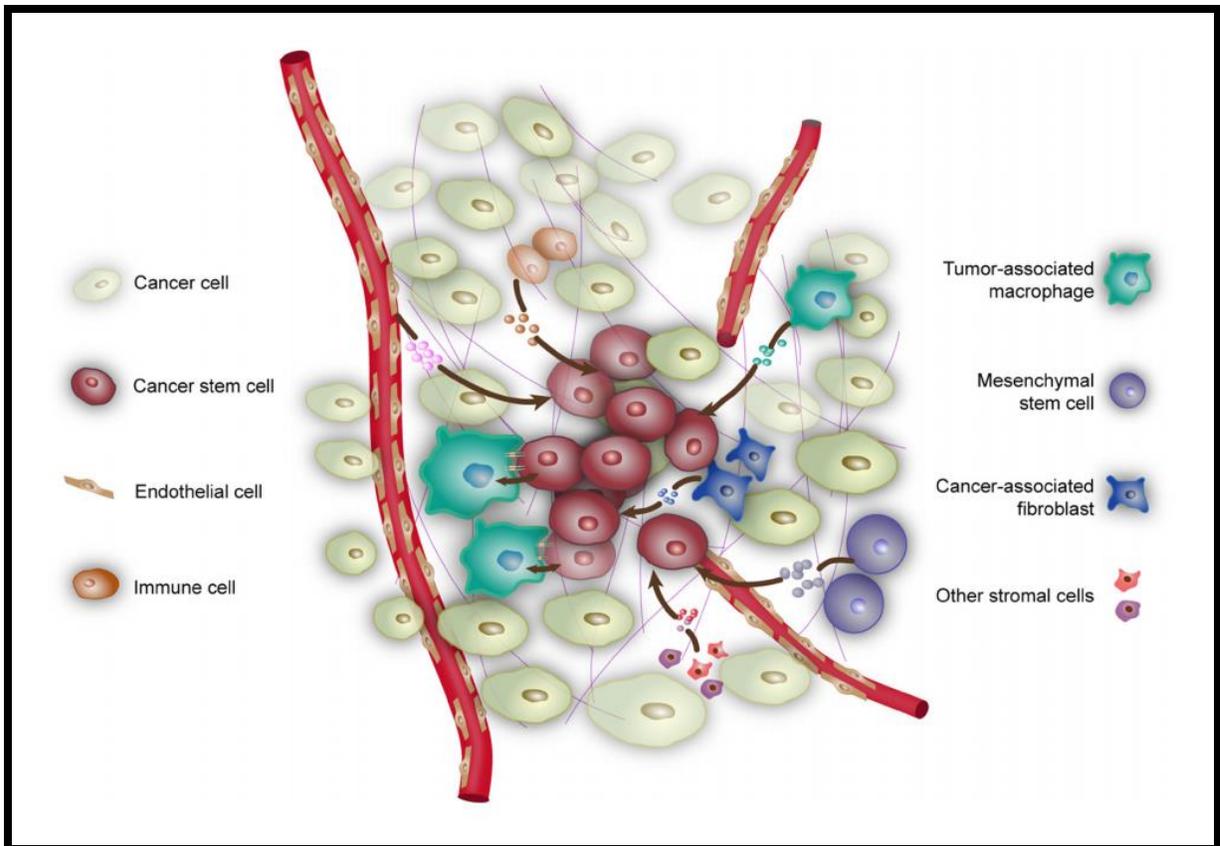


# Microambiente tumoral y células madre del cáncer.

## Modelos celulares.



PABLO MENÉNDEZ CARAVACA

Sevilla, a 5 de Junio de 2019



## ÍNDICE

<b>Índice</b> .....	I
<b>Abreviaciones</b> .....	III
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	2
<b>Antecedentes</b> .....	3
<b>Células madre del cáncer</b> .....	4
○ Modelos de organización de las células cancerosas .....	4
▪ Modelo estocástico o clonal .....	5
▪ Modelo jerárquico o de las células madre del cáncer .....	5
○ Origen de las células madre del cáncer y modelo unificado del cáncer .....	7
▪ Células madre del cáncer a partir de la transformación de células madre normales .....	8
▪ Células madre del cáncer tras un evento de dediferenciación mediado por la transición epitelio-mesénquima.....	9
▪ Células madre del cáncer a partir de células madre pluripotentes inducidas.....	11
<b>Microambiente tumoral</b> .....	11
○ Elementos del microambiente tumoral .....	12
▪ Macrófagos asociados al tumor .....	12
▪ Fibroblastos asociados al cáncer.....	13
▪ Interleucina 6 .....	14
▪ Tenascina C .....	15
▪ Factor de necrosis tumoral alfa.....	16
▪ Células madre mesenquimales .....	18
▪ Factor de crecimiento transformante beta .....	19
○ Hipoxia en el nicho.....	20
<b>Modelos celulares para el estudio de las células madre del cáncer</b> .....	22
○ Esferoides tumorales multicelulares .....	22
○ Esferoides derivados de tumores .....	22

○ Esferoides derivados del tejido tumoral .....	24
○ Esferoides multicelulares organotípicos .....	24
<b>Perspectivas futuras</b> .....	25
<b>Conclusiones</b> .....	26
<b>Bibliografía</b> .....	27

Imagen en portada: Tomado de He, J., *et al.* (2017). 3D modeling of cancer stem cell niche. *Oncotarget*, 9(1), 1326–1345. doi:10.18632/oncotarget.19847

## ABREVIACIONES

CMCs	Células madre del cáncer
TAMs	Macrófagos asociados a tumores
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
IL	Interleucina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
EMT	Transición epitelio-mesénquima
TACs	Células amplificadoras transitorias
TFs	Factores de transcripción
iPS	Células madre pluripotentes inducidas
HMLE	Células epiteliales mamarias humanas inmortalizadas
NEUROG3	Gen de la neurogenina-3
ECM	Matriz extracelular
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
VEGF-A	Factor de crecimiento endotelial vascular A
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
HCC	Hepatocarcinoma
CAFs	Fibroblastos asociados al cáncer
TNC	Tenascina C
MMP	Metaloproteinasa
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3

MSI1	Musashi-1
LGR5	Receptor 5 acoplado a proteína G con repeticiones ricas en leucina
YAP	Proteína asociada a Yes
MKL1	Leucemia megacarioblástica 1
TNFR1/ 2	Receptor 1/ 2 de factor de necrosis tumoral
TRADD	Receptor del factor de necrosis tumoral asociado a la proteína <i>death domain</i>
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
JNK	Vía de las quinasas del amino terminal de c-Jun
FADD	Proteína asociada a Fas con <i>death domain</i>
TRAF2	Factor 2 asociado a la superfamilia TNFR
MEKK	MAP quinasa quinasa quinasa
MSCs	Células madre mesenquimales
BMP	Proteína morfogénica ósea
PDA	Adenocarcinoma ductal pancreático
HIFs	Factores inducibles por hipoxia
CXCL12	Ligando 12 de la quimiocina de motivo C-X-C
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MCTS	Esferoides tumorales multicelulares
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
TDTS	Esferoides derivados del tejido tumoral
OMS	Esferoides multicelulares organotípicos

## RESUMEN

En el presente trabajo hemos estudiado todo lo concerniente a las células madre del cáncer (CMCs) con el fin de comprender su importancia en el desarrollo de esta enfermedad y cómo su entorno puede modular sus funciones. Para ello, se ha llevado a cabo una exhaustiva búsqueda e interpretación de la bibliografía más relevante y actualizada al respecto. Gran parte del interés por el estudio de estas células radica en conocer de qué forma se podría atacar a las CMCs para llevar a cabo novedosos tratamientos que logren eliminar la masa tumoral sin riesgo de metástasis ni recaída. Por este mismo motivo, también hemos dedicado una parte a hablar sobre los modelos celulares más útiles para estudiar cómo crecen y reaccionan estas células ante distintos fármacos. Así pues, hemos concluido que la existencia de las CMCs no es ya debatible, hemos explicado una nueva forma de entender la jerarquía imperante en el cáncer y hemos destacado el vital papel que ciertas citoquinas ejercen en la interacción entre las CMCs y su entorno, sin olvidar que todo ello ha sido posible, al menos en parte, gracias al uso de modelos celulares tridimensionales. Estos resultados suponen un antes y un después para el diseño de nuevos tratamientos contra el cáncer, que sin duda sufrirán una revolución en los próximos años.

### ABSTRACT:

Here we have studied every aspect as to the cancer stem cells concept in order to understand its importance in cancer and the way its environment may modulate its functions. For this purpose, an exhaustive research of the most relevant and up-to-date literature has been carried out. Much of the interest in the study of these cells lies in understanding how they could be targeted to carry out novel cancer treatments that eliminate the tumor without the risk of metastasis or relapse. For the same reason, part of our work is about the most useful cell culture models to study growth and response of these cells to different drugs. Thus, we state the existence of cancer stem cells is no longer questionable, we explained a new way of understanding cancer hierarchy, and we highlighted the key role certain cytokines exert in the interaction between cancer stem cells and its environment, as well as the role of three-dimensional cell culture models for this. These results represent a milestone when designing new treatments against cancer, which will undoubtedly undergo a revolution in the upcoming years.

## **INTRODUCCIÓN**

En la composición de toda masa tumoral encontramos numerosos y variados elementos. Principalmente, predominan células cancerosas, las cuales, lejos de ser idénticas las unas de las otras, presentan una gran heterogeneidad funcional, con diferentes capacidades proliferativas y de diferenciación. En el tumor aparecen también células del sistema inmunitario, células endoteliales y células del tejido conjuntivo, además de muchos otros elementos no celulares, como pueden ser los factores de crecimiento y las citoquinas. El conjunto de todos los elementos e interacciones que aparecen en el entorno local de una célula dentro de un tumor se define como microambiente tumoral, y este tiene importantes efectos en la forma en la que el tumor crece y se disemina [1].

Con la llegada del siglo XXI ha acontecido un gran desarrollo de los estudios acerca de una pequeña subpoblación de células tumorales clave para el desarrollo de la enfermedad, las células madre del cáncer. La hipótesis de las CMCs postula acerca de la presencia en el tumor de células cancerosas con características propias de las células madre normales, pues tienen la capacidad de dar lugar a todos los tipos celulares presentes en un cáncer concreto, es decir, son multipotentes, y a la vez se autorrenuevan [2]. Estas células aparecen en un número reducido y mantienen su población mediante lentas divisiones simétricas y asimétricas, que a su vez dan origen al grueso del tumor, al producir células progenitoras que se dividen rápidamente y que se diferenciarán a distintos tipos de células tumorales.

Estas características hacen de las CMCs elementos clave del cáncer, a la vez que brindan una gran esperanza ante la posibilidad de combatir el cáncer de una forma novedosa. Para empezar, las CMCs juegan un papel esencial en la metástasis dada su capacidad no solo de autorrenovación sino de producir células diferenciadas capaces de adaptarse a los diferentes microambientes de los órganos diana. Por este motivo, a las CMCs también se las conoce como células iniciadoras del tumor o tumorigénicas, siendo las únicas células tumorales capaces de iniciar desde cero el mismo tumor al trasplantarlas a otra parte del cuerpo o a otro animal [3]. Por otro lado, como se dijo anteriormente, a diferencia del resto de células cancerosas, llamadas células del grueso tumoral, las CMCs se dividen muy lentamente, característica que les confiere de una alta tasa de supervivencia ante los tratamientos tradicionales de radioterapia y quimioterapia, que atacan a células de rápida división, y que

las hace responsables de una posible recaída, pues estas células permanecerían en un estado de dormancia hasta que en cierto momento volvieran a dividirse activamente.

A pesar de los avances en el tratamiento del cáncer, muchos pacientes aún no consiguen una terapia eficaz, lo cual resulta en la progresión de la enfermedad, la recaída y la reducción de la supervivencia en general. Históricamente, se ha prestado mucha atención a los mecanismos genéticos y bioquímicos que causan resistencia a los medicamentos. Sin embargo, es posible que no se haya prestado atención suficiente al hecho de que el cáncer es una enfermedad heterogénea y que, como tal, la heterogeneidad intratumoral contribuye al fracaso de la terapia y a la progresión de la enfermedad.

### **ANTECEDENTES**

Las células madre del cáncer representan uno de los temas más interesantes en cuanto a la patofisiología del cáncer de los últimos años, desde que se identificaron por primera vez mientras se estudiaba un caso de leucemia mieloide humana [4], para posteriormente evidenciar su presencia también en diversos tipos de tumores sólidos, como el cáncer de mama y el cáncer de cerebro. Las similitudes y diferencias entre las células madre de tejido normal y las células madre del cáncer han sido fuente de mucha controversia, existiendo aún hoy día un intenso debate al respecto de las CMCs. Esto se debe, en parte, a las diferencias en las frecuencias observadas de las CMCs en los tumores, lo cual es un reflejo de los diversos tipos de cánceres y huéspedes utilizados para analizar estas células. No sabemos si las CMCs aparecen en todos los cánceres, pues estas células no se han encontrado en cualquier tumor.

Por otro lado, en algunos tipos de cánceres no ha sido posible distinguir las CMCs de las que no son CMCs dado que la mayoría de células funcionaban como CMCs. Estos tumores parecen ser homogéneos o poseer una jerarquía muy superficial. Estos hechos se enlazan estrechamente con la idea cada vez más manifiesta de que ciertas células cancerosas pueden exhibir una plasticidad que les permite llevar a cabo una transición reversible entre el estado de célula madre y el de célula sin características de célula madre.

En cuanto al microambiente tumoral, a veces llamado nicho, gran parte de los estudios ponen su atención en el destacado papel y presencia de los macrófagos asociados a tumores (TAMs), que llegan a suponer entre el 30 y 50 % de la masa tumoral. Estos macrófagos favorecen la proliferación tumoral y la metástasis mediante la secreción de una serie de citoquinas, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), las interleucinas (IL) 6 y 10 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que promueven a su vez la transición epitelio-mesénquima (EMT), responsable de la “*stemness*” de las células cancerosas [5]. Hay un gran número de investigaciones que demuestran que el papel del nicho sobre la invasión y la progresión tumoral se debe a la angiogénesis, la inhibición de la respuesta inmunológica (inmunosupresión) y la EMT que el conjunto de sus elementos median.

Sabemos que las interacciones entre las CMCs y el microambiente tumoral contribuyen al mantenimiento y enriquecimiento de las primeras. Por ello, en los últimos años se han desarrollado modelos celulares tridimensionales, llamados esferoides, con el fin de simular *ex vivo* las interacciones entre las células tumorales y su nicho. Estos modelos han demostrado numerosas ventajas frente a los tradicionales cultivos bidimensionales, sobre todo en cuanto a su respuesta ante agentes quimioterapéuticos. Se trata de sistemas de cultivo *in vitro* que imitan las condiciones espaciales, la heterogeneidad celular y las redes moleculares del microambiente tumoral, y suponen una esperanzadora herramienta para dilucidar la fisiopatología de las CMCs y diseñar nuevas modalidades de tratamiento clínicamente relevantes [6].

## **CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER**

### **Modelos de organización de las células cancerosas**

Anterior a la hipótesis de las CMCs, la organización del cáncer se estudiaba principalmente según el modelo estocástico, que establece que todas las células cancerosas dentro de un tumor son biológicamente equivalentes, de origen monoclonal, y que sus diferentes características y comportamientos se deben a factores estocásticos que afectan al microambiente tumoral y a la acumulación progresiva y divergente de mutaciones entre los diferentes subclones. Sin embargo, el modelo de las CMCs contempla los tumores no como

meras expansiones monoclonales de células transformadas, sino como tejidos tridimensionales complejos donde las células cancerosas se vuelven funcionalmente heterogéneas como resultado de la diferenciación [7].

Hoy en día, en lo que hay consenso es en la existencia de una amplia heterogeneidad de características morfológicas y funcionales entre las células cancerosas de un mismo tumor, como las diferencias entre los marcadores de superficie celular, la expresión génica, la capacidad proliferativa e invasiva y la respuesta terapéutica.

### **Modelo estocástico o clonal**

El modelo estocástico sugiere que los tumores surgen como un grupo homogéneo de células y que su heterogeneidad se produce como resultado de eventos aleatorios. De esta forma, una pequeña población de células tumorales va a adquirir las mutaciones apropiadas que le confieren amplias capacidades proliferativas, teniendo todas las células la misma probabilidad de que esto les ocurra, es decir, de convertirse en tumorigénicas, pues se trata de un fenómeno meramente azaroso.

### **Modelo jerárquico o de las células madre del cáncer**

Sugiere que las células cancerosas dentro de un tumor siguen una jerarquía funcional en la que las CMCs se encuentran en el ápice de la clasificación, constituyendo una pequeña subpoblación de células tumorigénicas con capacidades de células madre. Por tanto, las dos características definitorias de las CMCs, que a su vez son las que las hacen tan relevantes a la hora de estudiar y tratar el cáncer, son su capacidad de autorrenovarse, o sea, de reponer el repertorio de CMCs idénticas, incluso a largo plazo, y su capacidad de diferenciarse a células del cáncer no tumorigénicas pero que contribuyen al crecimiento del tumor, las células del grueso [8]. De esta forma, tan solo las CMCs tienen la habilidad de conducir la progresión del cáncer, por lo que presentan características específicas que pueden ser atacadas para destruir un tumor.

Las células madre, tanto aquellas de tejidos normales como las CMCs, pueden llevar a cabo divisiones asimétricas, originando así una célula hija que permanece indiferenciada y una célula hija destinada a la diferenciación y división celular, esta última conocida como célula

amplificadora transitoria o TAC (transit amplifying cell). Por tanto, las TACs son células indiferenciadas, pero comprometidas, con alta capacidad proliferativa y de rápida división, que van a dar lugar a células diferenciadas incapaces de dividirse. En el caso de las CMCs las TACs darán lugar a las células del grueso tumoral (Figura 1).

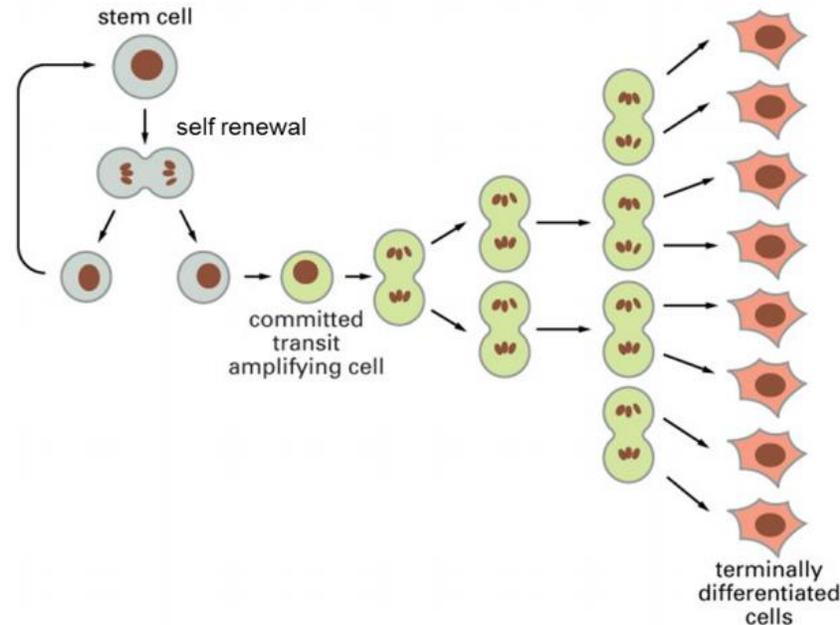


Figura 1. Formación de células transitorias amplificadoras y de la progenie diferenciada [9].

Además de las ya explicadas similitudes que las CMCs presentan con las células madre normales, se han estudiado muchas otras características compartidas por la fisiología de ambos tipos celulares, propiedades que brindan una vida útil prolongada a las CMCs, incluidas las siguientes [10]:

- Aparecen principalmente en un estado celular de relativa inactividad.
- Están altamente influenciadas por las señales de su microambiente.
- Se caracterizan por marcadores de superficie específicos y/ o por vías de transducción de señales que también son importantes en las células madre.
- Presentan altos niveles de transportadores dependientes de ATP, resistencia a apoptosis y mecanismos de reparación de ADN, lo cual, junto con su bajo índice de proliferación, otorga a estas células una resistencia particular a los protocolos radioterapéuticos y quimioterapéuticos clásicos.

No obstante, a pesar de sus numerosas características en común con las células madre normales, una diferencia de suma relevancia es que, a diferencia de las últimas, las CMCs no están sujetas a los controles habituales que limitan el crecimiento, por lo que el proceso de autorrenovación está desregulado, ocasionando el crecimiento celular descontrolado propio de esta enfermedad.

### **Origen de las células madre del cáncer y modelo unificado del cáncer**

Originalmente se teorizó que las CMCs podrían provenir de células madre normales que hubieran sufrido mutaciones genéticas y alteraciones epigenéticas que habrían eliminado su capacidad de controlar su proliferación. Con el tiempo, la idea de que células totalmente comprometidas y diferenciadas podrían desdiferenciarse durante la formación y progresión del tumor para originar CMCs se ha reevaluado. De hecho, casi cualquier célula diferenciada puede volver a un estado de pluripotencia expresando los factores de transcripción (TFs) apropiados. El proceso de desdiferenciación o reprogramación somática utilizando los llamados factores de Yamanaka, cuatro TFs empleados para la obtención de células madre pluripotentes inducidas (células iPS), ofrece una nueva idea de cómo pueden originarse las CMCs [11]. Esta interconversión reversible entre células distintas a las CMCs y CMCs indica que las diferencias entre ambos tipos celulares no se deberían a sus mutaciones o frecuencias alélicas, sino que las mayores diferencias se deben al perfil epigenético. Tal es así, la secuenciación del exoma revela mutaciones compartidas en las CMCs y las células del grueso, siendo la frecuencia de cada mutación también muy similar. El nicho donde las CMCs residen puede ser el mayor determinante del equilibrio dinámico de las distintas subpoblaciones del tumor.

Estos estudios ponen de manifiesto que los cánceres pueden no ajustarse estrictamente al modelo unidireccional de las CMCs, y consideran la posibilidad de que haya cierta "plasticidad de las células tumorales", de forma que células cancerosas que no son CMCs puedan desdiferenciarse y adquirir propiedades similares a las de las CMCs. Esta posibilidad daría cabida a una nueva forma de explicar la heterogeneidad intratumoral, proponiendo un novedoso modelo que integra tanto el modelo estocástico como el jerárquico, el modelo unificado del cáncer, pues establece que ciertas células diferenciadas

pueden reprogramarse a CMCs a la vez que mantiene que existen poblaciones de CMCs distintas al resto de células cancerosas [12].

Hasta aquí, se proponen, por tanto, tres posibles formas en las que se originan las CMCs (Figura 2), que son; la transformación maligna de células madre normales (I), la desdiferenciación de células cancerosas (II), y la inducción artificial de células cancerosas hacia células iPS (III).

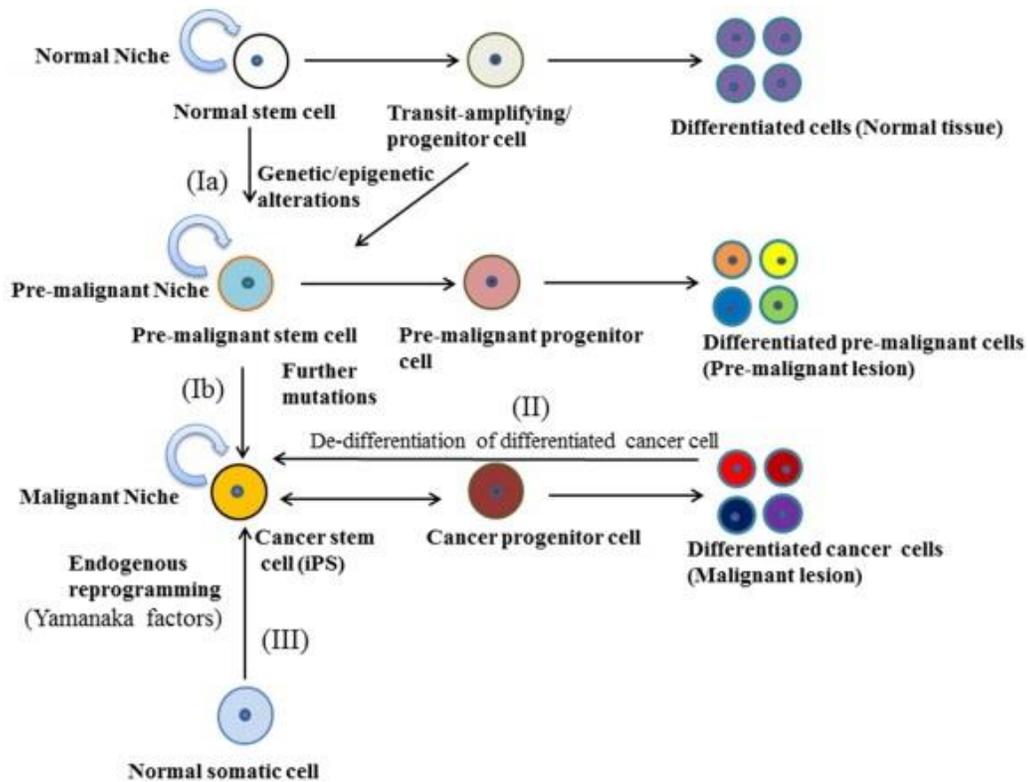


Figura 2. Distintas teorías sobre el origen de las CMCs [2].

### **Células madre del cáncer partir de la transformación de células madre normales**

Para que una célula somática normal se convierta en una célula maligna debe acumular muchas mutaciones. No obstante, dado que las mutaciones son eventos de baja frecuencia, tal acumulación de mutaciones podría tardar hasta décadas, un periodo de tiempo que ninguna célula sobreviviría, salvo las células madre adultas, gracias a su propiedad de autorrenovación. Además, las células tendrían que sufrir aún más mutaciones para llegar a tener las propiedades que comparten las CMCs y las células madre normales.

## **Células madre del cáncer tras un evento de desdiferenciación mediado por la transición epitelio-mesénquima**

Esta hipótesis sugiere que las CMCs se originan a partir de células tumorales que se desdiferencian como producto de ciertas alteraciones mayormente epigenéticas. La EMT es un proceso clave durante el desarrollo embrionario humano, la reparación de tejidos y la angiogénesis, y a menudo se activa durante la tumorigénesis y la metástasis. Se ha demostrado que la inducción de la EMT en células epiteliales mamarias humanas inmortalizadas (HMLE) da como resultado la adquisición de rasgos mesenquimales y la expresión de marcadores de células madre, como el fenotipo antigénico CD44<sup>alto</sup>/CD24<sup>bajo</sup>. A través de la EMT, las células epiteliales pierden su polaridad celular y la adhesión célula-célula, adquiriendo características migratorias e invasivas para convertirse en células mesenquimales. Estos cambios son causados por la acción de varios TFs, como Snail, Twist y TGF- $\beta$ , que son potentes represores de la expresión de genes epiteliales [13].

Si bien la trayectoria general de los procesos de desarrollo es hacia la diferenciación, las células se desdiferencian de forma parcial y transitoria cuando se someten a la EMT, de forma que estas células son más similares a las células madre que sus progenitores. A su vez, los estudios sobre el cáncer han descrito la EMT casi exclusivamente como proceso de desdiferenciación, a diferencia de lo que ocurre durante la embriogénesis. El papel de la EMT y otros procesos que aumentan la capacidad del tumor de sufrir una propagación metastásica son de suma relevancia dado el hecho de que de la vasta mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer se debe a la metástasis de las células cancerosas desde los tumores primarios hacia órganos vitales distantes, como los pulmones, el hígado, el cerebro y los huesos.

Hace una década, el equipo de Weinberg demostró que la población de CMCs del cáncer de mama puede aumentar en el interior de una neoplasia maligna mediante la desdiferenciación de células tumorales maduras a través de la EMT [14]. Posteriormente, otra investigación apoyó el concepto anterior al detectar la co-expresión de marcadores de EMT y marcadores de células madre en células tumorales de sarcoma dentro de los vasos sanguíneos de pacientes con metástasis.

Recientemente, se ha descubierto que Zeb1, un factor de transcripción involucrado en la EMT, se requiere para la conversión de células distintas a las CMCs a CMCs y para el mantenimiento de su actividad. En concreto, se ha visto que las células cancerosas distintas a las CMCs que presentan plasticidad mantienen el promotor de Zeb1 en una configuración de cromatina bivalente que les permite responder fácilmente a señales microambientales, como TGF- $\beta$ . En respuesta a tales señales, el promotor se activa y aumenta la transcripción de Zeb1, lo cual permite la generación *de novo* de CMCs a partir de poblaciones que no son CMCs.

Por otro lado, Zeb1 tiene como diana el gen de la neurogenina-3 (NEUROG3), al cual es capaz de reprimir, contribuyendo así a la formación de CMCs (Figura 3). Zeb1 suprime la transcripción de NEUROG3 al formar un complejo metiltransferasa/ histona desacetilasa en su promotor, ya que esto lleva a la hipermetilación del mismo y al silenciamiento del gen. Se observó que el rescate de la neurogenina-3 atenuó la “stemness” cancerosa inducida por Zeb1 y la división simétrica de las CMCs. Además, el análisis inmunohistológico de muestras de cáncer de mama humano reveló una fuerte relación inversa entre la expresión de la proteína Zeb1 y la neurogenina-3. Estos hallazgos sugieren que el silenciamiento de NEUROG3 mediado por Zeb1 es necesario para la iniciación y el mantenimiento del tumor de mama [15].

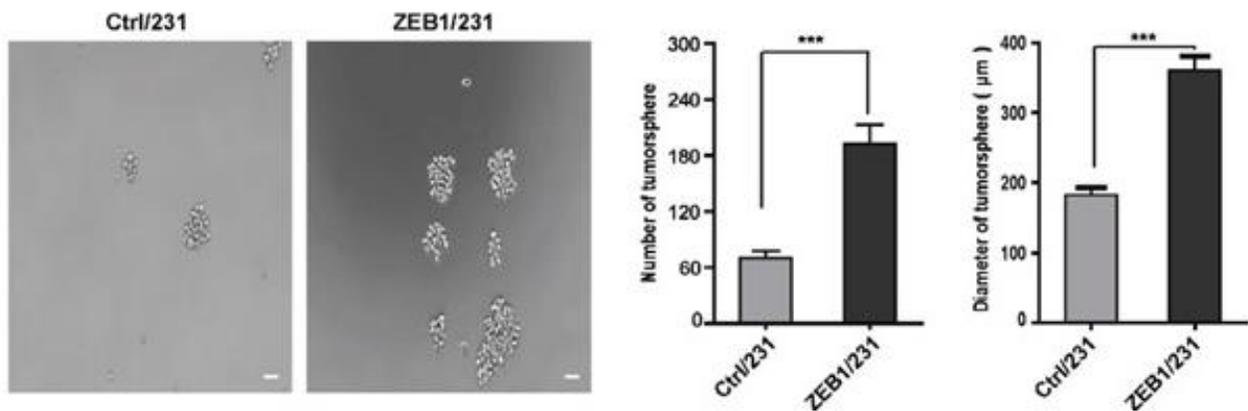


Figura 3. Tras 14 días de cultivo en placas “*ultra low binding*”, tanto el número de esferoides como el diámetro de estos fue mayor en las células Zeb1/ 231, que sobreexpresan Zeb1, en comparación con las células Ctrl/ 231, que son silvestres. Se trabajó con la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 [15].

## **Células madre del cáncer a partir de células madre pluripotentes inducidas**

La tercera hipótesis del origen de las CMCs está relacionada con el desarrollo de células madre pluripotentes inducidas. Las células iPS se obtienen *in vitro* al inducir la expresión de ciertos genes en una célula no pluripotente a través de la transducción de los cuatro factores de Yamanaka, que son; Oct3/ 4, Sox2, c-Myc y Klf4, los cuales conducen a la reprogramación celular [11]. No obstante, esta forma de obtener CMCs ocurre solo de forma artificial *in vitro*.

Todos estos hallazgos sugieren que los modelos que explican el origen de las CMCs no son excluyentes. En un cáncer, diferentes subconjuntos de células cancerosas pueden actuar de manera diferente, además de ser influenciados por sus microambientes particulares.

### **MICROAMBIENTE TUMORAL**

Un tumor no es un simple y homogéneo “saco” de células malignas, sino que en realidad es algo más parecido a un complejo ecosistema en el que aparecen células tumorales y otros elementos celulares y acelulares que van a influir en la función del tumor en su conjunto. Por ejemplo, estos elementos del nicho pueden influir directamente sobre las células tumorales creando cambios metabólicos, como un entorno hipóxico y fluctuaciones de nutrientes, que contribuyen a la heterogeneidad en la función de las células que lo componen.

El microambiente tumoral es el entorno local con el que las células interactúan mediante señales químicas y físicas, dentro de un tumor. Se trata de un medio complejo que incluye células madre del cáncer, células del grueso tumoral, células inmunitarias, células del tejido conjuntivo, y también células endoteliales de los vasos sanguíneos que rodean y alimentan el tumor. Encontramos otros elementos, como la matriz extracelular (ECM), factores de crecimiento, citoquinas, nervios y músculo liso [16]. Las complejas redes de señalización intercelular entre las CMCs y los demás constituyentes del nicho modulan las vías de señalización intracelular de las primeras, de forma que promueven el crecimiento, el mantenimiento y la diferenciación de las CMCs.

Habitualmente, las células madre de tejidos normales se mantienen en microambientes que actúan como reservorios ante la pérdida celular causada por daños y envejecimiento, manteniendo constante el número de células madre. No obstante, durante la tumorigénesis, las mutaciones en las células madre normales y los fallos de los mecanismos de control del microambiente suponen eventos clave en la formación de las CMCs, pues ahora se encuentran en un microambiente que favorece su mantenimiento. Algunas de las innumerables funciones que el microambiente tumoral ejerce sobre el funcionamiento del cáncer incluyen el mantenimiento de las CMCs, la evasión de la respuesta inmune, la angiogénesis, la inestabilidad genómica y la secreción de factores de regulación, todas ellas funciones esenciales que hacen aún más complejo el tratamiento y entendimiento de la enfermedad.

### **Elementos del microambiente tumoral**

**Macrófagos asociados al tumor:** Los macrófagos presentan una alta plasticidad y pueden activarse a través de diferentes citoquinas de su microambiente. Algunas citoquinas, como IFN- $\gamma$  (interferón gamma), lipopolisacáridos bacterianos y TNF- $\alpha$ , inducen los llamados macrófagos activados clásicamente o macrófagos M1, que promueven la inflamación e inician la respuesta inmune, mientras que los macrófagos activados alternativamente o macrófagos M2, activados por IL-4, IL-10 e IL-13, tienen la función opuesta, promoviendo la inmunosupresión y la respuesta antiinflamatoria. Habitualmente, los TAMs presentan un fenotipo M2 (TAM-M2) y desempeñan acciones oncogénicas, facilitando la supervivencia, la proliferación y la diseminación de las células malignas, de forma que se relaciona un alto número de estas células con un mal pronóstico. Los TAMs desempeñan un papel indispensable en el nicho al secretar numerosas moléculas de señalización, entre las que se incluyen factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), TNF- $\alpha$ , IL-6 y TGF- $\beta$  [17]. Todos estos elementos median la proliferación, metástasis, angiogénesis, inmunosupresión y la EMT de varios tipos de cánceres, tal y como se puede observar en la siguiente imagen (Figura 4).

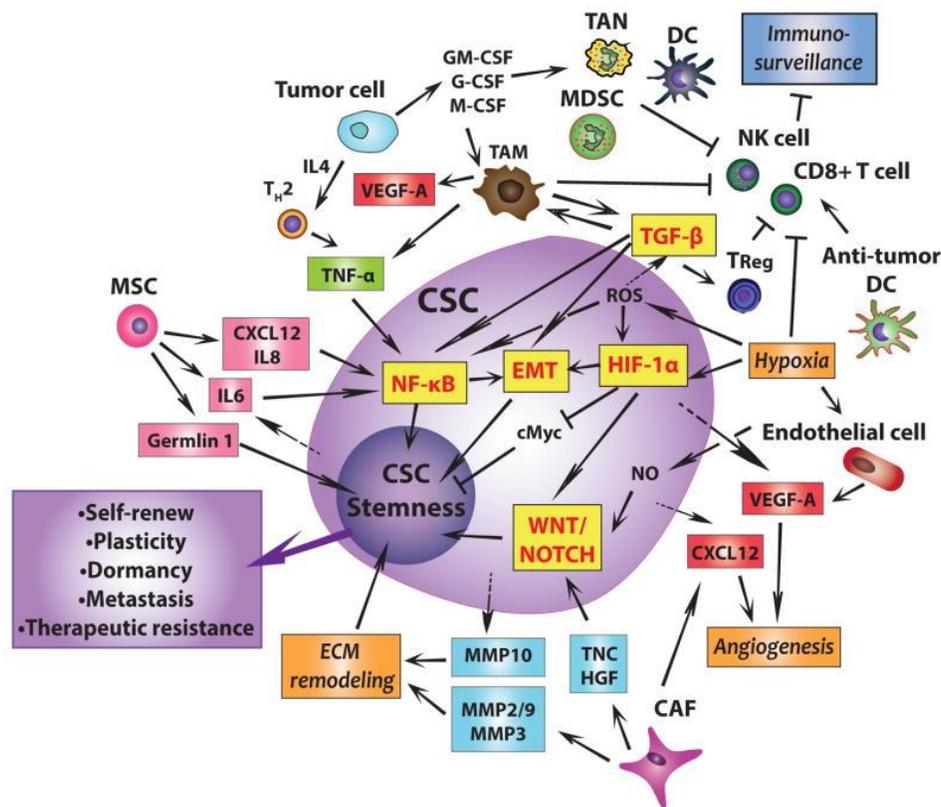


Figura 4. Bases moleculares y celulares de la interacción entre las CMCs y su nicho. Aparecen representadas las distintas funciones del microambiente tumoral sobre las CMCs [1].

Se ha demostrado que la IL-6 liberada por los TAMs promueve la “stemness” de las células del cáncer colorrectal y del carcinoma hepatocelular (HCC) [18]. Para comprobar el papel de esta interleucina, se examinó el efecto de IL-6 exógena sobre la expresión de Nanog, Sox2 y Oct4, tres TFs responsables de conferir “stemness”, y se observó que los niveles de las respectivas proteínas aumentaron en la línea celular de hepatocarcinoma MHCC-97H. Como se explicará más adelante, la IL-6 tiene este efecto dado que activa la ruta STAT3/Notch, que activa genes antiapoptóticos y genes promotores del ciclo celular [19].

**Fibroblastos asociados al cáncer (CAFs):** Se trata de una subpoblación de miofibroblastos perpetuamente activados que desempeñan un papel importante, no solo en el soporte mecánico, sino también en la progresión del cáncer mediante la remodelación de la ECM, la angiogénesis, el aumento de CMCs a través de la EMT, el reclutamiento de células inflamatorias y la proliferación de las células cancerosas. Para ello liberan diversos factores de crecimiento, citoquinas y componentes de la ECM al nicho, como IL-6, tenascina C (TNC), TGF-β y VEGF-A.

Junto al MMP10 producido por las CMCs, las metaloproteinasas MMP2, 3 y 9 secretadas por los CAFs facilitan la degradación y remodelación de la ECM, lo cual mejora la EMT y la plasticidad fenotípica entre células distintas a las CMCs y CMCs. Además, la quimiocina CXCL12, expresada en altos niveles en los CAFs, puede promover la angiogénesis e inducir la EMT de las células cancerosas en los cánceres gástricos y de próstata (Figura 4).

Sabemos que determinadas citoquinas activan ciertas vías de señalización embrionarias, como la vía Notch, Wnt/  $\beta$ -catenina y Hedgehog, las cuales contribuyen a la autorrenovación y proliferación de las CMCs en diversos tipos de cánceres. Se ha comprobado que el co-cultivo de células MHCC-97H con CAFs, las cuales expresan altos niveles de IL-6, aumentó particularmente la expresión de los componentes de la vía de señalización de Notch, como Notch1 y Hes1. Lo mismo se ha observado al tratar las células MHCC-97H con IL-6. Además, el anticuerpo neutralizante de IL-6 fue capaz de bloquear el efecto de los CAFs en la activación de la vía Notch en células MHCC-97H, lo cual pone de manifiesto que el papel de estos fibroblastos sobre la vía Notch se debe a la IL-6 que secretan, tal y como ocurre con los TAMs.

Para determinar el papel del receptor Notch1 en la progresión del HCC se obtuvo un *knockout* de su gen (shNOTCH1) en estas células. Las células *knockout* de Notch1 co-cultivadas con CAFs o IL-6 mostraron una disminución en la formación de esferoides y colonias, así como una menor capacidad migratoria en comparación con sus controles. Además, la eliminación de Notch1 anuló la inducción de los demás componentes de señalización de la vía Notch y de los genes asociados a la “*stemness*” (Nanog, Sox2 y Oct4) en dichas células. Por lo tanto, se concluyó que los CAFs inducen propiedades similares a las de las células madre en células del carcinoma hepatocelular a través de la vía de señalización Notch [20].

### **Interleucina 6**

La vía de señalización IL-6/ STAT3/ Notch favorece la “*stemness*” de las células tumorales tanto en el cáncer de mama, como en el adenocarcinoma gástrico y en el hepatocarcinoma, lo cual se debe a que IL-6 induce la vía Notch a través de la fosforilación de STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3). Con respecto al HCC, se observó un

aumento de los niveles del anticuerpo fosfo-STAT3 en células MHCC-97H tratadas con IL-6 o CAFs. La idea de que la fosforilación de STAT3 puede mediar la activación de la vía Notch en células de HCC se estudió tratando estas células con IL-6 en presencia o ausencia de criptotanshinona, un inhibidor de la fosforilación de STAT3. La criptotanshinona no solo redujo los niveles de fosfo-STAT3 sino también la expresión de los componentes asociados a la vía Notch. Además, de forma similar a lo que ocurre con el *knockout* shNOTCH1, la inhibición de la fosforilación de STAT3 disminuyó la formación de esferoides y colonias de estas células. Todos estos datos sugieren que la fosforilación de STAT3 puede mediar la señalización de IL-6 y Notch [20].

### **Tenascina C**

La tenascina C, una proteína presente en la ECM de los nichos de células madre y producida frecuentemente por CAFs, está asociada con la agresividad de la metástasis pulmonar del cáncer de mama. La TNC mejora la expresión de elementos involucrados en las vías de señalización de células madre, como Musashi-1 (MSI1) y el receptor LGR5. MSI1 es un regulador positivo de la vía Notch, mientras que LGR5 está participa en la vía Wnt, de forma que la TNC mejora estas dos vías, que mantienen a las CMCs (Figura 4).

Por otro lado, estudios más recientes sugieren que la vía de señalización TNC/ integrina  $\alpha 9\beta 1$  impide la formación de las fibras de estrés de actina, inhibiendo así la YAP (yes-associated protein), lo cual promueve una migración de tipo ameboidea de las células tumorales y facilita la metástasis. Además, se observa un aumento de la expresión de los genes que codifican para YAP en tumores derivados de células de osteosarcoma al hacer un *knockdown* de TNC. Estos tumores *knockdown* también causaron menos metástasis pulmonares, lo que sugiere que la tenascina C facilita la metástasis pulmonar. La vía de señalización comienza con la adhesión celular a la fibronectina a través del complejo integrina  $\alpha 5\beta 1$ / sindecán-4, momento en el que las células establecen las fibras de estrés de actina (Figura 5). MKL1 (megakaryoblastic leukemia 1) y YAP funcionan como dos sensores de la dinámica de la actina, de forma que en presencia de fibras de estrés de actina, ambas moléculas se trasladan al núcleo, donde actúan como factores de transcripción. La TNC, además de a través de la integrina  $\alpha 9\beta 1$ , puede impedir la formación de fibras de estrés al inhibir la señalización integrina  $\alpha 5\beta 1$ / sindecán-4 o bien impidiendo la

translocación nuclear de YAP. Todos estos resultados indican que la inhibición de YAP es un requisito previo para la migración tipo ameboidea inducida por TNC [21].

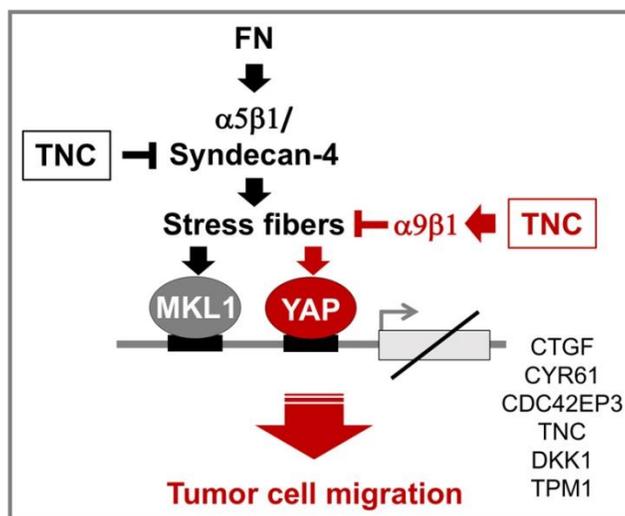


Figura 5. Esquema de los efectos de la TNC en la formación de las fibras de estrés de actina, la expresión génica y la migración de células tumorales [21].

### Factor de necrosis tumoral alfa

El TNF- $\alpha$  es una importante citoquina involucrada en la inflamación, la supervivencia celular, la apoptosis y la progresión tumoral. Es producido mayormente por macrófagos, como en el caso de los TAMs (Figura 4). Funciona como un mediador de la inflamación en el nicho, y recibe su nombre pues ejerce actividad antitumoral al promover la inflamación y la respuesta inmune, la apoptosis de células cancerosas y la destrucción de la vasculatura tumoral. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que el TNF- $\alpha$  desempeña un papel completamente inverso en la progresión tumoral y está involucrado en la migración tumoral, metástasis, angiogénesis, y la inmunosupresión. Este efecto aparentemente paradójico de TNF- $\alpha$  sobre el tumor refleja la diferencia entre la síntesis crónica y la administración local de dosis altas de esta citoquina. Una alta dosis de TNF- $\alpha$  indujo necrosis tumoral hemorrágica cuando se inyectó local y repetidamente. Por el contrario, en dosis bajas y suministrado de forma continuada, el TNF- $\alpha$  tiene actividad angiogénica y promueve la progresión tumoral. El mecanismo de estos efectos de doble filo no se ha dilucidado por completo, y dependen de la distribución de los receptores de TNF- $\alpha$ , el estadio del tumor y el tipo de tumor [17].

## Mecanismo de acción de TNF- $\alpha$

La unión de TNF- $\alpha$  a su receptor (TNFR1/ 2) produce un cambio conformacional sobre este último, de forma que, eventualmente, la proteína adaptadora TRADD se une por el “*death domain*” intracelular al receptor. Una vez ha ocurrido esto, el TNF puede comenzar a ejercer sus funciones mediante la activación de distintas vías de señalización, como la vía de NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y la vía de las quinasas del amino terminal de c-Jun (JNK).

NF- $\kappa$ B es un factor transcripcional que regula numerosos genes y por tanto distintas vías, principalmente involucradas en la inflamación y en la supervivencia celular. NF- $\kappa$ B controla una importante ruta antiapoptótica, por lo que defectos en esta ruta pueden provocar una mayor susceptibilidad a la apoptosis y llegar a aumentar la muerte celular. En las células tumorales, las proteínas que controlan la señalización de NF- $\kappa$ B se mutan o se expresan de forma aberrante, dando lugar a la activación constitutiva de este TF, además de que estas células secretan factores activadores de NF- $\kappa$ B, como TNF- $\alpha$ , de forma que se da una proliferación excesiva.

El receptor TNFR1 está involucrado en la señalización de vías que conducen a la apoptosis, lo cual le confiere su efecto antitumoral. Para la activación de estas vías primero ocurre la unión de TRADD a la proteína FADD, que ahora va a reclutar a la caspasa-8. Una alta concentración de caspasa-8 induce su activación autoproteolítica y la posterior escisión de las caspasas efectoras, como la caspasa-3, lo cual lleva a la apoptosis celular (Figura 6). No obstante, la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$  juega un papel mucho menos importante en comparación con su papel en el proceso inflamatorio. Por tanto, su capacidad de inducir la muerte es débil y, a menudo, enmascarada por los efectos antiapoptóticos de NF- $\kappa$ B.

La inflamación y supervivencia debida a TNF- $\alpha$  están mediadas por TRAF2 (factor 2 asociado a la superfamilia TNFR) a través de la cascada de quinasa dependiente de JNK, la cascada MEKK (MAP quinasa quinasa quinasa) y la vía de NF- $\kappa$ B [22].

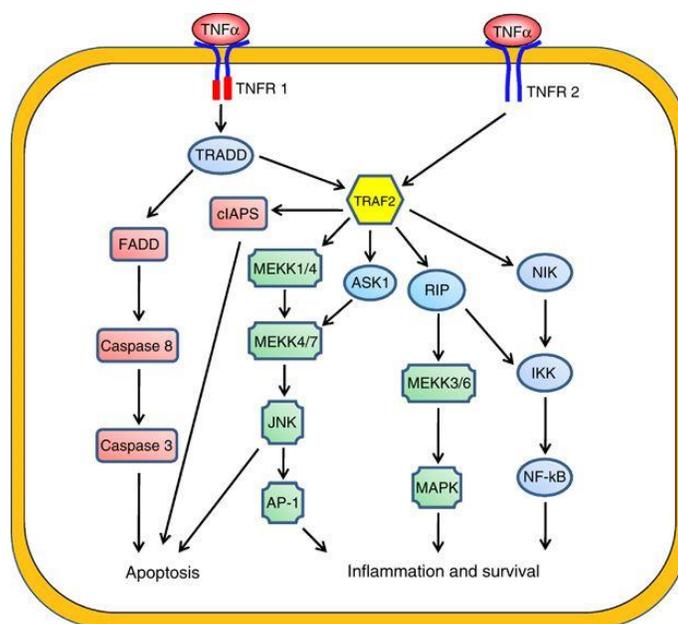


Figura 6. El TNF- $\alpha$  puede activar diferentes vías para inducir la apoptosis, la supervivencia celular o la inflamación [22].

**Células madre mesenquimales (MSCs):** Las MSCs son células multipotentes presentes en todos los tejidos, donde representan un componente clave caracterizado por su capacidad de diferenciarse en varios tipos de células mesodérmicas. Además, estas células mantienen la homeostasis del tejido donde están presentes, regulando la producción de los componentes de la ECM. Se conoce la implicación de las MSCs en múltiples mecanismos que promueven la progresión del tumor. Además, existe evidencia experimental de que las células tumorales pueden influir sobre las MSCs para modificar los componentes de la ECM, lo que permite la adaptación de las células tumorales al microambiente circundante y, finalmente, a la metástasis.

Al secretar CXCL12, IL-6 e IL-8, las MSCs promueven la “stemness” de las células cancerosas a través de la regulación positiva de NF- $\kappa$ B, a la vez que las CMCs secretan IL-6 para atraer más MSCs (Figura 4). La proliferación de células madre está impulsada por niveles altos de Wnt y bajos de BMP (bone morphogenetic protein), mientras que la diferenciación de las células hijas y la apoptosis están determinadas por un balance  $Wnt^{bajo}/BMP^{alto}$ . Estos gradientes se mantienen por la secreción paracrina por parte de las MSCs de antagonistas de BMP, como Gremlin1, que previene la actividad de BMP dentro del nicho, promoviendo la “stemness” de las células madre intestinales [23].

## Factor de crecimiento transformante beta

Las MSCs, TAMs, CAFs y otros leucocitos producen TGF- $\beta$ , cuya vía de señalización es un paradigma de dualidad en el cáncer. La vía del TGF- $\beta$  juega un papel clave en la pluripotencia, proliferación y diferenciación de las células del organismo. Los efectos del TGF- $\beta$  dependen la naturaleza contextual y del estadio en el que se encuentra el tumor. Así pues, el TGF- $\beta$  del microambiente tumoral puede causar la supresión tumoral al inducir la apoptosis de las células cancerosas en estadios tempranos, o inducir una EMT que promueve la invasión y metástasis de las células cancerosas al potenciar su “*stemness*”, como ocurre durante el estado de carcinogénesis avanzada.

Por lo general, tanto en células sanas como en aquellas tumorales tempranas, el TGF- $\beta$  inhibe la división celular al detener el ciclo celular en la fase G1, lo cual consigue aumentando la expresión de p15 y p21, inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina, con la subsiguiente supresión de c-Myc, un protooncogén que inhibe la “*stemness*” implicado en numerosos cánceres humanos. Además, el TGF- $\beta$  muestra un potente efecto inhibidor del crecimiento en la etapa temprana del cáncer al promover la apoptosis y potenciar la actividad anti-angiogénica. La progresión tumoral se produce cuando las células cancerosas consiguen evadir los efectos inhibitorios de TGF- $\beta$  y en su lugar comienzan a sobreexpresar esta citoquina para iniciar la evasión inmune, la producción de factores de crecimiento y la diseminación metastásica, tal y como se observa clínicamente en muchos tumores, incluyendo el cáncer de mama, colon, esófago, estómago, hígado, pulmón, páncreas, próstata y cerebro [24].

Sin embargo, recientemente se ha descubierto un efecto de TGF- $\beta$  que hace de su papel en el cáncer algo aún más paradójico. En diversos cánceres gastrointestinales, como el adenocarcinoma ductal pancreático (PDA), es frecuente la inactivación de la proteína Smad4, esencial en la vía del TGF- $\beta$  y necesaria para la EMT. Como hemos explicado, en etapas avanzadas del cáncer el TGF- $\beta$  es un importante inductor de los TFs involucrados en la EMT pro-tumorígenica, como Snail, Slug, Twist, y Zeb1. Sin embargo, se ha demostrado que en células PDA Smad4<sup>+</sup> el TGF- $\beta$  impulsa la supresión tumoral al remodelar la red de factores de transcripción asociados a la EMT, consiguiendo que el Sox4 inducido por TGF- $\beta$  pase de ser de un potenciador de la tumorigénesis en el estado epitelial a un promotor de

la apoptosis después de la EMT, que pasaría a considerarse una EMT letal (Figura 7). En ausencia de Smad4 el TF Klf5 coopera con Sox4 para evitar la apoptosis inducida por este último y favorecer la tumorigénesis. Sin embargo, en células Smad4<sup>+</sup> aumenta la expresión de Snail, que coopera con Smad4 para provocar la represión de Klf5, de forma que desaparece la pareja Klf5-Sox4, esencial para la oncogénesis, y Sox4 ejerce su función apoptótica. Por tanto, la represión de Klf5 cambia la actividad de Sox4 de pro-tumorigénico a pro-apoptótico [25].

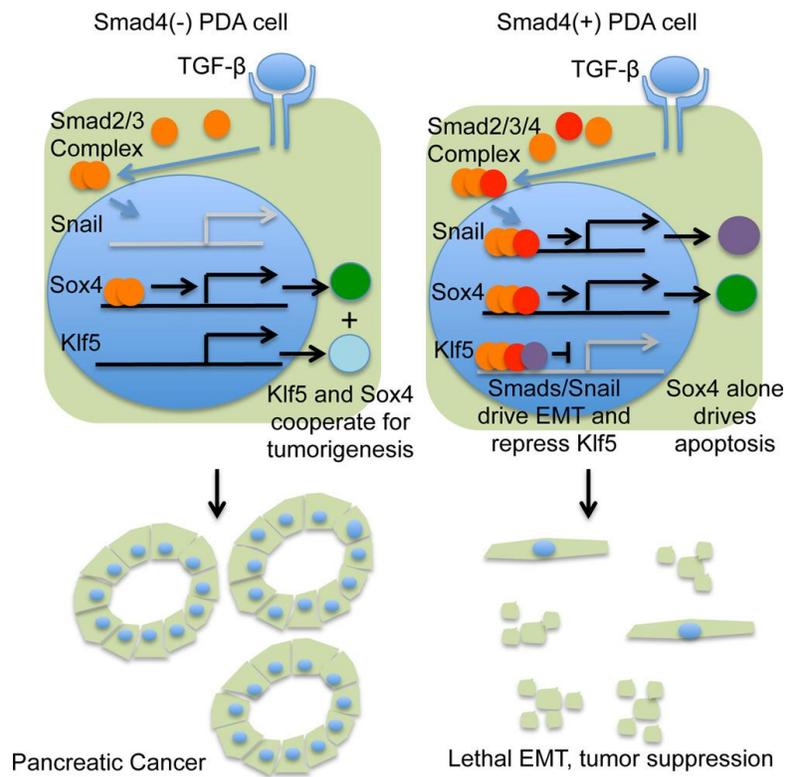


Figura 7. Diferentes efectos de TGF-β sobre células PDA Smad4<sup>-</sup> y Smad4<sup>+</sup> [25].

### Hipoxia en el nicho

La mayoría de tumores sólidos tienen regiones sometidas a hipoxia de forma permanente o transitoria debido a una vascularización caótica e incompleta, de modo que el suministro de nutrientes y oxígeno está restringido. En consecuencia, las células tumorales normalmente siguen una glucólisis anaerobia, dando lugar a una mayor producción de ácido láctico y un menor pH tisular. La acidez tumoral dota a las células cancerosas de una serie de ventajas para su avance y metástasis, tales como la reorganización de la ECM, la activación de

proteasas y la estimulación de la angiogénesis y linfoangiogénesis. Además, un nicho ácido puede promover la EMT, ya que esta acidez propicia la expresión de genes implicados en este proceso y dota a las células de una forma más esbelta.

La hipoxia induce la expresión por parte de las CMCs de los factores inducibles por hipoxia (HIFs), que están regulados por la vía TGF- $\beta$ . Los genes HIF son los principales factores que conducen la angiogénesis a través de la inducción de VEGF-A, de forma que tanto las células endoteliales como las CMCs producen VEGF-A para estimular la neovascularización tumoral en condiciones de hipoxia. Al mismo tiempo, CMCs y CAFs producen CXCL12 para promover la angiogénesis, y los TAMs se vuelven proangiogénicos a través de su respuesta al M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), secretado por células tumorales, que induce la producción de VEGF-A y suprime la expresión de factores anti-angiogénicos.

Por otro lado, a medida que disminuye la concentración de oxígeno aumenta la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), que ya de por sí son abundantes en el microambiente tumoral debido a la alta actividad metabólica, la disfuncionalidad mitocondrial y la elevada actividad de enzimas como las oxidasas y ciclooxigenasas. Las ROS estimulan la supervivencia celular e inducen la EMT a través de la vía de señalización del TGF- $\beta$ . Además, se ha demostrado que las mitocondrias aumentan su producción de ROS para regular la activación de los HIFs, que promueven directamente la EMT [26]. La hipoxia también inhibe la proliferación celular al regular a la baja la expresión de c-Myc, a la vez que promueve un estado indiferenciado a través de las vías de señalización de TGF- $\beta$  y Wnt, todo ello favoreciendo la “*stemness*”.

Las citoquinas secretadas como consecuencia del entorno hipóxico reclutan TAMs y linfocitos T reguladores, los cuales, bajo regulación de los HIFs, van a suprimir la actividad inmune al inhibir la citotoxicidad de las linfocitos T CD8 + y de las células NK, y la fagocitosis de los macrófagos. Como vemos, la hipoxia conduce a una desregulación del microambiente tumoral de una manera que favorece el crecimiento del cáncer; la remodelación de la ECM favorece la metástasis, el proceso de vascularización facilita la progresión del cáncer y la función inmunitaria antitumoral se reprime en general, además de que contribuye a la resistencia a la terapia al inducir la inactividad celular [27].

## MODELOS CELULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER

El cuerpo humano es un sistema tridimensional, a pesar de lo cual la mayoría de investigaciones trabajan con cultivos en monocapa, es decir, bidimensionales. Este tipo de modelos no refleja con precisión las uniones celulares, la estructura del citoesqueleto ni el comportamiento *in vivo* de las células. Tal y como se explicó en el apartado de antecedentes, el desarrollo de distintos tipos de sistemas de cultivo 3D *in vitro* es una mejor opción para reproducir las condiciones de crecimiento *in vivo* del cáncer, y, por tanto, para el estudio de la enfermedad y la respuesta a los medicamentos.

Los resultados de los modelos experimentales así como de los estudios clínicos ponen de manifiesto que las CMCs sobreviven a la mayoría de terapias contra el cáncer comúnmente empleadas. Por este motivo, se necesitan tratamientos tradicionales, que atacan a las células del grueso tumoral, como la quimioterapia y la radioterapia, y además, terapias que tengan como diana las CMCs, acabando entonces con absolutamente todas las células el tumor. La investigación con esferoides puede proporcionar información muy valiosa para combatir el cáncer. A continuación estudiaremos las características y aplicaciones de los distintos métodos de cultivo tridimensionales del cáncer, haciendo especial hincapié en los que se construyen sobre CMCs, llamados tumoresferas [28].

**Esferoides tumorales multicelulares (MCTS):** Se forman a partir de líneas celulares tumorales en condiciones no adherentes y medios convencionales similares a los usados en los cultivos 2D. A pesar de que los MCTS muestran poca semejanza histológica con el cáncer original, estos modelos imitan bien los gradientes metabólicos y proliferativos de los tumores *in vivo* y muestran una quimiorresistencia clínicamente relevante. Además, las ventajas de MCTS sobre otros sistemas 3D incluyen la clonalidad de las células, la facilidad de mantenimiento, y la simplicidad de su manipulación genética, que hacen de este método una herramienta adecuada para las pruebas de distintos fármacos.

**Esferoides derivados de tumores (Tumoresferas):** Las tumoresferas son esferoides flotantes de CMCs diseñados para el estudio *in vitro* de estas células, y pueden originarse a partir de líneas celulares inmortales o de muestras derivadas de los pacientes.

Para conseguir un reservorio de CMCs las células se cultivan en un medio sin suero y se complementan con diversos factores, como FGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), hidrocortisona, insulina, progesterona y heparina. A diferencia de otros modelos de esferoides que intentan reproducir fielmente los tejidos cancerosos, incluyendo las células madre y sus progenies diferenciadas, las tumoresferas no buscan replicar completamente la estructura espacial ni el entorno del tumor, sino más bien estudiar las propiedades de las CMCs. No obstante, las tumoresferas no son estructuras homogéneas enriquecidas con células indiferenciadas, sino que comprenden un rango de entidades morfológicamente distintas que muestran heterogeneidad molecular inter e intraesférica, como la expresión diferencial de marcadores de diferenciación. Existen varias técnicas para la preparación de los esferoides flotantes, como el método de las gotas colgantes, la flotación forzada y métodos basados en la agitación, todos estos representados en la [Figura 8](#).

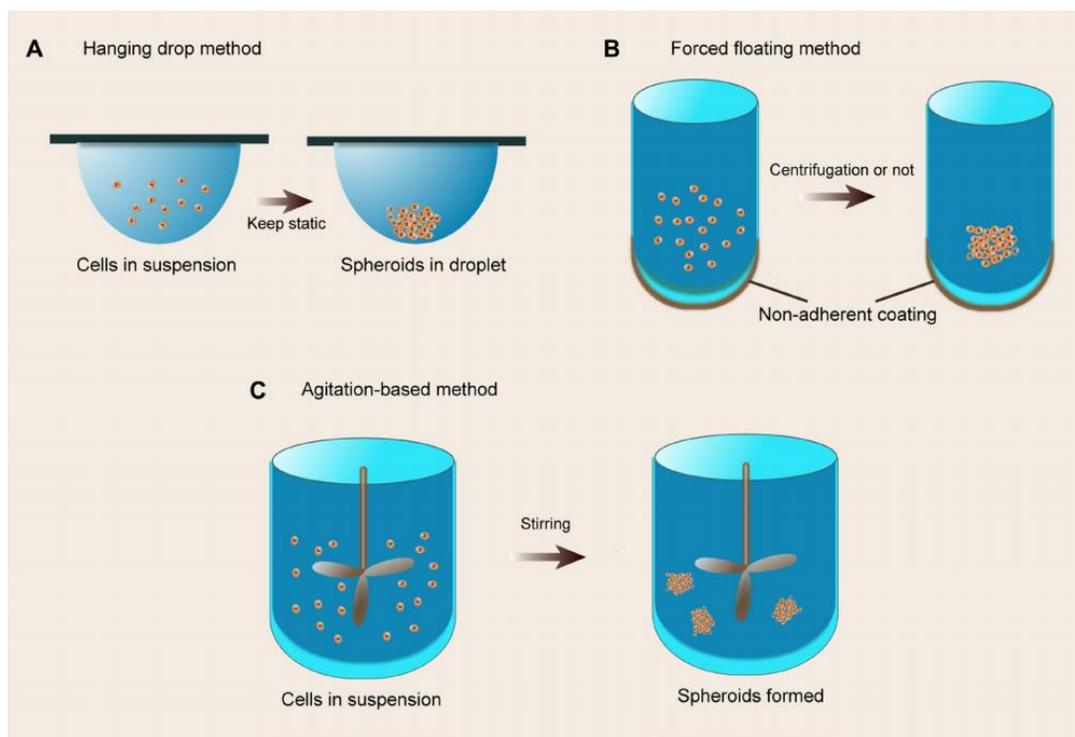


Figura 8. Métodos para la formación de esferoides flotantes [6].

En general, los esferoides en suspensión son simulaciones simplificadas e inicialmente solo involucran interacciones célula-célula, sin interacciones célula-matriz. Sin embargo, estos esferoides pueden integrarse junto a otros sistemas de cultivo. Por ejemplo, los esferoides

flotantes pueden embeberse en una matriz de hidrogeles para constituir modelos celulares más complejos. En el caso de las tumoresferas, dada la falta de interacciones heterogéneas célula-célula y célula-matriz, se generan co-cultivos de esferoides para estudiar la interacción entre las señales microambientales y las CMCs, de forma que las CMCs se cultivan en el interior de un esferoide en cuya periferia aparecen células capaces de mantener su “stemness”. Además, aunque las tumoresferas se caracterizan por la ausencia de ECM y células distintas a las CMCs, se ha informado que las células cancerosas en sí pueden producir componentes de la ECM, como la tenascina C, para crear parcialmente su nicho. Por otro lado, se está estudiando el potencial uso de las tumoresferas para cultivar CMCs de otros tipos de muestras clínicas, como focos metastásicos o fluidos corporales, tales como el líquido ascítico, el líquido pleural y la sangre [29].

**Esferoides derivados del tejido tumoral (TDTS):** Están formados exclusivamente por células tumorales y se obtienen a partir de la disociación mecánica y enzimática de muestras de tejido tumoral. Tras la disociación, los fragmentos tumorales sufren una filtración a través de filtros celulares y, finalmente, se trasplantan las células a superficies de cultivo no adherentes. Los TDTS mantienen en gran medida las características histológicas de los tumores originales en ausencia de células no tumorales y son capaces de propagarse después de la disociación mecánica. Por este motivo, desde una perspectiva de tratamiento personalizado, el estudio de la respuesta de los TDTS podría predecir la respuesta tumoral individual de cada paciente a la quimioterapia, aún más cuando la sensibilidad a la quimioterapia y la radioterapia de los TDTS es similar a la eficacia terapéutica *in vivo* en varios tipos de cánceres. Por lo tanto, estos esferoides se pueden aplicar para el estudio de la sensibilidad individual a la terapia del cáncer y pueden facilitar aún más nuestra comprensión de los mecanismos de resistencia.

**Esferoides multicelulares organotípicos (OMS):** Estos modelos también se generan a partir de muestras de tejido tumoral que han sufrido una suave disociación mecánica y se cultivan en condiciones no adherentes. Histológicamente se parecen a un tumor *in vivo*, ya que están destinados a reproducir fielmente el microambiente tumoral, por eso se les considera “organoides”, que hace referencia a “órganos” simplificados en miniatura que crecen *in vitro*. A diferencia de los TDTS, las células cancerosas cultivadas

por este método están rodeadas por células no tumorales y componentes del estroma que normalmente existen en el microambiente del tumor. Como resultado, las células cultivadas bajo este modelo conservan la histología y la heterogeneidad celular del cáncer original más que cualquier otro modelo. No obstante, dada la gran heterogeneidad entre los OMS de un mismo tumor, resulta difícil la estandarización de protocolos para el estudio de fármacos sobre estos modelos.

### **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Los rápidos avances tecnológicos en la investigación de las células madre son prometedores para el futuro. Los agentes terapéuticos contra estas células se encuentran bajo una investigación intensiva y algunos de ellos han ingresado ya a la fase temprana de los ensayos clínicos. Estos medicamentos se dirigen a los diferentes mecanismos que mantienen la “*stemness*” de las CMCs a la vez que les confieren resistencia. Existe un amplio abanico de terapias que explotar, como aquellas que tienen como diana los marcadores de la superficie celular de las CMCs o las vías de señalización de estas células, terapias basadas en micro-ARNs, la inmunoterapia, fármacos dirigidos a otros componentes del microambiente tumoral, y otros dirigidos al metabolismo de las CMCs [30].

No obstante, aún es necesario conseguir modelos de cultivo de CMCs que recreen mejor la heterogeneidad de los tejidos tumorales. Para lograr esto se deben considerar varios aspectos esenciales, como la introducción de una perfusión dinámica que emule el flujo sanguíneo, dejando atrás los modelos 3D convencionales que simulan un microambiente avascular, la implementación de dispositivos de microescala que permiten el cultivo a largo plazo, los flujos intersticiales controlables y la colocación definida de las células, y la ingeniería de tejidos basada en andamios de tipo matriz, muy útil para la fabricación de tejidos tumorales sofisticados *in vitro*.

Por otro lado, la heterogeneidad de las CMCs representa una gran oportunidad en el área de la medicina personalizada, de forma que el desarrollo de nuevos ensayos para predecir la respuesta del tumor *in vivo* a la terapia será útil para escoger el tratamiento más adecuado para cada individuo, aumentando las posibilidades de eliminar la enfermedad con éxito.

## CONCLUSIONES

1. Aunque no hayan sido identificadas en todos los tumores, la existencia de células tumorales con características típicas de células madre de tejidos normales ya no es cuestionable, se las llame CMCs, células tumorigénicas, células iniciadoras del tumor o células con propiedades similares a las células madre.
2. La plasticidad de las células tumorales da cabida a una nueva forma de explicar la heterogeneidad intratumoral, el modelo unificado del cáncer.
3. El papel del nicho sobre la invasión y la progresión tumoral se debe a la angiogénesis, la inmunosupresión y la EMT que el conjunto de sus elementos median, con especial relevancia la IL-6, el factor pro-angiogénico VEGF-A, la TNC, el TNF- $\alpha$  y el TGF- $\beta$ .
4. La vía de señalización IL-6/ STAT3/ Notch, especialmente relevante en CAFs y TAMs, favorece la “*stemness*” de las células tumorales.
5. Nuestro conocimiento acerca de la naturaleza de las CMCs de tumores sólidos se ha ampliado considerablemente en la última década, en parte a través de la investigación *in vitro* de las tumoresferas, que además evita los procedimientos clínicos altamente invasivos.
6. El refinamiento de los protocolos de cultivo puede permitir el uso de las tumoresferas como herramienta para la identificación de moléculas que inhiben la proliferación de CMCs y para estudiar el efecto de fármacos a nivel individual, esto último con mayor relevancia aún en los TDTS.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Plaks, V., Kong, N., & Werb, Z. (2015). The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell stem cell*, 16(3), 225–238. doi:10.1016/j.stem.2015.02.015
2. Islam, F., Qiao, B., Smith, R. A., Gopalan, V. & Lam, A. K. (2015). Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. *Experimental and Molecular Pathology*, 98(2), 184-191. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.02.002
3. Ayob, A. Z., & Ramasamy, T. S. (2018). Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *Journal of biomedical science*, 25(1), 20. doi:10.1186/s12929-018-0426-4
4. Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3:730–37.
5. Chen, Y., Tan, W., & Wang, C. (2018). Tumor-associated macrophage-derived cytokines enhance cancer stem-like characteristics through epithelial-mesenchymal transition. *Oncotargets and therapy*, 11, 3817–3826. doi:10.2147/OTT.S168317
6. He, J., Xiong, L., Li, Q., Lin, L., Miao, X., Yan, S., ... Deng, X. (2017). 3D modeling of cancer stem cell niche. *Oncotarget*, 9(1), 1326–1345. doi:10.18632/oncotarget.19847
7. Toledo-Guzmán, M. E., Bigoni-Ordóñez, G. D., Ibáñez Hernández, M., & Ortiz-Sánchez, E. (2018). Cancer stem cell impact on clinical oncology. *World journal of stem cells*, 10(12), 183–195. doi:10.4252/wjsc.v10.i12.183
8. Zhu, P., & Fan, Z. (2018). Cancer stem cells and tumorigenesis. *Biophysics reports*, 4(4), 178–188. doi:10.1007/s41048-018-0062-2

9. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). Asymmetrical division of stem cells resulting in one daughter stem cell and a committed transit amplifying cell. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science: New York; 1600.
10. Najafi, M., Farhood., B & Mortezaee, K. (2019). Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *J Cell Physiol*, 234, 8381–8395. doi: 10.1002/jcp.27740
11. Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663–676.
12. Tong, M., Deng, Z., Yang, M., Xu, C., Zhang, X., Zhang, Q., ... Liu, Q. (2018). Transcriptomic but not genomic variability confers phenotype of breast cancer stem cells. *Cancer communications*, 38(1), 56. doi:10.1186/s40880-018-0326-8
13. Zhou, P., Li, B., Liu, F., Zhang, M., Wang, Q., Liu, Y., ... Li, D. (2017). The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer. *Molecular cancer*, 16(1), 52. doi:10.1186/s12943-017-0624-9
14. Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., ... Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704–715. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027
15. Zhou, C., Jiang, H., Zhang, Z., Zhang, G., Wang, H., Zhang, Q., ... Yang, S. (2017). ZEB1 confers stem cell-like properties in breast cancer by targeting neurogenin-3. *Oncotarget*, 8(33), 54388–54401. doi:10.18632/oncotarget.17077
16. Prager, B. C., Xie, Q., Bao, S., & Rich, J. N. (2019). Cancer Stem Cells: The Architects of the Tumor Ecosystem Prager. *Cell Stem Cell*, 24(1), 41-53. doi: 10.1016/j.stem.2018.12.009.

17. Chen, Y., Tan, W., & Wang, C. (2018). Tumor-associated macrophage-derived cytokines enhance cancer stem-like characteristics through epithelial-mesenchymal transition. *OncoTargets and therapy*, 11, 3817–3826. doi:10.2147/OTT.S168317
18. Chen, L., Wang, S., Wang, Y., Zhang, W., Ma, K., Hu, C., ... Xu, N. (2018). IL-6 influences the polarization of macrophages and the formation and growth of colorectal tumor. *Oncotarget*, 9(25), 17443–17454. doi:10.18632/oncotarget.24734
19. Wan, S., Zhao, E., Kryczek, I., Vatan, L., Sadovskaya, A., Ludema, G., ... Welling, T. H. (2014). Tumor-associated macrophages produce interleukin 6 and signal via STAT3 to promote expansion of human hepatocellular carcinoma stem cells. *Gastroenterology*, 147(6), 1393–1404. doi:10.1053/j.gastro.2014.08.039
20. Xiong, S., Wang, R., Chen, Q., Luo, J., Wang, J., Zhao, Z., ... Cheng, B. (2018). Cancer-associated fibroblasts promote stem cell-like properties of hepatocellular carcinoma cells through IL-6/STAT3/Notch signaling. *American journal of cancer research*, 8(2), 302–316.
21. Sun, Z., Schwenzer, A., Rupp, T., Murdamoothoo, D., Vegliante, R., Lefebvre, O., ... Orend, G. (2018). Tenascin-C Promotes Tumor Cell Migration and Metastasis through Integrin  $\alpha 9\beta 1$ -Mediated YAP Inhibition. *Cancer research*, 78(4), 950–961. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1597
22. Wu, Y., & Zhou, B. P. (2010). TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *British journal of cancer*, 102(4), 639–644. doi:10.1038/sj.bjc.6605530
23. Poggi, A., Varesano, S., & Zocchi, M. R. (2018). How to Hit Mesenchymal Stromal Cells and Make the Tumor Microenvironment Immunostimulant Rather Than Immunosuppressive. *Frontiers in immunology*, 9, 262. doi:10.3389/fimmu.2018.00262

24. Bellomo, C., Caja, L., & Moustakas, A. (2016). Transforming growth factor  $\beta$  as regulator of cancer stemness and metastasis. *British journal of cancer*, 115(7), 761–769. doi:10.1038/bjc.2016.255
25. David, C. J., Huang, Y. H., Chen, M., Su, J., Zou, Y., Bardeesy, N., ... Massagué, J. (2016). TGF- $\beta$  Tumor Suppression through a Lethal EMT. *Cell*, 164(5), 1015–1030. doi:10.1016/j.cell.2016.01.009
26. Triner, D., & Shah, Y. M. (2016). Hypoxia-inducible factors: a central link between inflammation and cancer. *The Journal of clinical investigation*, 126(10), 3689–3698. doi:10.1172/JCI84430
27. Petrova, V., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G., & Amelio, I. (2018). The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis*, 7(1), 10. doi:10.1038/s41389-017-0011-9
28. Ishiguro, T., Ohata, H., Sato, A., Yamawaki, K., Enomoto, T., & Okamoto, K. (2017). Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer science*, 108(3), 283–289. doi:10.1111/cas.13155
29. Tellez-Gabriel, M., Cochonneau, D., Cadé, M., Jubellin, C., Heymann, M. F., & Heymann, D. (2018). Circulating Tumor Cell-Derived Pre-Clinical Models for Personalized Medicine. *Cancers*, 11(1), 19. doi:10.3390/cancers11010019
30. Shukla, G., Khera, H. K., Srivastava, A. K., Khare, P., Patidar, R., & Saxena, R. (2017). Therapeutic Potential, Challenges and Future Perspective of Cancer Stem Cells in Translational Oncology: A Critical Review. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 12(3), 207-224. doi: 10.2174/1574888X11666161028143224.