriac, "Marijuana, phytocannabinoids, the endocannabinoid system, and male fertility.," *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 32, no. 11, pp. 1575–1588, Nov. 2015.
- [81] S. Sylantyev, T. P. Jensen, R. A. Ross, and D. A. Rusakov, "Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses," *PNAS*, vol. 110, no. 13, pp. 5193–5198, 2013.
- [82] J. M. McPartland, G. W. Guy, and V. Di Marzo, "Care and feeding of the endocannabinoid system: A systematic review of potential clinical interventions that upregulate the endocannabinoid system," *PLoS One*, vol. 9, no. 3, 2014.
- [83] B. Chakravarti, J. Ravi, and R. K. Ganju, "Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications.," *Oncotarget*, vol. 5, no. 15, pp. 5852–72, Aug. 2014.
- [84] W. A. Devane *et al.*, "Isolation and structure of a brain constituent

- that binds to the cannabinoid receptor," *Science* (80-.), vol. 258, no. 5090, pp. 1946–1949, Dec. 1992.
- [85] T. Sugiura *et al.*, "2-arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 215, no. 1. pp. 89–97, 1995.
 - [86] P. Massi, M. Solinas, V. Cinquina, and D. Parolaro, "Cannabidiol as potential anticancer drug.," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 75, no. 2, pp. 303–12, Feb. 2013.
 - [87] J. Bouskila, C. Micaelo-Fernandes, R. M. Palmour, J. F. Bouchard, and M. Ptito, "Transient receptor potential vanilloid type 1 is expressed in the horizontal pathway of the vervet monkey retina," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020.
 - [88] V. Di Marzo and F. Piscitelli, "The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids," *Neurotherapeutics*, vol. 12, no. 4, pp. 692–698, 2015.
 - [89] S. Nicolussi and J. Gertsch, "Endocannabinoid transport revisited," *Vitam. Horm.*, vol. 98, pp. 441–485, 2015.
 - [90] C. J. Hillard *et al.*, "Endocannabinoid Transport Proteins: Discovery of Tools to Study Sterol Carrier Protein-2 HHS Public Access," *Methods Enzym.*, vol. 593, pp. 99–121, 2017.
 - [91] F. Solórzano-Santos and M. G. Miranda-Novales, "Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 23, no. 2. Curr Opin Biotechnol, pp. 136–141, Apr-2012.
 - [92] E. M. Rock and L. A. Parker, "Constituents of Cannabis Sativa," in *Advances in experimental medicine and biology*, vol. 1264, Adv Exp

Med Biol, 2021, pp. 1–13.

- [93] M. Moreno-Martet, F. Espejo-Porras, J. Fernández-Ruiz, and E. De Lago, “Changes in endocannabinoid receptors and enzymes in the spinal cord of *sod1g93a* transgenic mice and evaluation of a sativex®-like combination of phytocannabinoids: Interest for future therapies in amyotrophic lateral sclerosis,” *CNS Neurosci. Ther.*, vol. 20, no. 9, pp. 809–815, 2014.
- [94] J. Sachs, E. Mcglade, and D. Yurgelun-Todd, “Safety and Toxicology of Cannabinoids,” 2015.
- [95] R. G. Pertwee, “The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 153, no. 2, pp. 199–215, Jan. 2008.
- [96] A. C. Howlett and M. E. Abood, “CB1 and CB2 Receptor Pharmacology,” *Adv. Pharmacol.*, vol. 80, pp. 169–206, 2017.
- [97] J. Huffman and K.-S. Marriott, “Recent Advances in the Development of Selective Ligands for the Cannabinoid CB2 Receptor,” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 8, no. 3, pp. 187–204, 2008.
- [98] T. E. D’mbra *et al.*, “Conformationally Restrained Analogues of Pravadoline: Nanomolar Potent, Enantioselective, (Aminoalkyl)indole Agonists of the Cannabinoid Receptor,” *J. Med. Chem.*, vol. 35, no. 1, pp. 124–135, Jan. 1992.
- [99] R. G. Pertwee, “Pharmacological Actions of Cannabinoids,” *Cannabinoids*, pp. 1–51, 2005.
- [100] I. Pharmacy, A. I. Fraguas-Sánchez, C. Martín-Sabroso, and A. I. Torres-Suárez, “Insights into the effects of the endocannabinoid

- system in cancer : a review,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 175, no. 13, pp. 2566–2580, Jul. 2018.
- [101] P. Śledziński, J. Zeyland, R. Słomski, and A. Nowak, “The current state and future perspectives of cannabinoids in cancer biology,” *Cancer Med.*, vol. 7, no. 3, pp. 765–775, 2018.
- [102] E. S. Seltzer, A. K. Watters, D. Mackenzie, L. M. Granat, and D. Zhang, “Cannabidiol (Cbd) as a promising anti-cancer drug,” *Cancers*, vol. 12, no. 11. MDPI AG, pp. 1–26, 01-Nov-2020.
- [103] R. Ramer and B. Hinz, *Cannabinoids as Anticancer Drugs*, 1st ed., vol. 80. Elsevier Inc., 2017.
- [104] C. F. Almeida, N. Teixeira, G. Correia-Da-silva, and C. Amaral, “Cannabinoids in Breast Cancer: Differential Susceptibility According to Subtype,” *Molecules*, vol. 27, no. 1, Jan. 2021.
- [105] T. Kisková, F. Mungenast, M. Suváková, W. Jäger, and T. Thalhammer, “Future aspects for cannabinoids in breast cancer therapy,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 7, Apr. 2019.
- [106] R. Kaur and F. A. Javid, “Could cannabinoids provide a new hope for ovarian cancer patients?,” *Pharmacol. Res. Perspect.*, vol. 11, no. 4, Aug. 2023.
- [107] D. J. Hermanson and L. J. Marnett, “Cannabinoids, endocannabinoids, and cancer,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 30, no. 3–4, pp. 599–612, Dec. 2011.
- [108] D. Vara, C. Morell, N. Rodríguez-Henche, and I. Diaz-Laviada, “Involvement of PPAR γ in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma,” *Cell Death Dis.*, vol. 4, no. 5, p. e618, May 2013.

- [109] S. E. O'Sullivan, "An update on PPAR activation by cannabinoids.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 173, no. 12, pp. 1899–910, Jun. 2016.
- [110] J. Flygare and B. Sander, "The endocannabinoid system in cancer-potential therapeutic target?," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 18, no. 3, pp. 176–89, Jun. 2008.
- [111] M. Pysznik, "Endocannabinoid system as a regulator of tumor cell malignancy – biological pathways and clinical significance
Endocannabinoid system as a regulator of tumor cell malignancy – biological pathways and clinical significance," no. August, pp. 4323–4336, 2016.
- [112] S. Pisanti, P. Picardi, A. D'Alessandro, C. Laezza, and M. Bifulco, "The endocannabinoid signaling system in cancer," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 34, no. 5, pp. 273–282, May 2013.
- [113] S. Sarfaraz, V. M. Adhami, D. N. Syed, F. Afaq, and H. Mukhtar, "Cannabinoids for cancer treatment: progress and promise.," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 2, pp. 339–42, Jan. 2008.
- [114] L. T. Li *et al.*, "Cannabinoid receptors promote chronic intermittent hypoxia-induced breast cancer metastasis via IGF-1R/AKT/GSK-3 β ," *Mol. Ther. oncolytics*, vol. 23, pp. 220–230, Dec. 2021.
- [115] W. Xiang *et al.*, "Monoacylglycerol lipase regulates cannabinoid receptor 2-dependent macrophage activation and cancer progression," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018.
- [116] M. Nabissi *et al.*, "Cannabinoids synergize with carfilzomib, reducing multiple myeloma cells viability and migration," *Oncotarget*, vol. 7, no. 47, pp. 77543–77557, Oct. 2016.
- [117] L. Deng, L. Ng, T. Ozawa, and N. Stella, "Quantitative Analyses of

- Synergistic Responses between Cannabidiol and DNA-Damaging Agents on the Proliferation and Viability of Glioblastoma and Neural Progenitor Cells in Culture s,” *J. Pharmacol. Exp. Ther. J Pharmacol Exp Ther*, vol. 360, pp. 215–224, 2017.
- [118] P. Mukhopadhyay *et al.*, “The novel, orally available and peripherally restricted selective cannabinoid CB2 receptor agonist LEI-101 prevents cisplatin-induced nephrotoxicity,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 173, no. 3, pp. 446–458, Feb. 2016.
- [119] M. Guzmán *et al.*, “A pilot clinical study of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme,” *Br. J. Cancer*, vol. 95, no. 2, pp. 197–203, 2006.
- [120] D. A. Ladin, E. Soliman, L. Griffin, and R. Van Dross, “Preclinical and Clinical Assessment of Cannabinoids as Anti-Cancer Agents.,” *Front. Pharmacol.*, vol. 7, p. 361, 2016.
- [121] F. Patti *et al.*, “Efficacy and safety of cannabinoid oromucosal spray for multiple sclerosis spasticity.”
- [122] S. K. Vinod and E. Hau, “Radiotherapy treatment for lung cancer: Current status and future directions,” *Respirology*, vol. 25, no. S2, pp. 61–71, 2020.
- [123] S. Brown, K. Banfill, M. C. Aznar, P. Whitehurst, and C. F. Finn, “The evolving role of radiotherapy in non-small cell lung cancer,” *Br. J. Radiol.*, vol. 92, no. 1104, 2019.
- [124] R. F. Dong *et al.*, “EGFR mutation mediates resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in NSCLC: From molecular mechanisms to clinical research,” *Pharmacol. Res.*, vol. 167, May 2021.
- [125] J. Wu and Z. Lin, “Non-Small Cell Lung Cancer Targeted Therapy:

- Drugs and Mechanisms of Drug Resistance,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 23, 2022.
- [126] F. R. Hirsch *et al.*, “Lung cancer: current therapies and new targeted treatments,” *Lancet*, vol. 389, no. 10066, pp. 299–311, 2017.
- [127] J. Rotow and T. G. Bivona, “Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, no. 11, pp. 637–658, 2017.
- [128] D. Fukumura *et al.*, “Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells,” *Cell*, vol. 94, no. 6, pp. 715–725, Sep. 1998.
- [129] J. Alexander and E. Cukierman, “Stromal dynamic reciprocity in cancer: intricacies of fibroblastic-ECM interactions,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 42, pp. 80–93, Oct. 2016.
- [130] Q. F. Deng, B. Su, Y. M. Zhao, L. Tang, J. Zhang, and C. C. Zhou, “Integrin $\beta 1$ -mediated acquired gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cells occurs via the phosphoinositide 3-kinase-dependent pathway,” *Oncol. Lett.*, vol. 11, no. 1, pp. 535–542, Jan. 2016.
- [131] K. Singh, N. Jamshidi, R. Zomer, T. J. Piva, and N. Mantri, “Cannabinoids and Prostate Cancer: A Systematic Review of Animal Studies,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 17, pp. 1–15, Sep. 2020.
- [132] Z. X. Xi *et al.*, “ $\Delta 8$ -Tetrahydrocannabivarin has potent anti-nicotine effects in several rodent models of nicotine dependence,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 176, no. 24, pp. 4773–4784, Dec. 2019.
- [133] D. Muhl *et al.*, “Increased CB2 mRNA and anandamide in human blood after cessation of cannabis abuse,” *Naunyn. Schmiedeberg. Arch. Pharmacol.*, vol. 387, no. 7, pp. 691–695, 2014.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [134] C. Qi, S. W. Sun, and X. Z. Xiong, "From COPD to Lung Cancer: Mechanisms Linking, Diagnosis, Treatment, and Prognosis," *Int. J. COPD*, vol. 17, pp. 2603–2621, 2022.
- [135] N. Stella, "Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas," *Glia*, vol. 58, no. 9, pp. 1017–1030, Jul. 2010.
- [136] M. Schley *et al.*, "Predominant CB2 receptor expression in endothelial cells of glioblastoma in humans," *Brain Res. Bull.*, vol. 79, no. 5, pp. 333–337, Jun. 2009.
- [137] V. Tutino *et al.*, "Receptor and its Downstream Signaling Pathways in Metastatic Colorectal Cancer," vol. 1.
- [138] X. Xu *et al.*, "Overexpression of cannabinoid receptors CB1 and CB2 correlates with improved prognosis of patients with hepatocellular carcinoma," *Cancer Genet. Cytogenet.*, vol. 171, no. 1, pp. 31–38, Nov. 2006.
- [139] J. J. Shelke, A. R. , Roscoe, J. A. , Morrow, G. R. , Colman, L. K. , Banerjee, T. K. , & Kirshner and Perrine Susan, "Cannabinoids in pancreatic cancer: Correlation with survival and pain," *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2008.
- [140] H. Meng, T. Dai, J. G. Hanlon, J. Downar, S. M. H. Alibhai, and H. Clarke, "Cannabis and cannabinoids in cancer pain management," *Curr. Opin. Support. Palliat. Care*, vol. 14, no. 2, pp. 87–93, Jun. 2020.
- [141] P. P. Bathula and M. B. Maciver, "Cannabinoids in Treating Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting, Cancer-Associated Pain, and Tumor Growth," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 25, no. 1, p. 74, Dec. 2023.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [142] C. Oreja-Guevara, "Clinical efficacy and effectiveness of Sativex[®], a combined cannabinoid medicine, in multiple sclerosis-related spasticity," *Expert Rev. Neurother.*, vol. 12, no. 4 SUPPL., pp. 3–8, Apr. 2012.
- [143] B. S. Koppel *et al.*, "Systematic review: efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders: report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology," *Neurology*, vol. 82, no. 17, pp. 1556–1563, Apr. 2014.
- [144] A. Preet, R. Ganju, and J. Groopman, "D 9 -Tetrahydrocannabinol inhibits epithelial growth factor-induced lung cancer cell migration in vitro as well as its growth and metastasis in vivo," *Oncogene*, vol. 27, pp. 339–346, 2008.
- [145] A. Passaro, P. A. Jänne, T. Mok, and S. Peters, "Overcoming therapy resistance in EGFR-mutant lung cancer," *Nat. Cancer*, vol. 2, no. 4, pp. 377–391, 2021.