

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



**ESTUDIO DE NAMPT
COMO MARCADOR TUMORAL Y SU
IMPLICACIÓN EN TUMORIGÉNESIS EN
CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO**

Lola Eufemia Navas
Graduada en Farmacia
Tesis doctoral

Director: Amancio Carnero
Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)

2021

Dr. Amancio Carnero Moya y Dra. María José Peral Rubio,

CERTIFICAN:

Que el trabajo experimental presentado en esta memoria para optar al título de Doctora en Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica por la Universidad de Sevilla titulado **“ESTUDIO DE NAMPT COMO MARCADOR TUMORAL Y SU IMPLICACIÓN EN TUMORIGÉNESIS EN CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO”** ha sido realizado por Lola Eufemia Navas Maldonado en el grupo de Biología Molecular del Cáncer del área de Oncohematología y Genética del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) bajo la dirección del Dr. Amancio Carnero Moya y la tutela académica de la Dra. María José Peral Rubio.

El trabajo ha sido financiado con una beca de Formación de Personal Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Ref: FPU16/02920)

Sevilla, Diciembre de 2021

La doctoranda,

El director,

La tutora académica,



Lola Eufemia Navas



Dr. Amancio Carnero Moya



Dra. Mª José Peral Rubio

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	IX
SUMMARY	XI
INTRODUCCIÓN	1
1. Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD ⁺).....	3
1.1. Funciones Redox de NAD ⁺	4
1.2. Funciones no-redox: NAD ⁺ como sustrato.....	5
1.3. NAD ⁺ en el metabolismo del cáncer.....	6
1.4. Biosíntesis de NAD ⁺	7
1.4.1. Ruta <i>De novo</i> (<i>De novo pathway</i>).....	8
1.4.2. Ruta <i>Preiss-Handler</i> (<i>The Preiss-Handler pathway</i>)	8
1.4.3. Ruta de rescate (<i>The salvage pathway</i>).....	8
1.4.4. Ruta de nucleósido (<i>The Nucleoside Pathway</i>)	9
2. Nicotinamida Fosforribosiltransferasa (NAMPT)	10
2.1. NAMPT en cáncer.....	12
2.2. Otras enzimas NAD ⁺ -dependientes en cáncer	12
2.2.1. SIRT ₁ en cáncer.....	12
2.2.2. PARPs en cáncer.....	13
2.2.3. cADPRs en cáncer	14
2.2.4. NAMPT en cáncer	14
2.3. NAMPT como estrategia terapéutica.....	15
3. Células Madre del Cáncer (CSCs).....	18
4. Cáncer de Cabeza y Cuello (CCyC).....	19
4.1 Tratamiento y CSCs en CCyC.....	21
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y METODOS	29
1. Técnicas de Biología Molecular.....	31
1.1. Reactivos biológicos utilizados.....	31
1.1.1. Plásmidos y cebadores	31
1.1.2. Antibióticos	32
1.1.3. Cepas bacterianas.....	32
1.2. Transformación de células quimiocompetentes	32
1.3. Extracción de ADN plasmídico	32
1.4. Extracción de ADN genómico.....	32

1.5.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	33
1.6.	Purificación del ADN a partir de un gel de agarosa o producto de PCR.....	33
1.7.	Secuenciación.....	33
1.8.	Clonación de plásmidos.....	33
1.8.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del plásmido donador.....	33
1.8.2.	Clonación TA.....	34
1.8.3.	Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	34
1.8.4.	Ligación.....	35
2.	Cultivos Celulares.....	35
2.1.	Líneas celulares.....	35
2.2.	Cultivo y conservación de las líneas celulares.....	35
2.3.	Transfección de células.....	35
2.3.1.	Transfección mediante el kit comercial TransIt-X2 (Mirus).....	35
2.3.2.	Transfección con polietilenimina (PEI).....	36
2.3.3.	Selección de células transfectadas.....	36
2.4.	Técnica CRISPR-Cas9.....	36
2.4.1.	Infección lentiviral.....	36
2.4.2.	Generación y selección de los clones de CRISPRs.....	37
2.4.3.	Secuenciación de los clones de CRISPRs.....	37
3.	Ensayos Celulares.....	38
3.1.	Ensayos de metabolismo.....	38
3.1.1.	Precusores e inhibidores de NAD ⁺	38
3.1.2.	Ensayo de ciclación de NAD ⁺	38
3.1.3.	Ensayos en condiciones limitantes de nutrientes.....	39
3.2.	Ensayos funcionales de tumorigénesis.....	39
3.2.1.	Ensayo de proliferación.....	39
3.2.2.	Ensayo de clonabilidad.....	39
3.2.3.	Análisis y clasificación de los tipos de clones.....	39
3.2.4.	Ensayo de formación de tumoresferas.....	40
3.2.5.	Ensayo de formación de tumoresferas a partir de una célula aislada.....	40
3.2.6.	Ensayo de migración de la Cámara de Boyden.....	40
3.2.7.	Ensayo de citotoxicidad.....	41
3.2.8.	Ensayo de competición.....	41
3.3.	Análisis de marcadores por citometría de flujo.....	41
3.3.1.	Anticuerpos de citometría.....	42
3.3.2.	Citometría de flujo (FACS).....	42
3.3.3.	Separación celular (<i>Sorting</i>).....	42
4.	Ensayos <i>in vivo</i>	43
4.1	Generación de xenotransplantes.....	43

4.1.1	Generación de xenotransplantes a partir de células tumorales.....	43
4.1.2	Generación de xenotransplantes a partir de tumoresferas	43
4.1.3	Generación de xenotransplantes a partir de células sorteadas por citometría	43
4.2	Tratamientos con inhibidores tumorales	44
4.3	Necropsias	44
5.	Técnicas de análisis de expresión a nivel de ARN	44
5.1.	Extracción de ARN total	44
5.2.	Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	45
5.3.	PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	45
5.4.	PCR "array"	46
6.	Técnicas de análisis de expresión a nivel de proteínas	47
6.1.	Anticuerpos para proteínas	47
6.2.	Extracción de proteínas total	47
6.3.	<i>Western-blot</i>	48
6.4.	Cuantificación de bandas de <i>Western-blot</i>	48
7.	Secuenciación NGS	48
8.	Análisis de bases de datos	48
9.	Análisis estadístico	49
	RESULTADOS.....	51
1.	Estudio de las propiedades de célula madre de las subpoblaciones CSC en CCyC	53
1.1.	Marcador CD10.....	53
1.2.	Marcador CD184	55
1.3.	Marcador CD133	57
1.4.	Marcador CD19.....	59
1.5.	Marcador CD166	60
1.6.	Plasticidad celular entre los distintos marcadores.....	61
1.7.	NAMPT, un nuevo marcador	63
2.	Estudio del papel funcional de NAMPT en líneas celulares de CCyC	66
2.1.	Efecto de reducción de los niveles de NAMPT en líneas celulares de CCyC.....	66
2.2.	Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en el fenotipo de célula madre en líneas celulares de CCyC.....	70
2.3.	Efecto de los niveles de NAMPT en la migración celular en líneas celulares de CCyC	78
2.4.	Efecto de la sobreexpresión de las variantes de NAMPT en CCyC	80
3.	NAMPT como diana terapéutica en CCyC.....	85
4.	Estudio del papel de NAMPT en la biosíntesis y metabolismo de NAD ⁺ en CCyC	89
	DISCUSIÓN.....	99
	CONCLUSIONES.....	115
	CONCLUSIONS.....	119
	BIBLIOGRAFÍA.....	123

ANEXO: CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS DURANTE LA ETAPA DE DOCTORADO..... 137**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Estructura de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD ⁺)	3
Figura 2. NAD ⁺ en el metabolismo del cáncer	7
Figura 3. Biosíntesis de NAD ⁺	9
Figura 4. Estructura del gen y la proteína NAMPT	11
Figura 5. Biología molecular del Cáncer de Cabeza y Cuello	20
Figura 6. Propiedades de célula madre tumorales de la subpoblación CD10 en CCyC.	54
Figura 7. Propiedades de célula madre tumorales de la subpoblación CD184 en CCyC.	56
Figura 8. Propiedades de célula madre tumorales de la subpoblación CD133 en CCyC.	58
Figura 9. Propiedades de célula madre tumorales de la subpoblación CD19 en CCyC.	59
Figura 10. Propiedades de célula madre tumorales de la subpoblación CD166 en CCyC.	61
Figura 11. Plasticidad celular de las subpoblaciones CSC en CCyC.....	62
Figura 12. Análisis transcriptómico de genes comunes a CD10, CD184 y CD19.....	63
Figura 13. NAMPT, un marcador común de célula madre tumoral en CCyC.....	64
Figura 14. Supervivencia global de pacientes con CCyC de la base de datos TCGA.....	65
Figura 15. Generación y validación de los CRISPRs de NAMPT en las líneas celulares CCyC.....	67
Figura 16. Simulación de la secuenciación de los clones de los CRISPRs de NAMPT en las líneas celulares de CCyC.....	68
Figura 17. Efecto de los CRISPRs de NAMPT en la capacidad proliferativa y la capacidad de formación de clones en las líneas celulares de CCyC.....	69
Figura 18. Efecto de los CRISPRs de NAMPT en la capacidad de competición en las líneas celulares de CCyC.....	69
Figura 19. Efecto de los CRISPRs de NAMPT en el crecimiento tumoral <i>in vivo</i> en xenotransplantes de las líneas celulares de CCyC.....	70
Figura 20. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en el fenotipo de los tipos de clones en las líneas celulares de CCyC.	71
Figura 21. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en la formación de tumoresferas en las líneas celulares de CCyC.....	72
Figura 22. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en la expresión de genes relacionados con el fenotipo de célula madre tumoral en las líneas celulares de CCyC.....	73

Figura 23. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en la expresión de los genes marcadores de CSC en las líneas celulares de CCyC.....	74
Figura 24. Análisis transcriptómico de genes comunes a CD10, CD184 y CD19 en las líneas celulares de CCyC.....	76
Figura 25. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en el crecimiento tumoral in vivo en xenotransplantes de tumoresferas de las líneas celulares de CCyC.....	77
Figura 26. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en la capacidad de migración en las líneas celulares de CCyC.....	78
Figura 27. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en la expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima en las líneas celulares de CCyC.....	79
Figura 28. Análisis de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima en las líneas celulares de CCyC y la base de datos TCGA.....	80
Figura 29. Validación de los modelos de sobreexpresión de las variantes de NAMPT en las líneas celulares de CCyC.....	81
Figura 30. Validación de la actividad biológica de la sobreexpresión de las variantes de NAMPT en las líneas celulares de CCyC.....	82
Figura 31. Efecto de la sobreexpresión de las variantes de NAMPT en la capacidad proliferativa en las líneas celulares de CCyC.....	83
Figura 32. Efecto de la sobreexpresión de las variantes de NAMPT en la capacidad de formación de clones y en el fenotipo de los mismos, en las líneas celulares de CCyC.....	84
Figura 33. Efecto de la sobreexpresión de las variantes de NAMPT en la formación de tumoresferas en las líneas celulares de CCyC.....	84
Figura 34. Comprobación del efecto biológico de los inhibidores de NAMPT y NAPRT en las líneas celulares CCyC.....	85
Figura 35. Efecto de citotoxicidad de los inhibidores de NAMPT en la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en las líneas celulares de CCyC.....	86
Figura 36. Efecto de citotoxicidad de los inhibidores de NAMPT en combinación con cisplatino y docetaxel en las líneas celulares de CCyC.....	87
Figura 37. Efecto del tratamiento de los inhibidores de NAMPT en monoterapia y en combinación con cisplatino y docetaxel en el crecimiento tumoral <i>in vivo</i> en xenotransplantes en las líneas celulares de CCyC.....	88
Figura 38. Recuperación de la tasa de proliferación de los CRISPRs de NAMPT durante la curva de crecimiento en las líneas celulares de CCyC.....	90

Figura 39. Efecto del ácido nicotínico en las propiedades tumorigénicas de los CRISPRs de NAMPT en las líneas celulares de CCyC.....	93
Figura 40. Efecto de los precursores de NAD ⁺ en la recuperación del contenido celular de NAD de los CRISPRs de NAMPT en las líneas celulares de CCyC.....	94
Figura 41. Evasión de nicotinamida de la ruta de escape limitada por NAMPT en las líneas celulares de CCyC.....	95
Figura 42. Efecto de citotoxicidad de los inhibidores de NAMPT en combinación con el inhibidor de NAPRT en las líneas celulares de CCyC.....	95
Figura 43. Efecto de la limitación de nutrientes metabólicos en las propiedades tumorigénicas de los CRISPRs de NAMPT en las líneas celulares de CyCC.....	97
Figura 44. Relación entre los marcadores propuestos en CCyC.....	106
Figura 45. Modelo de la vía alternativa de desaminación de nicotinamida.....	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Inhibidores de NAMPT en ensayos clínicos.....	17
Tabla 2. Plásmidos utilizados.....	31
Tabla 3. Cebadores utilizados.....	31
Tabla 4. Líneas celulares utilizadas.....	35
Tabla 5. Anticuerpos utilizados.....	42
Tabla 6. Sondas TaqMan utilizadas.....	46
Tabla 7. Anticuerpos utilizados.....	47
Tabla 8. Expresión de marcadores de célula madre tumorales por citometría de flujo (FACS) en las líneas celulares de CCyC.....	53
Tabla 9. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en la expresión de marcadores de CSC por citometría de flujo (FACS) en las líneas celulares de CCyC.....	74
Tabla 10. Genes diferenciales de las subpoblaciones CD10, CD184, CD19 y NAMPT obtenidos del análisis transcriptómico.....	75

ABREVIATURAS

2-HNA: ácido 2-hidroxinicotínico

A

aa: aminoácido

ACMS: semialdehído del ácido 2-amino-3-carboximucónico

ACMSD: semialdehído del ácido 2-amino-3-carboximucónico descarboxilasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADP-ribosa: adenosín difosfato ribosa

ALCAM: molécula de adhesión celular leucocitaria activada

AMP: adenosín monofosfato

C

cADPRs: ADP-ribosa cíclicas

cADPRSs: ADP-ribosa ciclasas

CALLA: antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda

CCND1: ciclina D1

CCyC: cáncer de cabeza y cuello

CRISPR-Cas9: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas – asociada a la proteína Cas9

CSCs: células madre del cáncer

CXCR4: receptor de quimiocina CXC tipo 4

D

D-2HG: D-2-hidroxiglutarato

DLT: toxicidad limitante de la dosis

E

EGFR: receptor factor de crecimiento epidérmico

EMT: transición epitelio-mesénquima

eNAMPT: NAMPT extracelular o visfatina

ENTs: transportadores de nucleósidos equilibrativos

EV: vector vacío

F

FBS: suero fetal bovino

G

G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFP: proteína verde fluorescente

GSH: glutatión

GSSG: glutatión disulfuro

H

HIF-1 α : subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia

I

IC50: la mitad de la concentración inhibitoria máxima

IDH1/2: isocitrato deshidrogenasa 1 y 2

IGF-R1: receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1

IL-6: interleuquina 6

IL-7: interleuquina 7

IP: vía intraperitoneal

iPSCs: células pluripotentes inducidas

K

Knock-down: reducción de expresión

L

LDH: lactato deshidrogenasa

M

Mg²⁺: magnesio

N

NA: ácido nicotínico

NAAD: ácido nicotínico adenina dinucleótido

NAADP: fosfato de dinucleótido de adenina de ácido nicotínico

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NADK: NAD quinasa

NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NADSYN: NAD sintetasa

NAM: nicotinamida

NAMN: ácido nicotínico mononucleótido

NAMPT: nicotinamida fosforribosiltransferasa

NAPRT: ácido nicotínico fosforribosiltransferasa

NAR: ácido nicotínico ribósido

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NGS: secuenciación de nueva generación

NMN: nicotinamida mononucleótida

NMNAT: nicotinamida mononucleótida adenililtransferasa

NNMT: nicotinamida N-metiltransferasa

NR: nicotinamida ribósido

NRK: quinasa nicotinamida ribosa

O

OSKM: factores de Yamanaka

OXPPOS: fosforilación oxidativa

P

PA: ácido picolínico

PARPs: poli-(ADP-ribosa)

PBEF: factor estimulante de colonias pre-B

PnC1: nicotinamidasas

PPi: pirofosfato

PPM1D: proteína fosfatasa 1D

pRb: proteína retinoblastoma

PRPP: fosforribosil pirofosfato

Q

QA: ácido quinolínico

QPRT: quinolinato fosforribosiltransferasa

R

ROS: especies reactivas de oxígeno

S

SD: desviación estándar

SDF-1: factor 1 derivado de células estromales

SEM: error estándar de la media

SCF: factor de célula madre

sgARN: ARN de guía única

shARN: horquilla corta de ARN

SIRT6: sirtuinas

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido

T

TCGA: *The Cancer Genome Atlas Program*

Trp: triptófano

V

VHL: von Hippel-Lindau

VPH: virus del papiloma humano

RESUMEN

Cáncer de cabeza y cuello (CCyC) es en realidad un conjunto de tumores que afectan a diferentes localizaciones anatómicas (cavidad oral, lengua, faringe, nasofaringe, etc), lo que contribuye a la alta heterogeneidad que caracteriza a este tipo de cáncer. La tasa de recurrencia del tumor y la tasa de mortalidad de los pacientes con CCyC siguen siendo muy elevadas a pesar de los avances en el tratamiento. Por lo que resulta vital la búsqueda de identificadores pronóstico y el desarrollo de nuevos tratamientos específicamente dirigidos contra la subpoblación CSC, célula madre tumoral o células iniciadores de tumores. Las células CSC son responsables de la iniciación, progreso y metástasis del tumor y de la resistencia a las terapias convencionales. Sin embargo, existe una gran controversia respecto a los marcadores que identifican a la subpoblación CSC en CCyC debido a la heterogeneidad de estos tumores. Por este motivo, decidimos buscar marcadores de CSC y validar sus propiedades tumorigénicas en dos líneas celulares de CCyC.

En este trabajo, dentro de la heterogeneidad, no hemos encontrado una única población CSC, sino que hemos obtenido varias subpoblaciones independientes identificadas con los marcadores CD10, CD184, CD19, CD133 y CD166. Estas subpoblaciones han mostrado capacidades tumorigénicas relacionadas con el fenotipo de célula madre tumoral. Las subpoblaciones aisladas fueron capaces de regenerar las distintas poblaciones de los otros marcadores reconstituyendo así la heterogeneidad del cultivo. En los ensayos *in vivo*, los tumores generados a partir de las subpoblaciones CD10, CD184 y CD166 positivas en los xenotransplantes crecieron más rápido y con mayor agresividad que los tumores procedentes de las poblaciones negativas. Otro marcador que hemos validado es el gen *NAMPT*. La proteína NAMPT es la enzima limitante de la ruta de rescate (*the salvage pathway*) de la biosíntesis de NAD⁺ en las células. Las células tumorales deben incrementar la producción de NAD⁺ para satisfacer las altas demandas glucolíticas y no-glucolíticas del tumor. Por ello, NAMPT ha sido descrito como un oncogén en diversos tipos de cáncer, sin embargo, el papel tumorigénico de NAMPT en CCyC todavía no ha sido evaluado. Por ello, decidimos estudiar la capacidad tumorigénica de NAMPT y su relación con el fenotipo de célula madre.

La sobreexpresión de NAMPT en nuestras líneas celulares aumenta algunas de las propiedades tumorigénicas y de las relacionadas con el fenotipo CSC, sin embargo, los resultados son muy heterogéneos entre las distintas líneas celulares. La reducción de los niveles de NAMPT mediante CRISPR-Cas9 sí ha demostrado claramente una disminución de las propiedades tumorigénicas y de las relacionadas con el fenotipo CSC, así como la migración celular. La reducción de NAMPT disminuye la capacidad de migración celular y disminuye la expresión de genes relacionados con el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT). Además, las células con NAMPT reducido han mostrado un menor porcentaje de las subpoblaciones CD10, CD184, CD19, CD133 y CD166, y una menor expresión de estos genes a nivel transcripcional. Mientras que, las células con la sobreexpresión de NAMPT han mostrado un mayor porcentaje de estas subpoblaciones y una

mayor expresión de estos genes. Según los datos públicos de TCGA, NAMPT puede ser un indicador de mal pronóstico en pacientes con CCyC, al igual que ocurre en otros tipos de tumores. Por todo ello, proponemos a NAMPT como un posible marcador común de CSC y malignidad en CCyC.

Debido a su papel central en CSC y los efectos de su reducción de expresión, hemos estudiado NAMPT como una diana terapéutica en CCyC. Hemos evaluado los inhibidores GNE617 y GMX1778 en monoterapia y en combinación con cisplatino y docetaxel, dos quimioterapéuticos clásicos que se utilizan actualmente como tratamiento de CCyC. El tratamiento coadyuvante de los inhibidores de NAMPT potencian el efecto antitumoral de cisplatino y, especialmente, de docetaxel tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por otra parte, hemos observado que los CRISPRs de NAMPT, a pesar de tener reducidos los niveles de expresión de NAMPT y el suministro de NAD⁺ celular, ofrecen resistencia en algunas propiedades tumorigénicas, como por ejemplo la proliferación celular. El mecanismo por el que los CRISPRs de NAMPT recuperan la velocidad de proliferación es diferente en las dos líneas celulares. Los CRISPRs de línea RPMI-2650 recuperan la velocidad de crecimiento activando la enzima NAPRT de la vía *Preiss-Handler*, mientras que los CRISPRs de la línea Detroit-562 lo hacen potenciando la actividad remanente de NAMPT. Hemos comprobado que la activación de la vía *Preiss-Handler*, mediante la administración de su sustrato, aumenta algunas propiedades tumorigénicas de los CRISPRs de NAMPT. Mientras que la inhibición enzimática de esta vía disminuye estas propiedades. Por otra parte, los CRISPRs de NAMPT son capaces de recuperar el contenido de NAD⁺ mediante la administración exógena de los precursores de la biosíntesis, como son ácido nicotínico (NA), nicotinamida ribósido (NR) y nicotinamida (NAM). Curiosamente, hemos observado que NAM es capaz de evadir la ruta de rescate, catalizada por NAMPT, utilizando la vía alternativa *Preiss-Handler*. Adicionalmente, hemos estudiado la capacidad de adaptación de los CRISPRs de NAMPT a la disponibilidad de los precursores del medio.

SUMMARY

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a group of tumor types that affect different anatomical locations (oral cavity, tongue, pharynx, nasopharynx, etc.) which contributes to the high heterogeneity of this cancer type. The tumor recurrence and the mortality rate in patients with HNSCC remain very high despite treatment advancements. Therefore, searching new markers and developing specific treatments against CSC subpopulation, also called cancer stem cells or tumor-initiating cells, is essential. CSCs are responsible for tumor initiation, progression, metastasis, and resistance to conventional therapies. However, there is controversy regarding specific CSC markers in HNSCC due to tumor heterogeneity. For this reason, we decided to search for CSC markers and validate their tumorigenic properties in two HNSCC cell lines.

In this work, within the heterogeneity, we have not found a single CSC population, but several independent subpopulations identified with the markers CD10, CD184, CD19, CD133 and CD166. These cell subpopulations have shown tumorigenic capacities related to CSC phenotype. The isolated subpopulations were able to regenerate the other CSC populations, thus reconstituting the heterogeneity of the culture. Tumors from CD10, CD184 or CD166 positive subpopulations in xenografts grew faster and more aggressively than tumors from negative populations. Another marker that we have validated is NAMPT, the rate-limiting enzyme of the salvage pathway in cellular NAD⁺ biosynthesis. Tumor cells must increase NAD⁺ production to satisfy their high glycolytic and non-glycolytic demands. For this reason, NAMPT has been described as an oncogene in many cancer types. However, the tumorigenic role of NAMPT in HNSCC has not been evaluated yet. Therefore, we decided to study NAMPT tumorigenic properties and its relationship with the CSC-like phenotype.

NAMPT overexpression increases some tumorigenic properties and promotes a CSC-like phenotype. However, the results are very heterogeneous among the different cell lines. NAMPT knock-down by CRISPR-Cas9 induces a significant reduction in tumorigenic and CSC-like properties, including migration. NAMPT downregulation decreases the capacity of cell migration and reduces the expression of genes related to the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Furthermore, NAMPT CRISPRs show a lower percentage of CD10, CD184, CD19, CD133 and CD166 subpopulations, and a lower expression of these genes at the transcriptional level. While cells with upregulated NAMPT show a higher percentage of these subpopulation and higher expression levels of these genes. According to public data from TCGA, NAMPT can be a poor prognostic indicator in patients with HNSCC, as in other cancer types. Therefore, we propose NAMPT as a possible common CSC and malignancy marker in HNSCC.

Due to its central role in CSC and the effects of its reduced expression, we have studied NAMPT as a therapeutic target in HNSCC. We have evaluated the inhibitors GNE617 and GMX1778 in monotherapy and in combination with cisplatin and docetaxel, two classic chemotherapeutics

that are currently used as treatment for HNSCC. Adjuvant treatment of NAMPT inhibitors potentiates the antitumor effect of cisplatin and, especially docetaxel, both *in vitro* and *in vivo*.

Although CRISPRs cells have reduced levels of NAMPT expression and NAD⁺ pool, they still offer resistance in some tumorigenic properties, for example cell proliferation. The resistance mechanism is different in the two cell lines. NAMPT CRISPRs of RPMI-2650 cell line increase growth rate by activating NAPRT enzyme of the Preiss-Handler pathway, while NAMPT CRISPRs of Detroit-562 cell line increase the proliferation by the promotion of the remaining NAMPT activity. The activation of the Preiss-Handler pathway, through its substrate administration, increases some tumorigenic properties of NAMPT CRISPRs, while the enzymatic inhibition of this pathway reduces these properties. NAMPT CRISPRs can recover the NAD⁺ pool through the exogenous administration of NAD⁺ precursors, such as nicotinic acid (NA), nicotinamide riboside (NR) and nicotinamide (NAM). Interestingly, we have observed that NAM is able to bypass the salvage pathway catalyzed by NAMPT and use the alternative Preiss-Handler pathway to generate NAD⁺. Additionally, we have studied how the nutrient availability in the environment can affect NAMPT CRISPRs cells.

INTRODUCCIÓN

1. Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD⁺)

Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es un metabolito muy abundante que juega un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular. NAD⁺ actúa como un cofactor en múltiples reacciones de reducción-oxidación (redox) implicadas en diversos procesos de producción de energía como la glucólisis, el ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa, la oxidación de ácidos grasos y la biosíntesis de serina.¹⁻³

La molécula de NAD⁺ es un dinucleótido compuesto por adenosín monofosfato (AMP) unida a través de un grupo fosfato a nicotinamida mononucleótida (NMN) que, éste a su vez, está formado por un grupo fosfato, un anillo de ribosa y nicotinamida.^{1,4} Las propiedades electroquímicas de la fracción de nicotinamida son responsables de las funciones clásicas redox atribuidas a NAD⁺. De modo que, el grupo nicotinamida es capaz de aceptar un anión hidruro (H⁺, 2e⁻) dando lugar a la forma reducida de la molécula, NADH. Por el contrario, NADH puede oxidarse a NAD⁺ mediante la donación de ese anión hidruro.^{1,5,6} Alternativamente, el anillo ribosa de la fracción AMP de NAD⁺ puede ser fosforilado por la enzima NAD quinasa (NADK) dando lugar a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺) que también puede reducirse a NADPH.^{1,7} Todas las formas de NAD (NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH) actúan como aceptores y donadores de electrones en múltiples reacción redox en la célula. **(Figura 1)**

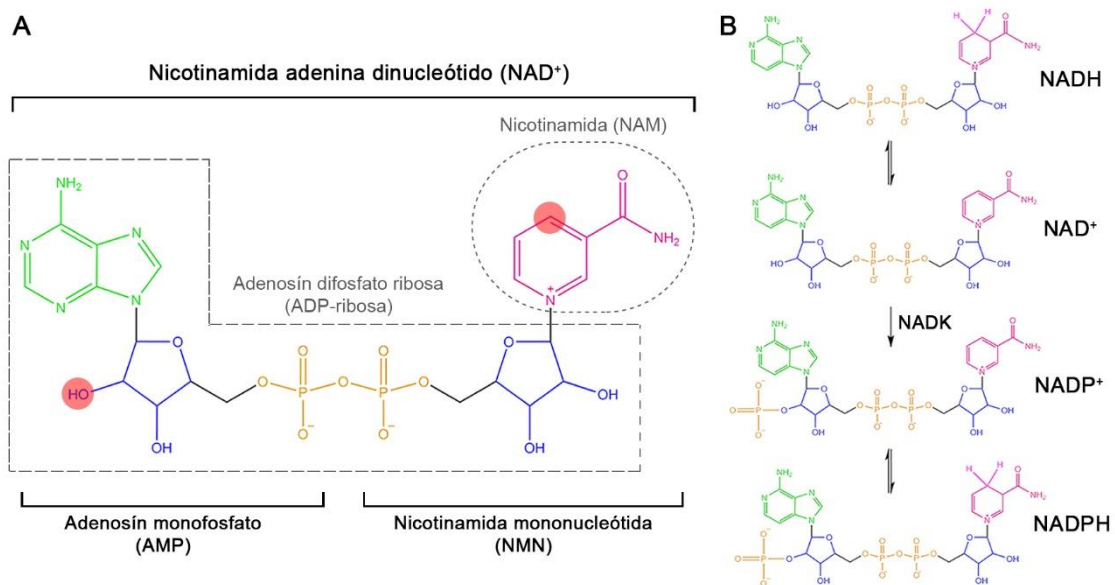


Figura 1. Estructura de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺). La molécula es un dinucleótido formado por adenosín monofosfato (AMP) unido a nicotinamida mononucleótida (NMN). AMP está compuesto por una base de adenina (en verde), un anillo de ribosa (en azul) cuyo hidroxilo en rojo puede ser fosforilado dando lugar a NADP⁺, y un grupo fosfato (en amarillo). NMN está formado por un grupo fosfato, un anillo de ribosa y nicotinamida (NAM) (en rosa) cuyo átomo marcado en rojo es capaz de aceptar un anión hidruro (H⁺, 2e⁻) dando lugar a la forma reducida NADH. Además, NAD⁺ es un donador de ADP-ribose (línea discontinua gris).

Aunque la forma oxidada, NAD^+ , es la más abundante y ubicua en las células, su disponibilidad puede variar dependiendo de varios factores, tales como el compartimento subcelular, el tipo celular, los niveles de glucosa, la ingesta y restricción calórica, el ejercicio, el envejecimiento y los ciclos circadianos. Por ejemplo, se ha observado que las concentraciones de NAD^+ en el citosol y en el núcleo son bastante similares (aproximadamente $100 \mu\text{M}$) porque ambos compartimentos están interconectados, mientras que el contenido de NAD^+ en las mitocondrias es mucho mayor (aproximadamente $250\text{-}500 \mu\text{M}$) ya que la membrana mitocondrial es impermeable a NAD^+ y NADH . Esta impermeabilidad asegura una rápida regulación local de los procesos fisiológicos dependientes de NAD^+ .^{1,8,9} Además, la concentración de NAD^+ puede oscilar a lo largo del día bajo una regulación circadiana. El complejo CLOCK:BMAL1 activa el promotor de la enzima NAMPT, que es clave en la biosíntesis de NAD^+ , aumentando así la producción de NAD^+ cada 24 horas. Por otra parte, SIRT1, una enzima consumidora de NAD^+ , contrarresta este efecto mediante la desacetilación de BMAL1 y las histonas de promotores de otros genes reguladores.^{1,10-12}

1.1. Funciones Redox de NAD^+

Inicialmente, a NAD^+ se le atribuyó el papel de transportador universal de electrones en las reacciones redox de los procesos catabólicos para la obtención de energía en las células. La glucólisis, por ejemplo, requiere de la reducción de NAD^+ a NADH para permitir la oxidación de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en el citosol. Cada molécula de glucosa dará lugar a 2 moléculas de NADH , 2 moléculas de ATP y 2 moléculas de piruvato. Dependiendo de la disponibilidad del oxígeno, el piruvato puede optar por reducirse a lactato u oxidarse a acetil-CoA. Bajo condiciones anaeróbicas, la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) reduce el piruvato a lactato utilizando NADH como cofactor el cual se oxida regenerando NAD^+ . En cambio, cuando hay disponibilidad de oxígeno, el piruvato se oxida a acetil-CoA junto con la reducción de NAD^+ a NADH .^{1-3,8} Otra fuente de acetil-CoA es la que se genera mediante la oxidación de ácidos grasos, proceso que requiere también la reducción de NAD^+ .^{1,13}

En la mitocondria, acetil-CoA entra en el ciclo de Krebs generando 8 moléculas de NADH . Todo el NADH mitocondrial se oxida al donar sus electrones al complejo I, también llamado NADH :ubiquinona oxidorreductasa, de la cadena de transporte de electrones. Estos electrones van pasando secuencialmente desde el complejo I a ubiquinona, complejo II, citocromo C, y complejo IV dando lugar a la reducción del oxígeno al agua. Este flujo de electrones genera un gradiente de protones en el espacio de la membrana interna mitocondrial lo que da lugar finalmente a la producción de 30 moléculas de ATP.^{1-3,8} Sin embargo, también se genera una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden ocasionar serios daños oxidativos, los cuales se pueden reducir mediante el sistema antioxidante formado por SODs, catalasas, MAPKS, SIRTs, GSH y las vitaminas C y E. Dado que el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones requieren de NAD^+ y NADH , respectivamente, es necesario un ratio NAD^+/NADH óptimo para un metabolismo mitocondrial eficiente.^{1,14,15}

Al contrario que NAD^+ , la forma fosforilada, NADP^+ , es necesaria para los procesos anabólicos, incluyendo la síntesis de los ácidos nucleicos a través de la ruta de la pentosa fosfato.^{1,16,17} Además, su forma reducida, NADPH , es esencial para disminuir los niveles ROS. De hecho, muchas proteínas antioxidantes dependen de NADPH como cofactor, por ejemplo, la reducción de glutatión disulfuro (GSSG) a glutatión (GSH) requiere NADPH generado durante el primer paso de la ruta de la pentosa fosfato donde la glucosa-6-fosfato se convierte en 6-P-gluconato.^{1,17} El mantenimiento de la homeostasis redox intracelular es un proceso celular esencial que requiere un equilibrio entre la generación y eliminación de ROS. Esta regulación es especialmente importante en las células tumorales, las cuales, generalmente, tienen una mayor producción de ROS y necesitan un control más estricto de este equilibrio.^{1,18-20} NADPH también es un cofactor importante en la síntesis de los ácidos grasos, los cuales son necesarios para la formación de la membrana durante la proliferación celular, usando acetil-CoA como precursor.^{1,3} **(Figura 2)**

1.2. Funciones no-redox: NAD^+ como sustrato

NAD^+ y NADH se pueden interconvertir entre sí de una manera casi ilimitada sin ser apenas consumidas.^{1,5} Por lo que, en teoría, debería haber la misma cantidad de NAD^+ que de NADH en las células, sin embargo, la realidad es bastante distinta. NAD^+ es aproximadamente 600-1100 veces más abundante que NADH ,^{1,21} esto es debido a que NAD^+ participa en muchos otros procesos moleculares no-redox, como por ejemplo la reparación del ADN, señalización celular, modificaciones post-traduccionales, metabolismo mitocondrial, respuestas inflamatorias, senescencia y apoptosis.^{1,2,4,6,17,22,23} En estas reacciones no-redox, NAD^+ es consumida como sustrato por diferentes tipos de enzimas, incluyendo las familias SIRT, PARPs y cADPRs. Estas enzimas utilizan NAD^+ como donador de ADP-ribosa y liberan nicotinamida (NAM) como producto catabólico.^{1,7,24}

La familia de las sirtuinas (SIRT) son unas enzimas deacetilasas dependientes de NAD^+ que eliminan los grupos acetilos de los residuos de lisina de las histonas y otras proteínas, generando o-acetil-ADP-ribosa y nicotinamida (NAM).^{1,24-26} La familia poli-(ADP-ribosa) polimerasas (PARPs) se localiza en el núcleo donde interviene en muchos procesos biológicos, como la reparación del ADN, regulación transcripcional y metabolismo, transfiriendo largas cadenas de polímeros de ADP-ribosa a sus proteínas diana.^{1,22,23,25} Las ectoenzimas CD38, CD157, CD39 y CD73 pertenecen a la familia ADP-ribosa ciclasas (cADPRs) que consumen NAD^+ y NADP^+ generando, respectivamente, ADP-ribosa cíclicas (cADPRs) y fosfato de dinucleótido de adenina de ácido nicotínico (NAADP), los cuales actúan como mensajeros secundarios de la señalización del calcio.^{1,21,25,27} SIRT, PARPs y cADPRs son capaces de coregularse entre ellos compitiendo por el mismo contenido NAD^+ intracelular. Por ejemplo, SIRT1 puede desacetilar e inhibir a PARP1, aumentando así los niveles de NAD^+ , mientras que PARP2 inhibe la transcripción de las SIRTs.^{1,21,24,25} La importancia del papel de NAD^+ en las reacciones no-redox se han establecido recientemente y, por consiguiente, NAD^+ ha sido propuesto como la unión entre el metabolismo y la señalización en muchos procesos fisiológicos y en enfermedades.^{1,9}

1.3. NAD⁺ en el metabolismo del cáncer

Las células cancerosas presentan la habilidad de reprogramar su metabolismo para permitir la alta tasa de crecimiento y producción de biomasa, incluso con recursos limitados de energía y otras condiciones adversas. Esta ventaja darwiniana permite la progresión, desarrollo y supervivencia del tumor.²⁸ En las células tumorales se han encontrado mayores tasas NAD⁺/NADH y NADP⁺/NADPH que en las células no-tumorales, lo que sugiere un importante papel de NAD⁺ en esta conversión metabólica.^{1,29} Las células tumorales son capaces de cambiar el metabolismo de fosforilación oxidativa (OXPHOS) a glucólisis, incluso en condiciones normales de oxígeno, creando un estado pseudohipóxico conocido como el efecto Warburg.^{1,30,31} A pesar de que el metabolismo OXPHOS genera energía de una manera más eficiente, 36 moléculas de ATP, las células tumorales prefieren la glucólisis que genera menos energía, 2 moléculas de ATP, pero de una forma más acelerada. Esta producción rápida de energía confiere una ventaja competitiva a la hora de compartir los nutrientes limitados con las células del estroma.^{1,32,33} Pero, ésta no es la única ventaja de la glucólisis anaeróbica, sino que también permite a las células tumorales sintetizar macromoléculas y contrarrestar la producción de ROS. De hecho, parte del piruvato que se forma se oxida a acetil-CoA para entrar en el ciclo de Krebs, no para obtener ATP sino para producir los compuestos intermediarios del ciclo y usarlos como precursores biosintéticos. Al mismo tiempo que se consumen estos compuestos, se deben reabastecer principalmente a través del metabolismo de la glutamina, que es el aminoácido más abundante en las células y la principal fuente de nitrógeno. Las células tumorales dependen de la glutaminólisis para la síntesis de otros aminoácidos no esenciales, GSH, NAD⁺, NADPH y ácidos nucleicos.^{1,31,33-35}

Algunos intermediarios de la glucólisis están involucrados en otras rutas que se encuentran altamente activadas en cáncer. Una de esas rutas es la de la pentosa fosfato que es esencial para la síntesis de ácidos nucleicos, la replicación del ADN, y consecuentemente, el incremento de la producción de la biomasa.^{1,31,36} Además, es la principal fuente de NADPH que es requerido para contrarrestar el estrés oxidativo producido por el metabolismo acelerado, la inducción de hipoxia y la acumulación del daño en el ADN en las células tumorales. La radio y quimioterapia favorecen este daño oxidativo aumentando los niveles de ROS y, en respuesta a este estrés, los factores oncogénicos ATM, Ras, PI3K/Akt/mTOR y Src inducen la expresión de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), activando la ruta de la pentosa fosfato.^{1,16,36} Otra ruta dependiente de la glucólisis es la síntesis de la serina, la cual ha sido encontrada incrementada en cáncer y también es dependiente de NAD⁺. La serina es un precursor de la glicina y cisteína y está involucrada en el metabolismo de la metionina y ácido fólico, transporte de aminoácidos, metilación de ADN e histonas y equilibrio redox en la célula.^{1,37,38} El metabolismo de las células tumorales depende principalmente de la ruta de la pentosa fosfato, la biosíntesis de la serina y la síntesis de los ácidos grasos. Estas rutas metabólicas, las cuales son dependientes de NAD⁺ y NADP⁺, emergen de la glucólisis, convirtiendo el efecto Warburg en el principal impulsor del metabolismo del cáncer.¹ **(Figura 2)**

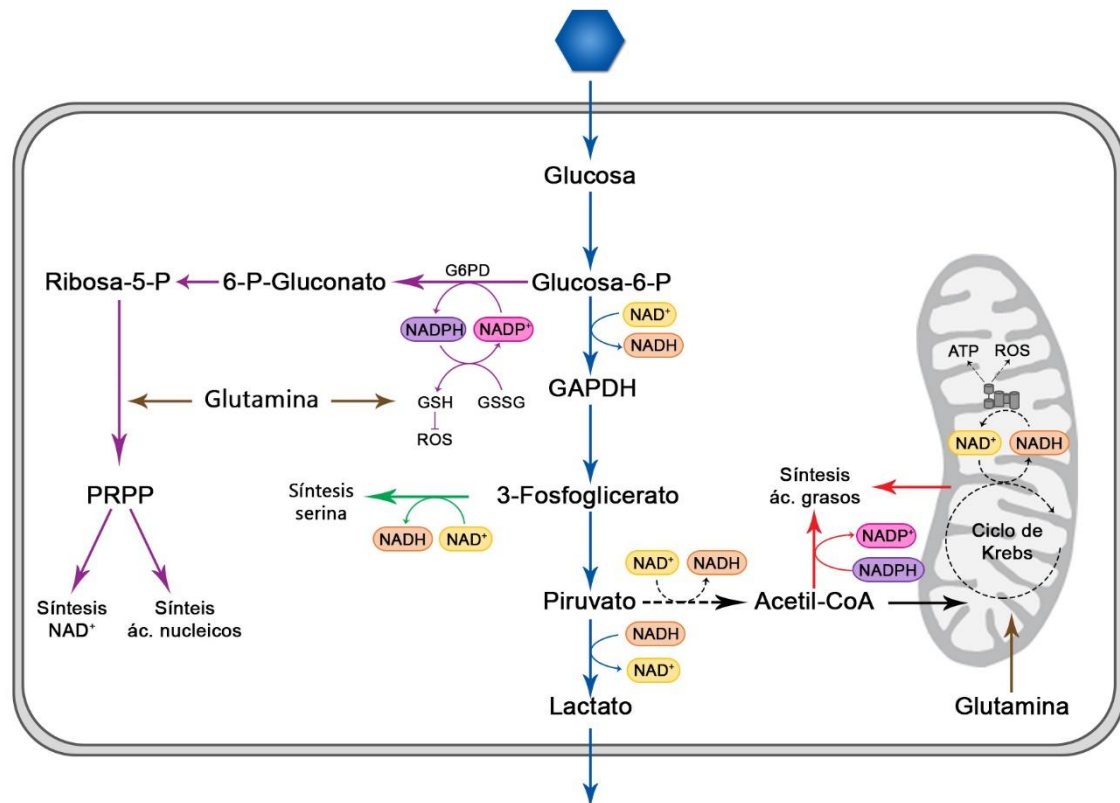


Figura 2. NAD⁺ en el metabolismo del cáncer. Las células tumorales dependen más de la glucólisis (en azul) que en OXPHOS de la mitocondria (en negro discontinuo), lo que se conoce como el efecto Warburg. La ruta de la pentosa fosfato (en morado), la biosíntesis de la serina (en verde) y la síntesis de los ácidos grasos (en rojo) están altamente activados en cáncer y dependen de la glucólisis, siendo éste el eje del metabolismo del cáncer. La glutaminólisis (en marrón) también está incrementada como la principal fuente de nitrógeno en la célula. En todas estas rutas participan los cofactores NAD⁺/NADH y NADP⁺/NADPH, permitiendo la producción rápida de energía, la eliminación del exceso de ROS y la síntesis de macromoléculas para soportar la proliferación y desarrollo tumoral. Figura adaptada de Navas y Carnero, 2021.¹

1.4. Biosíntesis de NAD⁺

Para satisfacer las exigentes demandas de NAD⁺ de los procesos redox y no-redox, las células de los mamíferos deben sintetizar NAD⁺ a partir de precursores de la dieta, como son el triptófano y las diferentes formas de la vitamina B3 (ácido nicotínico, nicotinamida y nicotinamida ribósido). Estos precursores son compuestos esenciales que se deben tomar de la dieta para la síntesis de NAD⁺. De hecho, una deficiencia crónica de estos precursores puede producir la enfermedad de la pelagra cuyos síntomas son diarrea, dermatitis, demencia, daño neurológico e incluso la muerte. Curiosamente, el papel esencial de NAD⁺ en las células se descubrió cuando se estaba investigando el tratamiento contra la pelagra en los años 20.^{1,3,21}

A partir de estos precursores, las células sintetizan NAD⁺ a través de tres vías diferentes: la ruta *de novo*, la ruta *Preiss-Handlery* la ruta de nucleósido. Adicionalmente, las células pueden reciclar el producto catabólico liberado por las enzimas consumidoras de NAD⁺ (SIRT, PARPs y cADPRs) y reconstituir la molécula a través de la ruta de rescate o *the salvage pathway*, siendo esta opción la favorita de las células.^{1,8-11,39} (Figura 3)

1.4.1. Ruta *De novo* (*De novo pathway*)

NAD⁺ puede sintetizarse *de novo* a partir del triptófano (Trp) que es un aminoácido esencial que debe incorporarse diariamente a través de la dieta. En humanos, esta ruta, también llamada ruta de quinurenina, se produce principalmente en el hígado y consta de varios pasos.^{1,9} El metabolito limitante es el ácido quinolínico (QA). Su precursor, semialdehído del ácido 2-amino-3-carboximucónico (ACMS), puede elegir entre oxidarse al ácido picolínico (PA) mediante la enzima semialdehído del ácido 2-amino-3-carboximucónico descarboxilasa (ACMSD), o bien entrar en una ciclación espontánea dando lugar a QA. El compuesto QA solamente se forma cuando la enzima ACMSD se satura. Una vez formado, QA entra en la vía *Preiss-Handler* mediante la enzima quinolinato fosforribosiltransferasa (QPRT) para continuar la síntesis de NAD⁺.^{1,3,7} Por otra parte, el Trp también es requerido para la síntesis de otras moléculas esenciales, como serotonina y melatonina. Aproximadamente sólo el 1,66% del Trp de la dieta es usado para la biosíntesis de NAD⁺. Esta baja eficiencia explica por qué la ruta *de novo* no es la principal fuente de NAD⁺ en humanos.^{1,3}

1.4.2. Ruta *Preiss-Handler* (*The Preiss-Handler pathway*)

NAD⁺ puede sintetizarse a partir del ácido nicotínico (NA), también llamada niacina, de la dieta. Ácido nicotínico fosforribosiltransferasa (NAPRT) es la enzima limitante de esta ruta y cataliza la conversión de NA en el compuesto intermediario ácido nicotínico mononucleótido (NAMN). En consecuencia, NAMN se convierte en ácido nicotínico adenina dinucleótido (NAAD) mediante la enzima nicotinamida mononucleótida adenililtransferasa (NMNAT).^{1,3} Finalmente, la enzima NAD sintetasa (NADSYN) utiliza la glutamina como donador del grupo amida para amidar NAAD y formar NAD⁺.^{1,40}

1.4.3. Ruta de rescate (*The salvage pathway*)

Teniendo en cuenta que la vida media de NAD⁺ es de aproximadamente 4-10 horas y que la ingesta media diaria de vitamina B3 es de 15 mg no llegando a cubrir las necesidades fisiológicas (por ejemplo, el hígado necesita aproximadamente 8 g al día), a las células no les queda otra opción que recomponer la molécula NAD⁺ a través de la ruta de rescate o *the salvage pathway*.^{1,3,16} Nicotinamida (NAM), el producto catabólico que liberan las enzimas consumidoras de NAD⁺, es reciclada en dos etapas. La primera etapa es la reacción limitante de esta ruta y es catalizada por la enzima nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) que convierte NAM en nicotinamida mononucleótida (NMN) en presencia de magnesio (Mg²⁺) y fosforribosil pirofosfato (PRPP). En la segunda etapa, la enzima NMNAT reconstituye NAD⁺ a partir de NMN.^{1,41-45} Esta ruta de rescate es la principal fuente de NAD⁺ en las células de los mamíferos debido a la alta eficiencia de producción, menos del 1% de NAD⁺ se pierde al día al reciclarse. Esto explica por qué las células dependen completamente de esta ruta.^{1,3,7,44,45}

1.4.4. Ruta de nucleósido (*The Nucleoside Pathway*)

Ácido nicotínico ribósido (NAR) y nicotinamida ribósido (NR) son otros precursores de NAD^+ que se adquieren de la dieta. Una vez que llegan al organismo, la enzima quinasa nicotinamida ribosa (NRK) se encarga de fosforilar a NAR dando lugar a NAMN (intermediario de la ruta *Preiss-Handler*) y a NR convirtiéndolo directamente a NMN, saltándose la reacción limitante catalizada por NAMPT de la ruta de rescate.^{1,7} Hasta hace poco se pensaba que la membrana celular era impermeable a NMN extracelular generado por NAMPT extracelular y CD38. Por lo que NMN debía primero desfosforilarse a NR por la enzima CD73 y luego, NR entraba en la célula a través de los transportadores de nucleósidos equilibrativos (ENTs).^{1,3} Sin embargo, Grozio y colaboradores recientemente identificaron un transportador de NMN en la membrana celular al que llamaron Slc12a8.^{1,46,47}

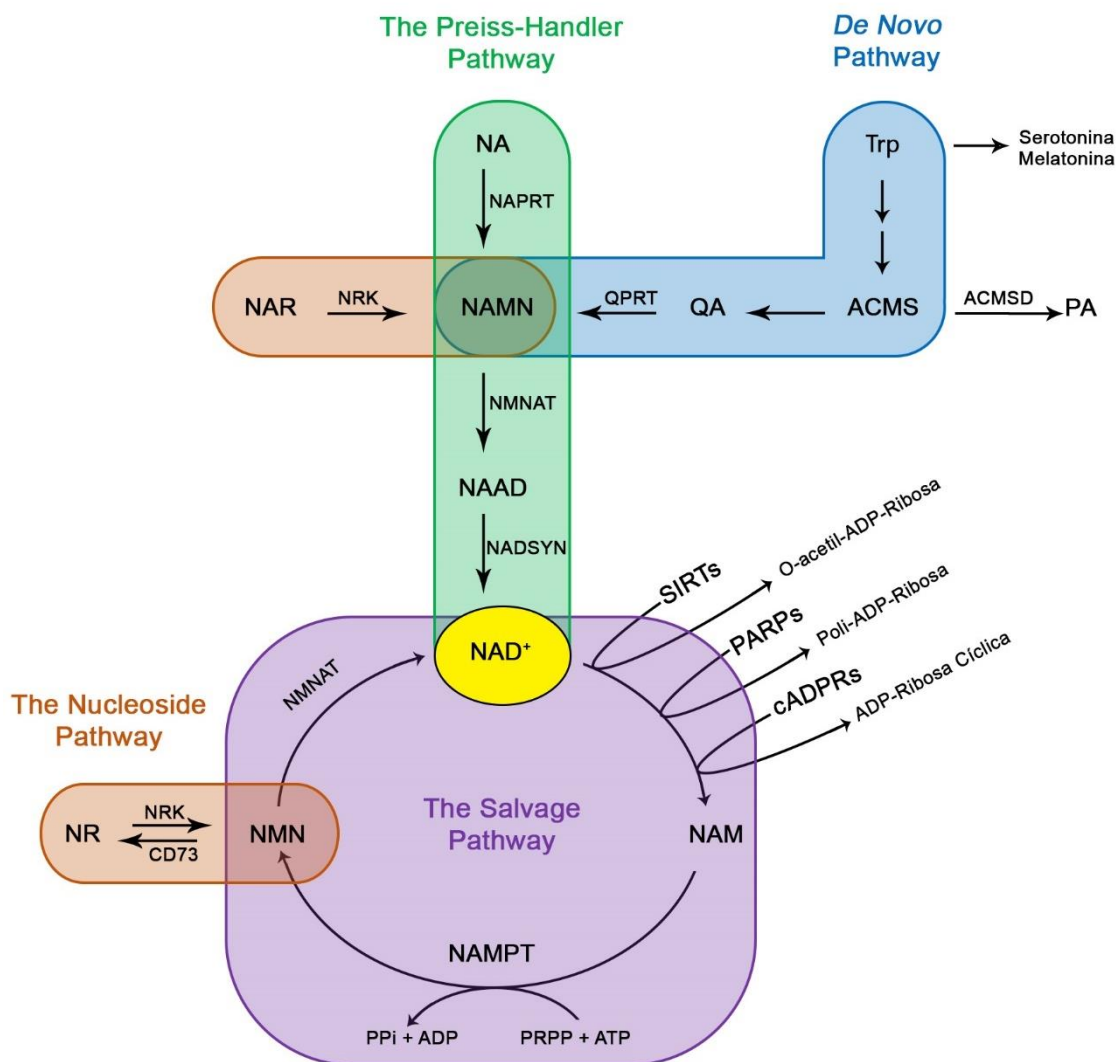


Figura 3. Biosíntesis de NAD^+ . Las células pueden sintetizar NAD^+ a partir de diferentes precursores que se adquieren de la dieta a través de la ruta *de novo* (a partir de Trp), la ruta *Preiss-Handler* (a partir de NA) y la ruta de nucleósido (a partir de NAR o NR). Sin embargo, la mayor fuente de NAD^+ de las células es la ruta de rescate o *the salvage pathway* donde el producto catabólico NAM liberado por las enzimas consumidoras de NAD^+ (SIRT6, PARPs y cADPRs), es reciclado para constituir de nuevo la molécula NAD^+ . Figura adaptada de Navas y Carnero, 2021.¹

2. Nicotinamida Fosforribosiltransferasa (NAMPT)

Nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT), además de ser la enzima limitante de la ruta de rescate de NAD^+ , también actúa como una citoquina modulando respuestas inflamatorias, metabólicas e inmunitarias.^{48,49} De hecho, NAMPT se descubrió en una biblioteca de ADNc de linfocitos de sangre periférica humana e inicialmente se le llamó factor estimulante de colonias pre-B (PBEF), ya que estaba involucrada en la maduración de los linfocitos B en presencia de interleuquina 7 (IL-7) y factor de célula madre (SCF).^{50,51} Esta forma extracelular de NAMPT se le llama comúnmente visfatina, para diferenciarla de la forma intracelular. Visfatina es secretada principalmente por adipocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales inflamadas, y está involucrada en procesos inflamatorios y desórdenes metabólicos como la obesidad y el cáncer. Por ejemplo, los adipocitos liberan visfatina al medio extracelular donde ejerce una función insulina-mimética y regula los niveles de glucosa y grasa visceral relacionados con la obesidad. De hecho, en personas obesas se han detectado altos niveles de visfatina.^{48,52}

Curiosamente, la secuencia de la proteína visfatina carece de señal de secreción por lo que se piensa que la proteína es la misma que NAMPT intracelular liberada tras la lisis celular.^{48,53} La forma intracelular de NAMPT se expresa en todos los tejidos, principalmente en aquellos que requieren más energía como son la médula ósea, el hígado y el músculo. Y, dentro de la célula, NAMPT se localiza principalmente en el citoplasma y en el núcleo.^{45,51}

El gen *NAMPT* se localiza en el cromosoma 7, específicamente en el locus 7q22.3, y contiene 11 exones y 10 intrones.^{45,50,54} Se han predicho aproximadamente 19 ARN mensajeros y 14 variantes que se producen a través de empalmes alternativos o *splicing*. De todas estas variantes, solamente 4 producirían proteínas: la variante 1 con un tamaño de 491 aminoácidos (aa), la variante 2 con 368 aa, la variante 3 con 88 aa y la variante 4 con 60 aa. La variante predominante es la variante 1, NAMPT1, que es la única que posee la actividad enzimática necesaria para la conversión de NAM a NMN.^{54,55} La proteína contiene dos dominios reconocidos: DUF5593, que comprende la región N-terminal 10-116 aa y cuya función se desconoce, y NAPRTase, que comprende la región 188-466 aa y que es responsable de la actividad enzimática de la proteína.^{56,57} Los aminoácidos que componen el sitio catalítico se encuentran en la posición: D219 (ácido aspártico), G384 (glicina) y R392 (arginina). Por otro lado, los aminoácidos R196 (arginina), H247 (histidina) y R311 (arginina) forman el sitio de unión del cofactor PRPP.⁵⁸ **(Figura 4A)**. NAMPT1, para ser funcional debe formar un homodímero con dos sitios catalíticos, cada uno de ellos está formado por 2 aa de una cadena y 1 aa de la otra cadena.^{59,60} **(Figura 4B)**

En los mamíferos, parece ser que NAMPT puede activarse mediante autofosforilación. De modo que, para que ocurra la síntesis de NMN, primero la histidina 247 se debe fosforilar gracias a la hidrólisis de ATP y en presencia de Mg^{2+} . Se ha observado que NAMPT-fosforilado es más activo que su forma no fosforilada. Una vez que la enzima está activa, se unen sus sustratos, primero PRPP y luego NAM, cada uno a su sitio de unión correspondiente.^{54,61,62}

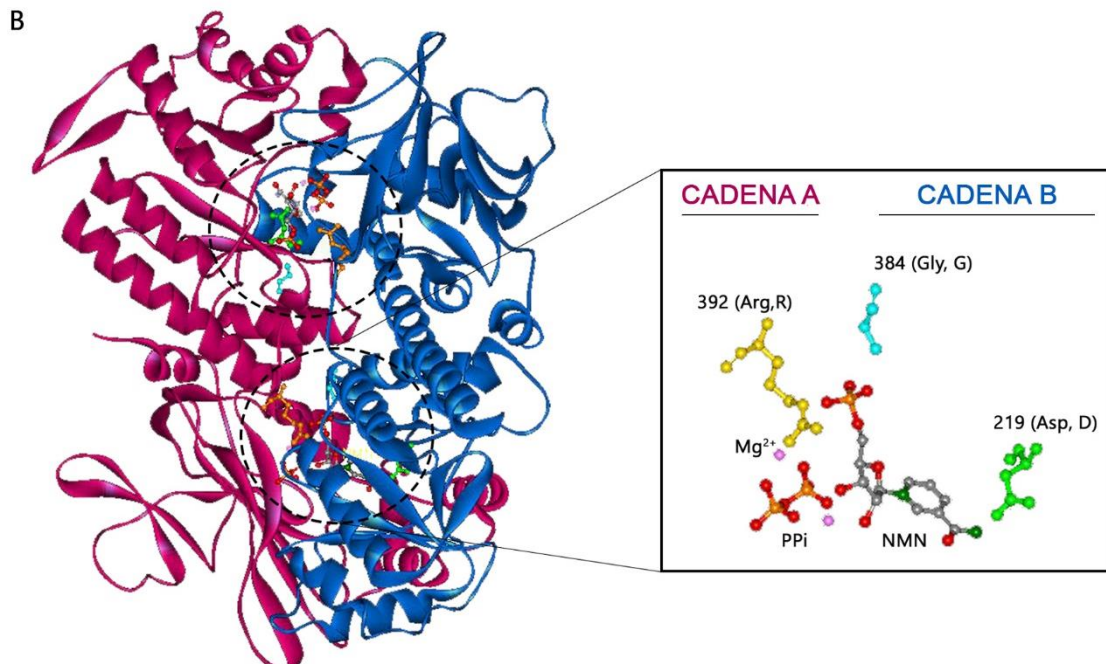
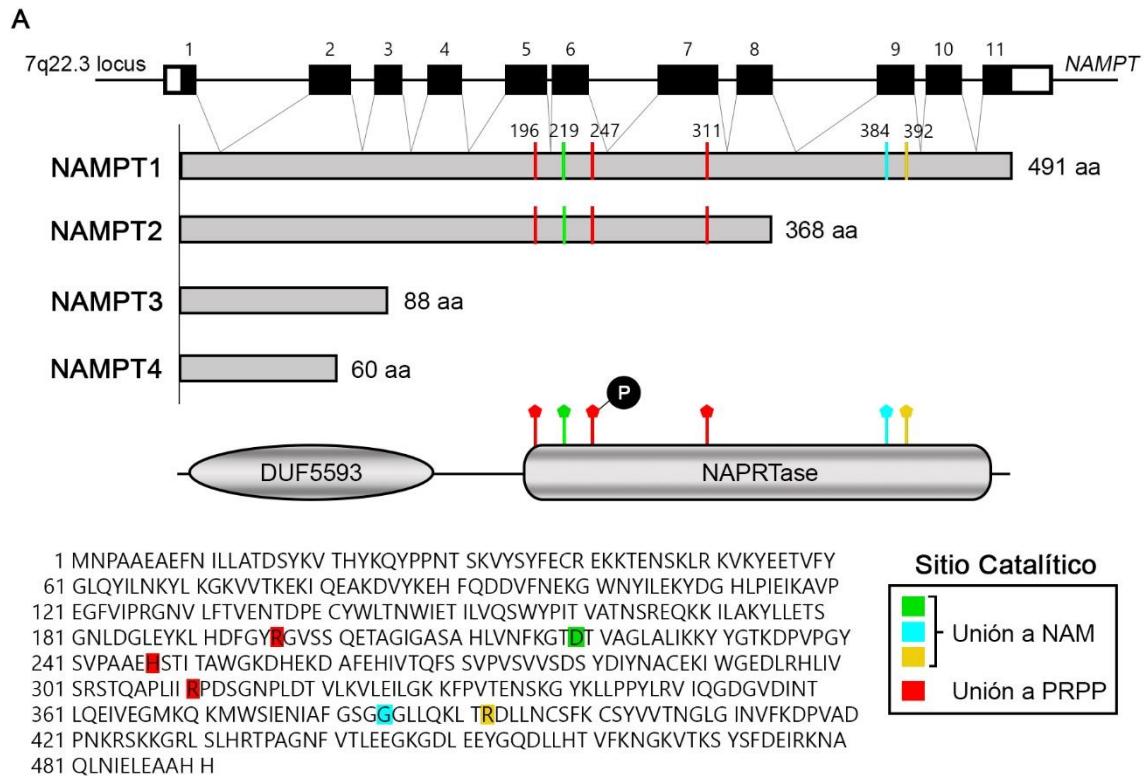


Figura 4. Estructura del gen y la proteína NAMPT. A) El gen *NAMPT* contiene 11 exones y 10 intrones que se traducen en 4 posibles variantes por empalmes alternativos o *splicing*. NAMPT1 es la variante predominante y la única que tiene actividad enzimática. La proteína contiene 2 dominios: DUF5593 y NAPRTase, en el cual se localizan los aminoácidos que forman el sitio catalítico de NAM (D219, G384 y R392) y de PRPP (R196, H247 y R311). El aa H247 previamente se debe fosforilar mediante la hidrólisis de ATP para que tenga lugar la síntesis de NMN. **B)** Estructura cristalina del homodímero funcional NAMPT (3DHF; <https://www.rcsb.org/structure/3DHF>). Los sitios catalíticos están señalizados en círculos discontinuos.

Las otras variantes que se han predicho (NAMPT2, NAMPT3 y NAMPT4) no contienen estos aminoácidos requeridos para la actividad enzimática asignada a NAMPT1, y actualmente se desconoce si tienen alguna función en la célula. En el presente trabajo se mencionará NAMPT refiriéndose exclusivamente a la variante 1.

2.1. NAMPT en cáncer

Para satisfacer las demandas glucolíticas y no-glucolíticas, las células tumorales deben incrementar los niveles de NAD⁺ potenciando su biosíntesis, principalmente la ruta de rescate o *the salvage pathway*. Por lo que no es de extrañar que NAMPT, la enzima limitante de esta ruta, haya sido identificado como un oncogén en cáncer. De hecho, se han hallado altos niveles de NAMPT tanto en neoplasias hematológicas^{63,64} como en varios tumores sólidos, incluyendo cáncer de colon,⁴² próstata,⁶⁵ mama,⁶⁶ tiroides,⁶⁷ gástrico⁶⁸ y glioblastoma.^{43,44} NAMPT es capaz de aumentar las propiedades tumorigénicas de las células, como son la proliferación celular, la formación de clones y la resistencia a apoptosis, permitiendo así la iniciación y progreso del tumor.^{1,42,43} Muchos estudios han correlacionado la expresión de NAMPT con los datos clínicos de los pacientes con cáncer. Por ejemplo, en cáncer de estómago, de colon y glioblastoma, altos niveles de NAMPT se correlacionan con un estadio más agresivo del tumor, metástasis, resistencia al tratamiento y peor pronóstico.^{1,42,43,68}

Por otro lado, la forma extracelular de NAMPT, visfatina, está involucrada en el proceso de neovascularización en cáncer. Se ha observado que visfatina regula la función de moléculas de adhesión, como ICAM-1 y VCAM-1, a través de la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) en células humanas endoteliales. También activa la secreción de interleuquina 6 (IL-6) que induce la vía de señalización STAT3, lo que favorece el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos.^{1,63,69,70} Los efectos de visfatina son independientes de la actividad enzimática intracelular de NAMPT, ya que no dependen de la presencia de NAM, ni son reproducibles por NMN, ni son bloqueados por los inhibidores de NAMPT.^{1,71}

2.2. Otras enzimas NAD⁺-dependientes en cáncer

La sobreexpresión de NAMPT genera un aumento del contenido de NAD⁺ en las células tumorales, lo que potencia la actividad de las enzimas dependientes y consumidoras de NAD⁺ (SIRT6, PARPs y cADPRs). El papel oncogénico de NAMPT se puede explicar a través de activación de estas enzimas.

2.2.1. SIRT6 en cáncer

La familia de sirtuinas (SIRT1-7) desacetila varios sustratos, modulando la actividad de histonas, factores de transcripción, factores de reparación del ADN y proteínas de señalización, por lo que su papel como supresor tumoral u oncogén dependerá del tipo de cáncer.^{1,24,25,72} El miembro mejor caracterizado de esta familia es SIRT1, que está asociado con la longevidad. Hay evidencias que muestran que resveratrol, un potente antioxidante con efectos antienvjecimiento,

es capaz de incrementar los niveles de NAD⁺, induciendo la activación de SIRT1.^{1,24} Esta enzima también es activada por la restricción calórica, lo que reduce el riesgo a cáncer.^{1,2,16} La actividad de SIRT1 depende en gran medida de la proporción NAD⁺/NADH y puede ser inhibida por altos niveles de NAM^{1,30,73} o por DBC1, un inhibidor endógeno de SIRT1. Muchos estudios muestran que SIRT1 actúa como supresor tumoral. Se ha observado que SIRT1 desacetila e inhibe a la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1 α), uno de los factores que puede activar el efecto Warburg.^{1,30}

Sin embargo, se han encontrado altos niveles de SIRT1 en algunos tipos de cáncer, en los que NAMPT activa la expresión de SIRT1 mediante el aumento de los niveles de NAD⁺ y la disminución de NAM.^{1,74} Además de HIF-1 α , SIRT1 regula otros factores de transcripción importantes, como p53, c-MYC, FOXO3, E2F1, BAX y NF- κ B. Los efectos antitumorales más importantes de p53 son la parada del ciclo celular y la apoptosis. P53 puede también inhibir a G6PDH en la ruta de la pentosa fosfato. SIRT1 desacetila e inhibe p53, asegurando la producción de NADPH y ribosa-5-P lo que permite la supervivencia de la célula.^{1,17,75} C-MYC es un protooncogén que puede ser activado a través de la vía PI3K/Akt/mTOR. C-MYC regula la actividad de SIRT1 mediante la activación de la expresión de NAMPT y la inhibición de DBC1. A su vez, SIRT1 activa c-MYC por desacetilación cerrando así un bucle de retroalimentación positiva.^{1,31,74} Además, SIRT1 desacetila y activa FOXO3 que contribuye a la resistencia del estrés oxidativo.^{1,65,76} Todos estos datos corroboran el papel oncogénico de SIRT1, el cual depende de los niveles de NAD⁺ y la actividad de NAMPT.

Los otros miembros de la familia de sirtuinas SIRT2-7, de manera similar a SIRT1, también funcionan como oncogenes o supresores dependiendo del tumor.¹

2.2.2. PARPs en cáncer

PARP1, el miembro más estudiado de la familia PARPs, es conocido como el guardián de la integridad del ADN^{1,77}. PARP1 es activado en respuesta al daño en el ADN, pero su activación requiere de altos niveles de NAD⁺ en la célula, por lo que también depende de la actividad de NAMPT. Una excesiva activación de PARP1, debido por ejemplo a la acción de agentes genotóxicos, reduce dramáticamente los niveles de NAD⁺ y ATP, afectando a la actividad de las sirtuinas y la homeostasis celular. Si el daño en el ADN no es reparable, PARP1 promueve la apoptosis a través de la activación de p53 en condiciones normales. Dependiendo del grado de su activación, PARP1 puede actuar como oncogén o supresor tumoral.^{1,17,77}

La mayoría de los tumores tienen PARP1 sobreexpresado en respuesta al aumento del daño en el ADN agravado por el tratamiento de la radio y quimioterapia. De hecho, se han hallado altos niveles de PARP1 en cáncer de mama, ovario, pulmón y linfoma no Hodgkin.^{1,45,77} En cáncer de colon, se ha observado que PARP1 tiene una doble función oncogénica y supresora.^{1,78} Además del daño al ADN, PARP1 está involucrado en la proliferación, la regulación del ciclo celular, transcripción de genes, inflamación y destino de la célula. PARP1 regula a ERK, permitiendo la

activación de factores proangiogénicos y metastásicos. PARP1 también regula al factor de transcripción E2F1 que reduce la apoptosis en las células tumorales.^{1,79,80} Algunos inhibidores de PARP1, como por ejemplo olaparib, han sido estudiados y probados en ensayos clínicos ya que las células tumorales parecen ser más sensibles a estos inhibidores que las células sanas. Esta sensibilidad puede ser debida a que las células tumorales carecen de mecanismos alternativos de reparación de ADN. Sin embargo, se ha observado resistencia a los inhibidores de PARP1, por lo que se requieren más estudios para comprender este mecanismo.^{1,16}

2.2.3. cADPRs en cáncer

CD38, perteneciente a la familia de las ectoenzimas cADPRs, es el mayor consumidor de NAD⁺ en las células de los mamíferos. De hecho, se necesitan 100 moléculas de NAD⁺ para generar 1 molécula de cADPR, cuya función está involucrada en la movilización del calcio, regulación del ciclo celular y la señalización de la insulina.^{1,17,81} A medida que envejecemos, los niveles de NAD⁺ decaen pronunciadamente. Se ha comprobado que esta depleción es en parte debido al aumento de la expresión de CD38 que ocurre con la edad.^{1,82} CD38 es una proteína transmembrana cuyo dominio catalítico C-terminal tiene dos orientaciones opuestas y, por consiguiente, es capaz de consumir tanto NAD⁺ intracelular como extracelular.^{1,83} CD38 también consume NMN extracelular, generando NAM, el cual se convertirá en NAD⁺ a través de NAMPT y NMNAT una vez que cruce la membrana plasmática.^{1,82} CD38 ha sido identificado como un marcador de pronóstico negativo en leucemia linfocítica crónica y como un marcador de superficie en mieloma múltiple.^{1,16,84} Además, se ha visto que CD38 puede regular la sensibilidad de las células de cáncer pancreático al tratamiento del inhibidor de NAMPT FK866. Sin embargo, la relación entre NAMPT, NAD⁺ y CD38 todavía no está muy estudiada.^{1,76,85} CD73, otro componente de la familia cADPRs, cataliza la conversión de NMN extracelular a NR, el cual es necesario para ayudar a la biosíntesis de NAD⁺ intracelular.^{1,86} Además, CD73 actúa como una molécula de adhesión involucrada en la migración e invasión de las células tumorales.^{1,87}

2.2.4. NAPRT en cáncer

Existe controversia respecto al papel que juega NAPRT, la enzima limitante de la vía *the Preiss-Handler*, en cáncer. En cáncer de ovario, próstata y pancreático, se han hallado altos niveles de NAPRT al igual que de NAMPT;^{1,64,88,89} mientras que, en glioblastoma, neuroblastoma, condrosarcoma, leucemia, cáncer gástrico y de colón, se han hallado bajos niveles de NAPRT.^{1,64,90-93} Al comparar el patrón de expresión de los genes *NAPRT* y *NAMPT* en células tumorales humanas versus células no-tumorales, los investigadores encontraron una gran variabilidad en los niveles de ARNm y proteína de NAPRT en las células tumorales.^{1,94} Esta variabilidad depende de los niveles de expresión del tejido original. De modo que, los tumores que surgen de tejidos que expresan NAPRT tendrán una mayor amplificación de NAPRT y, por el contrario, los tumores que surgen de tejidos con baja expresión de NAPRT dependerán completamente de la actividad de NAMPT.^{1,89,93,95}

Los tumores NAPRT negativos tienen en común que presentan mutaciones en isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (IDH1/2) y proteína fosfatasa 1D (PPM1D). Los mutantes IDH1/2 utilizan NADPH para transformar α -cetoglutarato en D-2-hidroxiglutarato (D-2HG) que actúa como un oncometabolito. Se ha observado que D-2HG inhibe la expresión de NAPRT mediante hipermetilación de las islas CpG de su promotor.^{1,91,96,97} PPM1D es un oncogén que está involucrado en la respuesta al daño en el ADN y en los puntos de control del ciclo celular. Los mutantes PPM1D producen también hipermetilación de las islas CpG del promotor de NAPRT, inhibiendo de este modo su expresión.^{1,98} La pérdida de actividad de NAPRT y, consecuentemente, la inhibición de la vía *Preiss-Handler*, fuerza a las células tumorales a depender completamente de la ruta de rescate. Por lo que no es de extrañar encontrar NAMPT sobreexpresado en estos tumores, ya que sus células dependen de su actividad para satisfacer las demandas de NAD⁺.^{1,97} De hecho, los mutantes IDH1/2 y PPM1D parecen ser más sensibles al tratamiento con inhibidores de NAMPT, debido a la depleción total de NAD⁺.^{1,96-98}

En los tumores NAPRT positivos, las células tumorales tienen un suministro adecuado de NAD⁺, lo que permite la activación de las enzimas NAD⁺-dependientes, incluyendo PARP1 que es requerido para la protección del daño al ADN y del estrés oxidativo.^{1,99,100} La sobreexpresión de NAPRT puede contribuir a la resistencia a los inhibidores de NAMPT y al tratamiento de agentes alquilantes que provocan daño en el ADN. *In vivo*, se ha observado que los xenotransplantes son más resistentes al inhibidor FK866 cuando NAPRT está sobreexpresado, mientras que son más quimiosensibles cuando NAPRT está silenciado o inhibido.^{1,93,99} Se han identificado compuestos que inhiben NAPRT, como por ejemplo el ácido 2-hidroxinicotínico (2HNA). El inhibidor 2HNA es un análogo del ácido nicotínico que bloquea la enzima de manera competitiva.^{101,102} Se ha observado que este compuesto es capaz de potenciar el efecto citotóxico de FK866. Dependiendo del tipo de cáncer a tratar, bajos niveles de NAPRT puede ser un biomarcador predictivo del éxito de los tratamientos con inhibidores de NAMPT.^{1,93,99}

2.3. NAMPT como estrategia terapéutica

La inhibición de NAMPT produce una depleción del contenido de NAD⁺ en la célula, dando lugar a la inhibición de la síntesis de ATP. Este efecto puede causar una disminución de la proliferación de las células tumorales y la muerte celular, principalmente por apoptosis. Por tanto, NAMPT ha sido propuesto como una prometedora diana terapéutica y, en los últimos años, se han desarrollado varios inhibidores específicos. Algunos de ellos se encuentran actualmente en fase 1/2 en ensayos clínicos.^{1,32,45,63,76} **(Tabla 1)** Sin duda, el inhibidor más estudiado tanto *in vitro* como *in vivo* es FK866/APO866, siendo un inhibidor parcialmente no-competitivo que se une a la interfaz entre las dos subunidades del homodímero de NAMPT tapando parcialmente el sitio de unión de NAM.⁵⁸ La inhibición de NAMPT por FK866 puede aumentar los niveles de ROS y disminuir el consumo de glucosa, la producción de ATP, la síntesis de ácidos grasos y, por supuesto, los niveles de NAD⁺ lo que afecta negativamente a la actividad de todas las enzimas dependientes de NAD⁺, como SIRT6 y PARPs.^{1,76} El tratamiento de FK866 parece no afectar al

contenido NAD⁺ mitocondrial, por lo que, las células tumorales podrían ser más sensibles que las células no-tumorales.^{1,63} Además, la citotoxicidad de FK866 parece ser mayor en algunos tipos de tumores que expresan mayores niveles de NAMPT y que son relativamente más dependientes de la glucólisis.^{1,76,95} Desde 2007, FK866 se encuentra en fase 2 en ensayos clínicos (clinicaltrials.gov; NCT00435084, NCT00431912, NCT00432107). Para paliar los efectos adversos de FK866, se han probado a dosis subóptimas en combinación con otros fármacos, como por ejemplo sirtinol (inhibidor de SIRT1) y olaparib (inhibidor de PARP1).^{1,42,43,45} Otro inhibidor específico de NAMPT muy estudiado es GMX1778/CHS-828 que se administra por vía oral. El profármaco GMX1777 es un compuesto cianoguanidina que rápidamente se convierte en su forma activa GMX1778, el cual actúa tanto de inhibidor como de sustrato. GMX1778 fosforilado por NAMPT se acumula dentro de las células tumorales potenciando su efecto antitumoral.^{1,90} GMX1778 estuvo en fase 1 de ensayos clínicos de tumores sólidos (clinicaltrials.gov; NCT00003979), sin embargo, fue retirado debido a sus efectos tóxicos, principalmente trombocitopenia y síntomas gastrointestinales.¹⁰³

La siguiente generación de inhibidores presentaron mejores propiedades farmacológicas y una mayor especificidad contra su diana NAMPT. Entre ellos se encuentra GNE617 que es una molécula pequeña que se administra por vía oral y que ha resultado ser muy eficaz *in vivo*, siendo capaz de reducir el crecimiento de xenotransplantes deficientes en NAMPT.^{1,104,105} STF-31 es otro inhibidor que es capaz de atacar selectivamente a las células de carcinoma renal deficientes del gen supresor de tumores von Hippel-Lindau (VHL). Además de NAMPT, el compuesto STF-31 inhibe al transportador de glucosa GLUT1, este efecto inhibitorio adicional puede ser beneficioso para desencadenar la muerte celular en aquellos tumores con una alta tasa de consumo de glucosa.^{1,106,107} Sin embargo, STF-31, GNE617 y otros inhibidores de la segunda generación no han entrado en ensayos clínicos debido a su toxicidad, que incluye principalmente toxicidad hematopoyética, cardíaca y retiniana en roedores.^{1,108,109} La depleción total de NAD⁺ puede ser muy tóxica para las células no-tumorales, por lo que se ha considerado usar precursores de NAD⁺ (por ejemplo, ácido nicotínico) como coadyuvante.^{1,64,89} Varios estudios observaron que la coadministración de ácido nicotínico (NA) con algunos inhibidores de NAMPT (GMX1778, GNE617, LSN3154567 y STF-31) ayuda a prevenir los efectos tóxicos, no obstante, el efecto inhibitorio del fármaco se vio suprimido en tumores NAMPT positivos. Por consiguiente, se ha propuesto la coadministración de NA e inhibidores de NAMPT como una nueva estrategia terapéutica, pero sólo en tumores deficientes en NAMPT.^{1,90,107,110} Recientemente, un nuevo inhibidor de NAMPT, KPT-9274/ATG-019, ha entrado en la fase 1 de ensayos clínicos en pacientes con tumores sólidos avanzados o linfoma de Hodgkin (clinicaltrials.gov; NCT04281420, NCT02702492). Inicialmente, KPT-9274 fue descubierto como un inhibidor de la proteína PAK4, la cual está involucrada en varias rutas de señalización oncogénicas, como por ejemplo Erk, Akt, Ras/MAPK y Wnt/ β -catenina. Más tarde, se observó que KPT-9274 también era capaz de inhibir NAMPT, por lo que se ha propuesto como un fármaco candidato en tumores que expresen altos niveles de PAK4 y NAMPT.^{1,111-114}

Tabla 1. Inhibidores de NAMPT en ensayos clínicos. Tabla traducida de Navas y Carnero, 2021.¹

Inhibidor de NAMPT	Identificación en CLINICALTRIALS.GOV	Fecha inicio del estudio	Descripción	Resultados
KPT-9274/ ATG-019	NCT04281420	2020 (reclutando)	Fase 1. Estudio abierto de seguridad y tolerabilidad de ATG-019/KPT-9274, un inhibidor doble de PAK4 y NAMPT, en pacientes con tumores sólidos avanzados o linfoma de Hodgkin	-
	NCT02702492	2016 (reclutando)	Fase 1. Estudio abierto de seguridad y tolerabilidad de ATG-019/KPT-9274, un inhibidor doble de PAK4 y NAMPT, en pacientes con tumores sólidos avanzados o linfoma de Hodgkin	-
OT-82	NCT03921879	2019 (reclutando)	Fase 1: Seguridad y eficacia de OT-82 en pacientes con linfoma en recaída o refractario	-
APO866/ FK866	NCT00435084	2007 (completado)	Fase 1/2: Estudio para evaluar la seguridad y tolerabilidad de APO866 para el tratamiento de B-CLL refractaria	El tratamiento fue seguro y bien tolerado. DLT fue trombocitopenia. Se observó una disminución de los niveles de VEGF en suero 96 horas después del inicio del tratamiento en MTD. Sin respuesta tumoral objetiva. Sin embargo, 4 pacientes de 24 tenían enfermedad estable. Se observó una reducción del tamaño del 80%
	NCT00431912	2007 (completado)	Fase 2. Un estudio de APO866 para el tratamiento del linfoma cutáneo de células T.	
	NCT00432107	2006 (completado)	Fase 2. Un estudio para evaluar APO866 para el tratamiento del melanoma avanzado.	
CHS-828/ GMX1778	NCT00003979	1999 (retirado)	Fase 1. CHS-828 en el tratamiento de pacientes con tumores sólidos	Toxicidad crítica. Trombocitopenia y síntomas gastrointestinales
GNE617	-	-	-	-
STF-31	-	-	-	-
STF-118804	-	-	-	-
LSN3154567	-	-	-	-
CB-300919	-	-	-	-

DLT: toxicidad limitante de dosis; DMT: dosis máxima tolerada

<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

OT-82 es otro nuevo inhibidor de NAMPT que ha dado mejores resultados en neoplasias hematológicas que en tumores sólidos. OT-82 favorece la eficacia de otros fármacos como citarabina y dasatinib. Los estudios preclínicos en ratones y primates no-humanos indicaron que OT-82 fue bien tolerado y no mostró toxicidad cardíaca, neurológica ni retiniana. La resistencia a este fármaco se relacionó con una alta expresión de CD38 en células de leucemia linfocítica aguda.^{1,115,116} Actualmente, OT-82 se encuentra en fase 1 de ensayos clínicos para evaluar la seguridad y eficacia en pacientes con linfoma en recaída o refractario (clinicaltrials.gov; NCT03921879).

3. Células Madre del Cáncer (CSCs)

Los tumores son entidades altamente heterogéneas que están organizadas jerárquicamente en diferentes subgrupos de células tumorales. En la cúspide de esta jerarquía se encuentra una pequeña subpoblación de células capaces de autorrenovarse y diferenciarse en los distintos tipos de células que componen el tumor, son las llamadas células madre del cáncer (CSCs, del inglés *Cancer Stem Cells*). Al igual que las células madre normales, estas células tienen la capacidad de autorrenovación y diferenciación, pero lo hacen de manera descontrolada. Las CSCs no sólo son responsables de la iniciación y progreso tumoral, sino también de la metástasis y resistencia a las terapias. CSCs pueden originarse a partir de células madre normales o bien de células tumorales diferenciadas que son capaces de adquirir capacidades de célula madre a través de mecanismos de dediferenciación.^{1,117-120} El proceso de dediferenciación es similar al proceso de reprogramación de células somáticas en células pluripotentes inducidas (iPSCs), el cual se produce a través de la activación de algunos factores de transcripción, como los llamados factores de Yamanaka (OSKM) que incluyen OCT3/4, SOX2, KLF4 y c-MYC.^{1,121} La capacidad de interconversión entre ambos fenotipos, células diferenciadas y células madre/pluripotente, se conoce como plasticidad celular. El microambiente celular y algunas vías de señalización activan y regulan esta plasticidad celular. Algunas de las principales vías que regulan a las CSCs son: Notch, Hippo, SHH, PI3K, WNT y NF- κ B.^{117,120,122}

Tanto CsCs como iPSCs activan el efecto Warburg lo que induce el estado hipóxico necesario para el mantenimiento del fenotipo de célula madre. Por lo que el término glucólisis se usa para describir el fenotipo de célula madre o pluripotencia.^{1,117,123,124} Sin embargo, existe mucha controversia respecto al perfil metabólico típico de CSC. Por lo general, las CSCs se encuentran en fase G0, en quiescencia, estado en el que consumen oxígeno y dependen principalmente del metabolismo OXPHOS por el que obtienen una mayor respuesta antioxidante para compensar los altos niveles de ROS. Este lento metabolismo les permite sobrevivir a las terapias convencionales que principalmente atacan a células con alta tasa de proliferación. Como únicas supervivientes, las CSCs cambian su estado quiescente a un estado más proliferativo y glucolítico, regenerando así de nuevo el tumor.^{118,123,125} En los últimos años, las investigaciones se han centrado en buscar marcadores de superficie y firmas transcripcionales específicas del fenotipo CSC.

Las CSCs expresan antígenos específicos en su superficie al igual que las células madre normales. Estos marcadores de superficie que caracterizan a las CSCs dependen en gran medida del tipo de cáncer y los más conocidos son: CD44⁺CD24⁻ y ALDH en cáncer de mama, CD44⁺ y CD133⁺ en cáncer de colon y gástrico, CD34⁺CD38⁻ en leucemia, CD133⁺ en glioblastoma y sarcoma, CD13/CD45/CD90 en cáncer de hígado, etc.^{126,127} Sin embargo, la población CSC presenta un alto grado de heterogeneidad, habiendo diferentes subgrupos o categorías incluso en el mismo tumor.^{117,120,122} Actualmente, la búsqueda de nuevos marcadores y genes que nos ayuden a identificar las poblaciones CSCs resulta vital para encontrar nuevas estrategias terapéuticas más específicas.

NAMPT enriquece la población CSC del tumor principalmente a través de la ruta de rescate, permitiendo así un abastecimiento adecuado de NAD⁺.^{1,45} NAMPT y NAD⁺ están involucrados en los procesos de pluripotencia y desdiferenciación a CSC. Se ha observado que la suplementación de NAM puede evitar la senescencia y apoptosis y, en consecuencia, promover la reprogramación durante la generación de iPSC. Además, la reducción de los niveles de NAD⁺ en células madre humanas puede causar una diferenciación espontánea y apoptosis.^{1,128} NADH ha sido propuesto como un nuevo marcador de CSC. La autofluorescencia que emite esta molécula puede ser cuantificado por citometría e, interesantemente, la subpoblación NADH^{alta} ha sido relacionado con la subpoblación CD133⁺ de CSCs en glioblastoma.^{1,129,130} NAMPT no solo aumenta las propiedades tumorigénicas, sino que permite la adquisición de las propiedades y el fenotipo de CSCs a través de la activación de los factores OSKM, incluyendo SOX2, OCT4, KLF4 y NANOG.^{1,42,43} Además, NAMPT es capaz de regular la vía canónica de WNT. La inhibición de NAMPT aumenta la expresión de Axin, que induce la degradación de β -catenina, lo que produce una disminución del proceso de tumorigénesis. Se ha comprobado que la adición del producto enzimático de NAMPT, NMN, revierte la degradación de β -catenina.^{1,131} NAMPT también está involucrado en el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT), proceso por el que las células epiteliales pierden su polaridad y su adherencia para transformarse en células mesenquimales con capacidades migratorias e invasivas. NAMPT activa varios factores transcripcionales implicados en EMT, como son SNAI1, TWIST y FOXC2, favoreciendo la invasión y la metástasis del tumor.^{1,42,43}

4. Cáncer de Cabeza y Cuello (CCyC)

El cáncer de cabeza y cuello (CCyC) ocupa el puesto seis de los cánceres más comunes en el mundo. Los últimos datos indican que en 2020 hubo 931.931 nuevos casos de CCyC.¹³² CCyC es en realidad un conjunto de tumores que afectan a diferentes localizaciones anatómicas; incluyendo cavidad oral, lengua, faringe, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe, laringe y glándulas salivales. El 90% de estos tumores se originan en células escamosas, siendo este tipo el 90% de los CCyC totales.¹³³⁻¹³⁵ A pesar de esta gran heterogeneidad, CCyC se puede clasificar en dos grandes grupos dependiendo del origen: tumores positivos para el virus del papiloma humano (VPH) y tumores negativos para VPH, éstos últimos están relacionados con un consumo crónico de alcohol y/o tabaco.^{133,136,137} **(Figura 5)**

- Tumores CCyC VPH positivos:** VPH es un virus de ADN doble cadena que se transmite por contacto directo y por transmisión sexual. La infección del virus se ha correlacionado con un mayor riesgo en cáncer orofaríngeo, cervical y anogenital. De todos los subtipos del virus, el serotipo 16 es el responsable del 90% de los casos de CCyC. Tras el contagio, VPH16 infecta y se replica en los queratinocitos de la capa basal del epitelio escamoso, que son las células hospedadoras del virus.^{133,134} Las proteínas víricas E6 y E7 actúan como oncoproteínas, ya que son capaces de unirse y degradar a p53 y a pRb (retinoblastoma), respectivamente, por vía ubiquitina-proteosoma, produciendo una alteración del control del ciclo celular y aumentando el riesgo de desarrollar cáncer. Además, la inhibición de pRb conlleva un aumento de la proteína p16, la cual se utiliza como biomarcador en inmunohistología para el diagnóstico del cáncer orofaríngeo.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Los pacientes con tumores VPH positivos responden mejor al tratamiento, presentan una mayor supervivencia y tienen un menor riesgo de recurrencia que los pacientes con tumores VPH negativos.^{136,141} El desarrollo de vacunas contra el VPH (Gardasil, Cervarix) pueden ayudar a reducir la incidencia de estos tumores.¹³⁷
- Tumores CCyC VPH negativos:** Los principales factores de riesgo de estos tumores son el consumo de tabaco y alcohol. Otros posibles factores son la falta de limpieza bucal, la edad, el sexo (siendo este cáncer más frecuente en hombres que mujeres), dieta poco saludable y la exposición ocupacional a ciertos tóxicos.^{136,142} La exposición crónica a estos compuestos tóxicos origina mutaciones en el genoma y, consecuentemente, se produce una desregulación de procesos vitales para la célula como son el ciclo celular, proliferación y apoptosis, iniciando así el proceso de tumorigénesis.

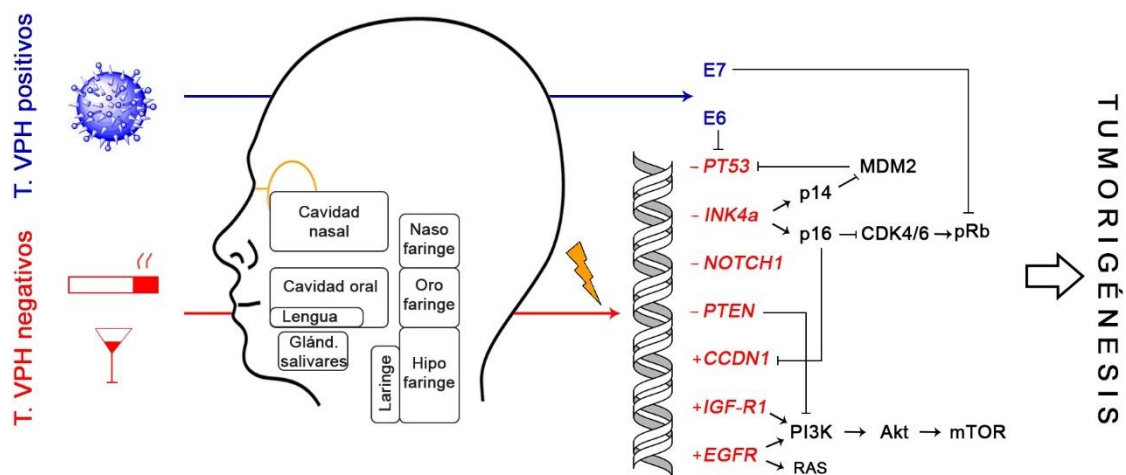


Figura 5. Biología molecular del Cáncer de Cabeza y Cuello. CCyC es en realidad un conjunto de tumores que afecta a varias localizaciones anatómicas representadas en la silueta. Desde el punto de vista epidemiológico, CCyC se divide en dos grandes grupos: tumores VPH (virus del papiloma humano) positivos y tumores VPH negativos que están correlacionados con el consumo de tabaco y alcohol. Estas sustancias provocan mutaciones en genes supresores de tumores (signo -) y en protooncogenes (signo +) contribuyendo al proceso de tumorigénesis.

En CCyC, son más frecuentes hallar mutaciones en los tumores VPH negativos que a su vez, es más común las mutaciones en genes supresores de tumores que en proto-oncogenes.^{137,143} El 40-60% de los pacientes con tumores VPH negativos presentan mutaciones de pérdida de función del gen *TP53*, siendo el consumo de tabaco la principal causa. P53 se encarga de frenar el ciclo celular si hay daños en el ADN y de activar la apoptosis cuando estos daños son irreparables. La función de p53 está regulada por p14ARF, que está codificada por el gen *INK4a* que se encuentra alterado en el 58% de los tumores de CCyC.^{135,137,144,145} El 40% de los pacientes presentan mutaciones en el gen supresor de tumores *PTEN*. La proteína PTEN regula negativamente a la vía oncogénica PI3K/Akt/mTOR, la cual se encuentra altamente activada en CCyC.^{137,143} El 11-19% de los pacientes tienen mutaciones en *NOTCH1*. Varios estudios sugieren que NOTCH1 actúa como supresor de tumores en CCyC, no obstante, su papel en este cáncer todavía no está claro.^{144,145}

Por otra parte, el proto-oncogén que se encuentra más frecuentemente mutado en CCyC es el receptor factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), el cual se encuentra sobreexpresado en más del 90% de los tumores. Cuando los ligandos se unen al receptor EGFR, se produce una activación de las rutas de señalización oncogénicas PI3K/Akt/mTOR y Ras que evitan la apoptosis y promueven la proliferación celular. Altos niveles de EGFR se han correlacionado con carcinomas poco diferenciados que se encuentran en estadios más avanzados, por lo que EGFR se ha propuesto como un factor de mal pronóstico en CCyC.^{135,143,144,146} En menor porcentaje (13%), el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*IGF-R1*) se encuentra sobreexpresado. Este receptor también activa la ruta de señalización PI3K/Akt/mTOR en cáncer. Ambas señalizaciones, EGFR y IGF-R1, están interconectadas, por lo que no es de extrañar que los tumores que sobreexpresan IGF-R1 contribuyan a la resistencia al tratamiento de inhibidores de EGFR observada en pacientes.^{143,147} El 30-50% de los pacientes tienen amplificado el gen que codifica a ciclina D1 (*CCND1*) que está implicado en la regulación del ciclo celular. La transcripción de CCND1 está estrechamente regulado por NF-κB, factor que se ha detectado activado en la mayoría de los pacientes con CCyC.^{143,145}

4.1 Tratamiento y CSCs en CCyC

El tratamiento elegido para tratar a los pacientes con CCyC depende de la localización anatómica, el estadio TNM y la resecabilidad del tumor. En general, los tumores de estadios tempranos (T1, T2) suelen solucionarse con cirugía o radioterapia localizada, mientras que los de estadio más avanzado (T3, T4) requieren combinaciones de cirugía, radiación y quimioterapia.^{135,137} La quimioterapia clásica para CCyC incluye principalmente los fármacos derivados del platino, (cisplatino, carboplatino, oxaliplatino), los taxanos (docetaxel, paclitaxel) y 5-fluorouracilo.¹³⁵ La alternativa a esta terapia tradicional es el uso de inhibidores contra EGFR, como por ejemplo Cetuximab. Sin embargo, a pesar de la altísima expresión de EGFR en CCyC, los inhibidores de EGFR como monoterapia no han dado los resultados esperados debido, posiblemente, a los diversos mecanismos oncogénicos que se activan independientemente de EGFR. Actualmente, Cetuximab y otros inhibidores se utilizan en combinación con radioterapia en

aquellos casos en los que los fármacos derivados del platino estén desaconsejados para el paciente.^{135,143,146} En los últimos años, se está investigando el uso de inhibidores de mTOR, por ejemplo Rapamicina, e inhibidores de IGF1R como coadyuvantes a la terapia clásica.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹

A pesar de los avances en el tratamiento para CCyC, la tasa de recurrencia del tumor y la tasa de mortalidad de los pacientes siguen siendo elevadas. Por lo que resulta vital la búsqueda de identificadores pronósticos y el desarrollo de nuevos tratamientos dirigidos específicamente contra la subpoblación CSC, la cual, como anteriormente se ha comentado, es responsable de la iniciación, progreso y metástasis del tumor, y de la resistencia a las terapias convencionales. Sin embargo, los tumores de CCyC son altamente heterogéneos ya que dependen en gran medida de la localización anatómica y del tejido original del que surgen. Debido a esta gran heterogeneidad, existe una gran controversia respecto a los marcadores que identifican a la subpoblación CSC en este tipo de cáncer.¹⁵⁰ El foco central de la discusión se centra en el uso o no de CD44 como marcador específico de CSC en CCyC. Son varios los estudios que defienden que las células CD44 positivas presentan propiedades tumorigénicas típicas de CSCs.¹⁵¹⁻¹⁵⁴ Además, CD44 puede ser un marcador de pronóstico dependiendo de la localización anatómica del tumor. Así, una alta expresión de CD44 se correlaciona con un peor pronóstico y supervivencia global en pacientes con tumores orofaríngeo, hipofaríngeo y laríngeo, pero no muestra ninguna correlación en tumores de la cavidad oral.¹⁵⁵ Por otro lado, otros estudios muestran que tanto el tejido sano como el tumoral de cabeza y cuello expresan CD44, y éste último lo hace en una proporción mayor del 10%. Por lo que el uso de CD44 como marcador de CSC no está del todo claro.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

Otro marcador muy discutido es CD133. Mientras que unos estudios observaron que las células CD133 positivas presentan propiedades de CSC,^{152,159} otros estudios no encontraron diferencias entre el comportamiento de las células CD133 positivas y negativas.^{151,160} CD24 es otro marcador de CSC que ha sido propuesto en CCyC. Las células CD24 positivas correlacionan con la sensibilidad a cisplatino y a otros fármacos, y son capaces de inducir angiogénesis en modelo de ratón en CCyC.^{151,161,162} En combinación con CD44, se ha observado que las células CD44⁺CD24⁺ tienen propiedades típicas de CSC en líneas celulares de CCyC.¹⁶³ Sin embargo, en carcinoma oral de células escamosas, son las células CD44⁺CD24⁻ las que tienen propiedades de CSC.^{154,164} Otro marcador propuesto es ALDH, solo o en combinación con CD44 y CD24. Las células de CCyC que expresan ALDH son altamente tumorigénicas y son capaces de restaurar la heterogeneidad del tumor. En preparaciones inmunohistoquímicas de muestras de pacientes, se ha observado que la tinción de ALDH correlaciona con el tamaño y agresividad del tumor.^{152,165,166} También se ha observado que las células CD44⁺CD24⁻ALDH⁺ son capaces de activar el proceso EMT en CCyC.^{151,167} CD117 (c-kit), el receptor del factor de célula madre (SCF), ha sido propuesto como un posible marcador que identifica CSC de tipo mesenquimal en CCyC, no obstante, su papel no está muy estudiado en este tipo de cáncer.^{150,158}

El alto grado de heterogeneidad que existe entre los distintos tipos de tumores de CCyC dificulta a la comunidad científica el poder establecer unos marcadores de CSC comunes para este tipo de cáncer. Más estudios son necesarios, así como la búsqueda de nuevos marcadores específicos de CSC en CCyC que sirvan de biomarcadores para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es el estudio de NAMPT como marcador tumoral y su implicación en tumorigénesis en cáncer de cabeza y cuello (CCyC). Para alcanzarlo, se definieron los siguientes objetivos concretos:

1. Búsqueda de marcadores específicos de células madre tumorales (CSCs) y validación de las propiedades tumorigénicas de estos marcadores en líneas celulares de CCyC.
2. Estudio del papel funcional de NAMPT en las propiedades tumorigénicas y en las propiedades relacionadas con el fenotipo de célula madre *in vitro* e *in vivo* en líneas celulares de CCyC.
3. Estudio de NAMPT como diana terapéutica *in vitro* e *in vivo* en líneas celulares de CCyC.
4. Estudio del papel de NAMPT en la biosíntesis de NAD⁺ y en el metabolismo tumoral en líneas celulares de CCyC.

MATERIALES Y METODOS

1. Técnicas de Biología Molecular

1.1. Reactivos biológicos utilizados

1.1.1. Plásmidos y cebadores

Los plásmidos utilizados en la tesis se describen en la **tabla 2**, y los cebadores en la **tabla 3**.

Tabla 2. Plásmidos utilizados

Nombre del plásmido	Inserto	Resistencia en bacterias	Resistencia en eucariotas	Origen
pBabe Ev	-	Ampicilina	Puromicina	A. Carnero
1sgRNA-NAMPT	CTTTACATAGGACGCCAGCA	Ampicilina	Puromicina	Addgene
pCMV-NAMPT-10his	<i>NAMPT1</i>	Ampicilina	Higromicina	
pMMLV-NAMPT-Myc-His-IRES-Puro	<i>NAMPT1</i>	Ampicilina	Puromicina	VectorBuilder
pBabe-Nampt2	<i>NAMPT2</i>	Ampicilina	Puromicina	A. Carnero
pBabe-Nampt3	<i>NAMPT3</i>	Ampicilina	Puromicina	A. Carnero
pBabe-Nampt4	<i>NAMPT4</i>	Ampicilina	Puromicina	A. Carnero
pEYFP-Mito	<i>Mito</i> (mitochondrial targeting sequence)	Kanamicina	Neomicina	Konstantine
psPAX2		Ampicilina	-	Addgene (#12260)
pM2DG		Ampicilina	-	Addgene (#12259)
pLenti-GFP	<i>GFP</i> (Green fluorescence protein)	Ampicilina	-	Addgene (#19732)
pGEM-T	-	Ampicilina	-	Promega

Tabla 3. Cebadores utilizados

Nombre del cebador	T _m (°C)	GC (%)	Secuencia (5'-3')	Producto PCR (pb)
Fw-pMMLV-NAMPT-Myc-His	55,1	40	GTTAATTAAGGATCCCAGTG	
Rw-pMMLV-NAMPT-Myc-His	59,9	53	CTTCGGCCAGTAACGTTAG	
Fw-1sgRNA-NAMPT	63,7	48	GCTCACAGACTTCTACAAATGG	600
Rw-1sgRNA-NAMPT	61,5	61	GTATACACAGGCCCGTG	
Fw-pCMV-NAMPT	69,3	44	AATTGGATCCAAGCTTGGTACCATG	1.139
Rw-pCMV-NAMPT2	69,7	33	CTACAATCTCGAGTTAATAAAAACACATACCTCTTGTAAAGG	
Rw-pCMV-NAMPT3	70	40	TGTGCTCGAGTCATTCTTTGTAGACATCTT	302
Rw-pCMV-NAMPT4	68,7	37	TGTGCTCGAGTCAATAAAATACTGTTTCCT	215
Fw-M13	58,7	53	GTA AAAACGACGGCCAGT	3.000
Rw-M13				
Fw-pBABE 5'	51	53	CTTTATCCAGCCCTCAC	200
Rw-pBABE-NAMPT	54	45	GTCTTCTTTTCACGGCATTTC	
Rw-pBABE 3'	56	48	ACCCTAACTGACACACATTCC	

Fw (*forward*): cebador iniciador hacia delante; Rw (*reverse*): cebador iniciador reverso; T_m: temperatura de *melting* o de fusión.

1.1.2. Antibióticos

Los antibióticos utilizados y sus concentraciones han sido: Ampicilina (AppliChem) a 100 µg/ml, Kanamicina (Sigma) a 50 µg/ml, Neomicina o G418 (Santa Cruz Biotechnology) a 0,4-1 mg/ml y Puromicina (Nucliber) a 0,5-1 µg/ml.

1.1.3. Cepas bacterianas

Para la amplificación de los plásmido se utilizó la cepa *E.coli* DH5α (Invitrogen). Para el clonaje de plásmidos se utilizó las cepa *JM109* (Promega) y *E.coli* StbL3™ (Invitrogen). Como medio de crecimiento se usó LB (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl pH 7).

1.2. Transformación de células quimiocompetentes

Para la transformación de células quimiocompetentes se mezclaron 50 µl de bacterias y la cantidad apropiada de ADN. Dicha mezcla, primero, se incubó en hielo durante 30 minutos, seguido de un choque térmico de 30 segundos a 42°C y terminando con una incubación de 2 minutos más en hielo. Posteriormente, se añadió 1 ml de medio LB broth y se mantuvo en agitación durante 1 hora a 37°C. Luego, se centrifugó 2 minutos a 8.000 rpm, se resuspendió en 100 µL de medio LB, se sembró en placas de LB agar con el antibiótico de selección apropiado y se dejó crecer a 37°C no más de 16 horas.

1.3. Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se puede realizar a partir de pequeños o grandes volúmenes de cultivos de bacterias, según la cantidad que necesitemos. En ambos casos utilizamos el kit *PureLink® HiPure Plasmid DNA Maxiprep* (Thermo Fisher Scientific) para medios o grandes volúmenes y el kit *Isolate II Plasmid Minikit* (BIOLINE) para pequeños volúmenes, siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo se basa en ambos casos en una lisis alcalina de las bacterias transformadas procedentes de una colonia aislada que previamente se ha cultivado en medio LB con antibiótico de selección. Tras la lisis bacteriana, el ADN plasmídico se precipita y se purifica en una columna de intercambio iónico en condiciones apropiadas de pH y baja concentración de sales. Los contaminantes se eliminan en un lavado con tampón de fuerza iónica intermedia y el ADN se eluye en un tampón de alta concentración de sales. Por último, el ADN se precipita con isopropanol para concentrarlo y eliminar sales. Todas las centrifugaciones de este protocolo se realizaron en una centrifuga *Evolution RC6 plus* a una velocidad de 12.000 G.

1.4. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó mediante el kit *High Pure PCR Template Preparation kit* (Rocher) siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo se basa en el lisado de la muestra con un tampón de lisis y proteinasa K en presencia de guanidina-HCl que inactiva todas las nucleasas a 70°C. Posteriormente, se añade isopropanol y se pasa la muestra a una columna de intercambio iónico. Luego, la columna se lava dos veces con un tampón de lavado para eliminar los contaminantes celulares y, finalmente, el ADN se eluye con agua libre de nucleasa.

1.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN por PCR se realizó utilizando el ADN polimerasa MyTaq (BIOLINE). Para ello, se mezcló 10 µl de tampón de reacción 5X MyTaq, 2 µl de cada cebador 10 µM, 1 µl de ADN polimerasa MyTaq, 200 ng de ADN genómico y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 40 µl. La reacción de PCR se realizó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 1 minutos a 95°C, 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a la temperatura de annealing de los cebadores usados y 10 segundos a 72°C y una extensión final de 10 segundos a 72°C.

1.6. Purificación del ADN a partir de un gel de agarosa o producto de PCR

El resultado de la PCR se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Biotools) al 1% con solución TAE 1X (Tris-acetato de 0,04 M, EDTA 1mM pH 8) y bromuro de etidio (BioRad). Las bandas obtenidas tras la PCR y separadas se cortaron del gel de agarosa con un bisturí, visualizándolo a través de un transiluminador de luz ultravioleta.

La extracción del ADN, tanto a partir de las bandas del gel de agarosa como directamente a partir del producto de PCR, se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante de los kits de Qiagen: *QIAquick Gel Extraction* (en el caso del gel) y *QIAquick PCR Purification kit* (en el caso de la PCR). Ambos protocolos se basan en la unión del ADN a una membrana de sílice en presencia de una alta concentración de sales. Posteriormente, se lava la columna con soluciones de lavado y, finalmente, el ADN se eluye en agua destilada libre de nucleasas.

1.7. Secuenciación

Las muestras se secuenciaron en el servicio Genómica y Secuenciación del IBiS. Para ello, se utilizaron los cebadores correspondientes al plásmido. La reacción de secuenciación se realizó con el kit *BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix* en un termociclador Veriti (Applied Biosystems). Para purificar la reacción de secuenciación se utilizaron placas de purificación *PERFORMA® V3 96-Well Short Plate* (EdgeBio) y la secuenciación se realizó en un secuenciador 3500 automático de 8 capilares (Applied Biosystems). Luego, las muestras se analizaron mediante el software Chromas Lite y SnapGene.

1.8. Clonación de plásmidos

1.8.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del plásmido donador

Para amplificar la secuencia de ADN de las variantes 3 y 4 de *NAMPT* del plásmido donador pCMV-NAMPT, se realizó una PCR utilizando el ADN polimerasa MyTaq (protocolo descrito en el apartado 1.5).

Para realizar la clonación de la variante 2, fue necesario hacer una clonación TA con el plásmido pGEM-T como paso intermedio. Al ser un fragmento más largo, la PCR de la variante 2 se realizó utilizando la enzima ADN polimerasa Q5 de alta-fidelidad (BioLabs). Para ello, se mezcló 10 µl de tampón de reacción 10X, 2,5 µl de cada cebador 10 µM, 0,5 µl de ADN polimerasa Q5, 50 ng de

ADN genómico y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 50 μ l. La reacción de PCR se realizó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 30 segundos a 95°C, 35 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de annealing de los cebadores usados y 1 minuto a 72°C y una extensión final de 2 minutos a 72°C. Debido a la actividad exonucleasa de la polimerasa Q5, el producto de la PCR que se generó tenía extremos romos. Por lo tanto, fue necesaria una segunda PCR de 20 minutos a 72°C, esta vez utilizando polimerasa MyTaq, para sintetizar cola-poli A en los extremos haciéndolos cohesivos.

1.8.2. Clonación TA

Una vez que variante 2 de *NAMPT* fue amplificada con cola-poli A en los extremos, se realizó la ligación de este inserto y el plásmido pGEM-T. Éste plásmido comercial es un vector cuyo sitio de clonación múltiple se encuentra dentro de la secuencia del gen LacZ y que se encuentra abierto con cola-poli T, haciendo posible este tipo de clonación TA. La ligación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se mezcló 5 μ l de tampón de reacción 2X, 1 μ l de pGEM-T, el volumen necesario de inserto para que la relación molar inserto:vector sea 3:1, 1 μ l de la enzima ADN ligasa T4 y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 10 μ l. La mezcla se incubó toda la noche a 16°C.

Al día siguiente, el producto de ligación se transformó en las bacterias *JM109* (apartado 1.2) en placas LB/ampicilina/IPTG/X-Gal. Se pudieron distinguir colonias azules, correspondientes a aquellas colonias con el plásmido que llevaba el gen β -galactosidasa funcional y que, por inducción con IPTG, produce dicha enzima que hidroliza al X-Gal generando un producto azul; y colonias blancas, correspondientes a aquellas colonias que contenían plásmidos con el gen de la β -galactosidasa no funcional debido a la inserción de nuestro inserto de ADN. El ADN de colonias blancas aisladas se extrajo y se purificó (apartado 1.3).

1.8.3. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Los productos de PCR (*NAMPT* 3 y 4) y el plásmido pGEM-T-NAMPT2 se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y XhoI (BioLabs), y el plásmido destino, pBABE, con las enzimas BamHI y Sall (BioLabs). Las digestiones se realizaron según el protocolo del fabricante, para ello, se mezclaron 5 μ l de tampón de restricción 10X, 1 μ l de la enzima de restricción, 1 μ g de ADN y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 50 μ l. La mezcla se incubó 1 hora a 37°C. Posteriormente, en el caso de la enzima XhoI, fue necesaria una incubación de 20 minutos a 65°C para inactivarla. El resultado de la digestión se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. En el caso del plásmido pBABE se obtuvo una banda de 5.000 bp, para los fragmentos *NAMPT* 3 y 4 se obtuvieron una banda de 302 y 215 bp respectivamente y para el plásmido pGEM-T-NAMPT2 se observaron dos bandas: una de 3.000 bp correspondiente al vector y otra de 1.139 bp del inserto. Las bandas de interés se purificaron a partir del gel (apartado 1.6).

1.8.4. Ligación

Para realizar la ligación de los insertos (*NAMPT* 2, 3 y 4) con el vector destino pBABE se siguió el siguiente protocolo: se mezclaron las dos moléculas de ADN (inserto y vector) en una relación 3:1, 2 µl del tampón de ligación 10X, 1 µl de la enzima ADN ligasa T4 (BioLabs) y agua libre de nucleasa hasta un volumen final de 20 µl. La mezcla se incubó toda la noche a 16°C. Al día siguiente, el producto de ligación se transformó en las bacterias *E.coli DH5α* (apartado 1.2). El ADN de colonias aisladas se extrajo y se purificó (apartado 1.3). Para comprobar si los plásmidos se habían clonado correctamente, se amplificó un fragmento de 200 pb mediante PCR (apartado 1.5) y se comprobó por electroforesis en gel de agarosa (apartados 1.6). Además, los plásmidos se secuenciaron en el servicio Genómica y Secuenciación del IBiS (apartado 1.7)

2. Cultivos Celulares

2.1. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas se describen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Líneas celulares utilizadas

	Nombre	Especie	Tipo celular	Medio de cultivo	Crecimiento	Origen
CCyC	RPMI-2650	Humana	Carcinoma de células escamosas nasal	DMEM	Adherente	ATCC
	Detroit-562	Humana	Carcinoma de faringe	DMEM	Adherente	ATCC
	HEK293T	Humana	Tejido renal embrionario	DMEM	Adherente	ATCC

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo.

2.2. Cultivo y conservación de las líneas celulares

Las líneas celulares comerciales se cultivaron en medio DMEM con glutamina estable (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco/Life technologies), 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma), 1% de mezcla de penicilina (40 µg/ml, Sigma) y estreptomina (40 µg/ml, Sigma) y 1% de fungizona (1 µg/ml anfotericina B, Sigma). Las células se crecieron en placas de 10 centímetros (Falcon) y se subcultivaron 1:10 en el caso de RPMI-2650, o 1:8 en el caso de Detroit-562 cada 3-5 días mediante tratamiento con tripsina/EDTA 0,50% (Life technologies). Las células fueron testadas regularmente para detectar contaminaciones por micoplasma.

2.3. Transfección de células

2.3.1. Transfección mediante el kit comercial TransIT-X2 (Mirus)

El reactivo de transfección TransIT-X2 es un sistema polimérico no liposomal que recubre el ADN favoreciendo su transporte al interior celular. Siguiendo el protocolo de transfección por el fabricante, se mezclaron 2,5 µg de ADN del plásmido y 250 µl de medio. A continuación, se añadieron 7,5 µl de reactivo TransIT-X2, se resuspendió bien con la pipeta y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió la mezcla gota a gota a las células de interés que el día anterior habían sido sembradas en placas de 6 pocillos (Nunc) a una dilución tal que

permitiera tener una confluencia del 80% en el momento de la transfección. Una vez transfectadas, las células se incubaron 48 horas a 37°C antes de empezar el proceso de selección.

2.3.2. Transfección con polietilenimina (PEI)

La polietilenimina (PEI) es un polímero estable catiónico que condensa el ADN en partículas cargadas positivamente que se unen a superficies aniónicas, de forma que el complejo PEI-ADN es endocitado por las células y el ADN liberado en el citoplasma. Para realizar la transfección, se mezclaron 10 µg de ADN del plásmido con 80 µl de PEI (1mg/ml y pH 7, Polysciences) en 1 ml de medio. Se resuspendió bien con la pipeta y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió la mezcla gota a gota a las células de interés que el día anterior habían sido sembradas en placas de 10 cm a una dilución tal que permitiera tener una confluencia del 60-80% en el momento de la transfección. Una vez transfectadas, las células se incubaron 24-48 horas a 37°C dependiendo de la línea antes de empezar el proceso de selección.

2.3.3. Selección de células transfectadas

Tras 48 horas de incubación se tripsinizaron las células para sembrarlas a baja densidad en placas de 10 cm y se añadió el antibiótico de selección apropiado. La selección se mantuvo el tiempo necesario para que las células sin transfectar murieran y las células transfectadas formasen clones aislados. Posteriormente, se pasaron los clones a monocapa obteniendo poblaciones celulares con la mezcla de todos los clones obtenidos en una placa. Una vez que se finalizó la selección, la concentración del antibiótico se pudo reducir a la mitad para el mantenimiento de las células transfectadas. Para la selección con puromicina, se utilizó una concentración de 1 µg/ml en la línea celular RPMI-2650 y de 0,25-0,5 µg/ml en la línea Detroit-562. En el caso de la droga G418, se utilizó una concentración de 500 µg/µl en RPMI y de 700 µg/µl en Detroit.

2.4. Técnica CRISPR-Cas9

Se utilizó el sistema CRISPR-Cas9 (del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – associated protein 9*) para la generación de un modelo *knock-down* (o reducción de expresión) del gen *NAMPT*. Para ello, se utilizó un plásmido, previamente diseñado en el laboratorio, que contenía un sgARN (ARN de guía única quimérico) con la secuencia CTTTACATAGGACGCCAGCA dirigida al exón 10, de forma que solo afectara a la variante 1 de *NAMPT*.

2.4.1. Infección lentiviral

El primer paso fue infectar las células de interés con el plásmido sgRNA-*NAMPT* siguiendo los pasos que se describen a continuación. Primero se realizó una cotransfección del plásmido de interés y plásmidos que permite la producción de los lentivirus. Para ello, se mezclaron 10 µg de ADN del plásmido, 8 µg del plásmido psPAX2 (que contiene los genes virales: *GAG* y *POL*) y 2 µg del plásmido pM2D-G (que contiene el gen viral *VSV-G*) y 80 µl del agente de transfección PEI en 1 ml de medio. Se resuspendió bien con la pipeta y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Como control de eficacia se preparó una mezcla con el plásmido GPF. Luego, se añadió la mezcla

gota a gota a las células HEK293T que se sembraron el día anterior de manera que estuvieran a una confluencia del 70-80% en el momento de la transfección. Tras 24 horas de incubación a 37°C, las células transfectadas con GFP se comprobó la producción de la proteína mirándolas en un microscopio de fluorescencia. Al resto de las células se le cambió el medio y se incubaron otras 24 horas a 37 grados para la producción de lentivirus. Al día siguiente, el sobrenadante que contenía los virus se pasó por un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm (VWR) y se realizó una dilución 1:4 con medio fresco suplementado con 8 µg/ml de polibreno (Sigma), un polication que reduce la repulsión electrostática entre el virus y la membrana celular favoreciendo la unión de los mismos. Por último, se infectaron las células receptoras con el sobrenadante lentiviral preparado. Las células infectadas se incubaron durante 4-6 horas a 37°C. Posteriormente, se les cambiaron el medio a las células eliminándoles los virus y se mantuvieron 24 horas a 37°C antes de empezar el proceso de selección que se detalla en el apartado 2.3.3.

2.4.2. Generación y selección de los clones de CRISPRs

Una vez que las células estuvieron seleccionadas con puromicina, se aislaron para que pudieran formar clones independientes. Para ello, las células se resuspendieron en PBS con 2% FBS y 5 mM EDTA, y se pasaron por el citómetro de flujo FACS Jazz (BD Biosciences) para sembrar una célula por pocillo en placas de 96 que contenía medio con puromicina. Aproximadamente un mes más tarde, algunas células habían crecido y formado clones procedentes de una sola célula. Cada clon se dividió en dos pocillos en una placa de 6 pocillos y se dejaron crecer. Una vez que llenaron ambos pocillos, uno se congeló a -80°C y el otro sirvió para la extracción de proteínas (descrito en el apartado 6.2). Se analizó y cuantificó la expresión de la proteína NAMPT de cada clon de CRISPR comparándola con la expresión de la línea celular parental mediante la técnica *Western-blot* (detallado en el apartado 6.3). Basándonos en el resultado de los *Western-blot*, se eligió los dos clones que tuvieran menor expresión de la proteína respecto al control en cada línea celular para secuenciarlos y estudiar su fenotipo celular.

2.4.3. Secuenciación de los clones de CRISPRs

Para secuenciar los clones de CRISPRs elegidos, se extrajo el ADN genómico (apartado 1.4) y se realizó una PCR usando la enzima ADN polimerasa MyTaq (apartado 1.5) para amplificar un fragmento de 600 bp de ADN que contenía la secuencia diana del sgRNA de *NAMPT*. El resultado de la PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (apartado 1.6). Tras la comprobación, el producto de PCR se purificó (apartado 1.6) y se mandó a secuenciar al servicio de Genómica y Secuenciación del IBiS (apartado 1.7). El análisis consistió en comparar las secuencias de los CRISPRs y el control parental.

3. Ensayos Celulares

3.1. Ensayos de metabolismo

3.1.1. Precursores e inhibidores de NAD⁺

Las concentraciones de los distintos precursores e inhibidores de NAD⁺ que se han utilizado en esta tesis son los siguientes: 500 μ M de nicotinamida mononucleótida (NMN, sintetizado por la empresa GeneHarbour Biotechnologies en Hong Kong), 500 μ M de ácido nicotínico (NA, Sigma), 5 mM de nicotinamida (NAM, Sigma), 100 μ M de triptófano (Trp, Sigma), 10 nM de FK866 (Sapphire Bioscience), 10nM de GNE617 (Selleckchem), 10nM de GMX1778 (Selleckchem), 1mM ácido 2-hidroxinicotínico (2HNA, Sigma).

3.1.2. Ensayo de ciclación de NAD⁺

El protocolo original del artículo de Zhu et al., 2012¹⁶⁸ y readaptado por el grupo del Dr. Lindsay Wu (University of New south Wales, NSW, Australia) está basado en una serie de reacciones enzimáticas acopladas que permiten cuantificar de forma colorimétrica la cantidad de NAD⁺ y NAD total de las células. De modo que, en presencia de ADH (alcohol deshidrogenasa), una enzima dependiente de NAD⁺, el etanol se oxida a acetaldehído aumentando la concentración de NADH. Una vez formado, la forma reducida NADH se vuelve a oxidar a NAD⁺ dona electrones a una reacción acoplada PMS (fenazina metosulfato) / MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) dando lugar a la forma reducida de MTT cuyo color morado se puede cuantificar mediante su absorbancia a 570 nm, que va a ser proporcional a la cantidad de NAD de la muestra. Para extraer las muestras, se lavaron las células dos veces con PBS frío y se añadió un volumen adecuado de la solución de extracción de NAD⁺ compuesto por: nicotinamida 10 mM (Sigma), Tris-HCl 50 mM pH 8,5, Triton X-100 al 0,1% (Sigma). Con ayuda de un rascador, se recogieron las células en tubos de 1,5 ml y se sonicaron 5 segundos al 30% de potencia. Los restos de debris celular se eliminaron por centrifugación durante 5 minutos a 7.000 g a 4°C. Para evitar el agotamiento de NAD/NADH de las células, el sobrenadante se concentró y se desproteinizó mediante unos filtros (Amicon Ultra 0.5 Centrifugar Filter Unit, Sigma), reservando una pequeña cantidad del sobrenadante para cuantificar las proteínas totales de la muestra (detallado en el apartado 6.2). Centrifugar los filtros con las muestras durante 20 minutos a 14.000 g a 4°C.

A continuación, se dividió el filtrado en dos tubos: uno destinado a cuantificar la cantidad total de NAD y otro destinado a cuantificar sólo NAD⁺. Mientras que los primeros tubos se mantuvieron en hielo, los segundos tubos se le añadieron 6 μ l de HCl 0,1 M y se calentaron durante 30 minutos a 65°C en el termobloque para degradar y eliminar el NADH de las muestras. Posteriormente, se añadió 25 μ l por pocillo de cada tubo en una placa de 96 pocillos. Como curva patrón se preparó unas concentraciones de 0-50 μ M de NAD⁺(Sigma). Una vez preparada la placa, a cada pocillo se añadió 100 μ l de una solución compuesta por ADH (Sigma), etanol y tris-HCl, y se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se añadió 50 μ l de una mezcla de PMS (Sigma) y MTT

(Sigma) a cada pocillo. Y se procedió a realizar lecturas de absorbancia a 570 nm cada 5 minutos durante 30 minutos. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/mg}$ de proteína.

3.1.3. Ensayos en condiciones limitantes de nutrientes

Se realizaron ensayos de proliferación y clonabilidad utilizando los siguientes medios: DMEM (Corning) con alta glucosa (4,5g/l) con Glutamax y sin piruvato como control; DMEM con baja glucosa (1g/l) con glutamina y sin piruvato; DMEM sin glucosa, con glutamina y sin piruvato; DMEM sin glucosa, sin glutamina y sin piruvato; DMEM sin niacinamida, con glutamina y sin piruvato; DMEM control suplementado con 500 μM de ácido nicotínico (NA, Sigma) y DMEM normal suplementado con el inhibidor de NA.

El ensayo de proliferación (detallado en el apartado 3.2.1) se realizó sembrando 5.000 células de la línea RPMI-2650 o 10.000 células de Detroit-562 en placas de 6 pocillos por duplicado en medio DMEM control. A las 24 horas (día 0) se fijaron las células del primer punto con glutaraldehído 0,5% (Sigma) y se cambió el medio al resto de las placas con las diferentes condiciones metabólicas. Cada 2 o 3 días se cambiaron el medio de las placas. El ensayo de clonabilidad (detallado en el apartado 3.2.2) se realizó sembrando 200 células de RPMI-2650 o 600 células de Detroit-562 en placas de 6 pocillos por duplicado en medio DMEM control. A las 24 horas se cambió el medio a todas las placas con las diferentes condiciones metabólicas.

3.2. Ensayos funcionales de tumorigénesis

3.2.1. Ensayo de proliferación

Para estudiar la proliferación, se sembraron 5.000 células de la línea RPMI-2650 o 10.000 células de Detroit-562 en placas de 6 pocillos por triplicado, poniendo una placa por cada punto de la curva de crecimiento. A las 24 horas (día 0) se fijaron las células del primer punto con glutaraldehído 0,5% (Sigma) y, a partir de ahí, cada 24-48 horas se fijaron el resto de placas durante 11 días. El medio de las células en cultivo se cambió a los 7 días. Una vez fijadas todas las placas, se tiñeron con cristal violeta al 0,5% (Sigma). Después de lavar y secar todas las placas, el cristal violeta se disolvió con ácido acético al 20% (AppliChem) y se cuantificó el número relativo de células midiendo la absorbancia del cristal violeta a 595 nm mediante un lector de absorbancias (BioRad). Los valores se representaron refiriéndolos al día 0.

3.2.2. Ensayo de clonabilidad

Para estudiar la capacidad de formar clones individuales, se sembraron 1.000 células de la línea RPMI-2650 o 5.000 células de Detroit-562 en placas de 10 cm por triplicado. A los 10-15 días, las células se fijaron con glutaraldehído 0,5% y se tiñeron con cristal violeta al 0,5%. Después de lavar y secar, se cuantificó el número de clones que habían formado.

3.2.3. Análisis y clasificación de los tipos de clones

Los clones formados en el ensayo de clonabilidad fueron analizados y clasificados. Para ello, se observó la morfología de cada clon y se tomaron fotos de cada tipo en un microscopio

invertido (Olympus IX-71). Los tipos de clones se clasificaron siguiendo el siguiente criterio: holoclón, procedente de células madre del cáncer dando lugar a un clon muy compacto y redondeado; paraclón, formado por células diferenciadas separadas entre sí; y meroclón, compuesto por células con características intermedias entre el holoclón y el paraclón.¹⁶⁹⁻¹⁷² Debido a la dificultad de distinguir los tipos de clon en la línea celular Detroit-562, se decidió solamente clasificarlos en holoclonos y paraclones.

3.2.4. Ensayo de formación de tumoresferas

Para estudiar la capacidad de las células de formar tumoresferas se sembraron 20.000 células de la línea Detroit-562 por triplicado en placas de 24 pocillos de baja adherencia (Corning). Para ello, las células se resuspendieron en 1 ml de medio MammoCult completo (Stem cell technologies) compuesto por medio basal MammoCult, 10% de suplemento de proliferación MammoCult, 4 µg/ml de heparina, 0,58 µg/ml de hidrocortisona, 5% de una mezcla de penicilina y estreptomina que contiene 10.000 unidades de penicilina y 10 mg de estreptomina/ml (Sigma) y 5% de fungizona a 250 µg/ml (anfotericina B, Sigma). Las células se cultivaron durante 72 horas, se tomaron fotos de las tumoresferas formadas en un microscopio invertido (Olympus IX-71) y se cuantificó el número total y el tamaño de las mismas.

En el caso de la línea celular RPMI-2650, no se pudo realizar este ensayo debido a que las células formaban agregados en vez de tumoresferas. Para comprobar la capacidad de formación de tumoresferas en esta línea se realizó el ensayo a partir de células aisladas cuyo protocolo se describe en el siguiente apartado.

3.2.5. Ensayo de formación de tumoresferas a partir de una célula aislada

Para estudiar la capacidad de las células RPMI-2650 de formar tumoresferas a partir de una célula aislada, se resuspendieron en medio de citometría (PBS con 2% FBS y 5 mM EDTA). A continuación, la suspensión celular se separó célula a célula mediante el citómetro de flujo FACS Jazz (BD Biosciences). De esta forma, cada célula se sembró individualmente en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de baja adherencia (Corning) que contenía 100 µl de medio MammoCult (explicado en el anterior apartado). Las células se cultivaron durante 30 días, se observaron al microscopio invertido (Olympus IX-71) y se cuantificó el número y el tamaño de las tumoresferas formadas a partir de una sola célula.

Este ensayo no se pudo realizar en la línea celular Detroit-562 ya que estas células presentaron dificultades para crecer de formar aislada.

3.2.6. Ensayo de migración de la Cámara de Boyden

Para estudiar la capacidad de migración de las células RPMI-2650, se realizó el ensayo de la Cámara de Boyden utilizando el suero fetal bovino (FBS, Gibco/Life technologies) como el agente quimioatrayente del medio celular. Para realizar dicho ensayo, previamente las células se pusieron en medio sin FBS. Al día siguiente, se sembraron 40.000 células en una cámara de 8µm (Transwell)

suspendidas en 300 μ l de medio sin FBS. La cámara con las células se colocó en un pocillo de una placa de 24 pocillos con 500 μ l de medio con FBS. A las 24 horas, las células se fijaron con glutaraldehído 0,5% (Sigma) y se tiñeron con cristal violeta 0,5% (Sigma). Con un bastoncillo se limpió la membrana interna de la cámara para evitar que las células que no migraron se tiñeran. Se realizaron 5 fotos de las células migratorias por el microscopio en objetivo X20, posteriormente se contaron el número de fotos de cada foto y se calculó la media.

3.2.7. Ensayo de citotoxicidad

Para realizar el ensayo de citotoxicidad, se sembraron 8.000 células de RPMI-2650 o 16.000 células de Detroit-562 en una placa de 96 pocillos. Al día siguiente, las células fueron tratadas con diferentes compuestos a 11 diferentes concentraciones. Los compuestos que se utilizaron fueron los siguientes: FK866 a una concentración de 10-0 μ M (dilución 1:3), GNE617 a 25-0 μ M (1:3), GMX1778 a 25-0 μ M (dilución 1:3), cisplatino a 33,3-0 μ M (dilución 1:1,5), docetaxel a 33,3-0 μ M (dilución 1:3), cisplatino a 33,3-0 μ M (dilución 1:1,5), 1mM ácido 2-hidroxinicotínico (2HNA). Luego, tras 96 horas de tratamiento, las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta 0,5% (Sigma). La viabilidad celular fue medida mediante el análisis de la absorbancia a 595 nm al disolver el cristal violeta con el ácido acético al 20% (AppliChem). El IC50 fue calculado como la concentración en la que sobreviven el 50% de las células comparándolo con el día 0 como control.

3.2.8. Ensayo de competición

Para estudiar la capacidad de dos tipos celulares de competir entre sí en las mismas condiciones, realizamos un ensayo de competición. Las células con la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT fueron transfectadas con el vector EYFP-Mito que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). Una vez seleccionadas por el antibiótico, se separaron mediante el citómetro de flujo FACS Jazz (BD Biosciences) para identificar completamente las células que expresan la proteína fluorescente. A continuación, se sembraron en una misma placa 500.000 células transfectadas con ésta proteína y 500.000 células transfectadas con el vector vacío. También se sembraron 1 millón de células de cada tipo en placas diferentes como controles de que la expresión de la proteína fluorescente no decae con el tiempo. Al día siguiente, se tripsinizaron las células y se resuspendieron en 1 ml de PBS con 2% FBS y 5mM EDTA para analizarlas con el citómetro de flujo analítico Canto II (BD Biosciences) y comprobar que el día 0 se habían sembrado 50% de cada tipo de célula. Se subcultivaron durante 1 mes y se volvieron a analizar para comprobar si algún tipo celular había crecido más que el otro. También se comprobó con las placas controles que la expresión de la proteína fluorescente no decaía con el tiempo.

3.3. Análisis de marcadores por citometría de flujo

Para buscar marcadores de superficie relacionados con la población célula madre del cáncer, se empleó la técnica de citometría de flujo en sus dos modalidades: FACS (Fluorescence-activated cell sorting) y Separación celular (cell sorting).

3.3.1. Anticuerpos de citometría

Los anticuerpos empleados para citometría de flujo se describen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Referencia	Fluoróforo conjugado	Volumen para marcar en FACS por 10 ⁶ células	Volumen para marcar en SORTER por 10 ⁷ células
CD10	130-124-215	FITC	2 µl	5 µl
CD184	130-117-690	PE	2 µl	5 µl
CD19	130-113-642	APC	2 µl	5 µl
CD133	130-113-108	PE	2 µl	5 µl
CD166	130-118-349	PE	2 µl	5 µl
CD44	130-113-331	APC	2 µl	-

3.3.2. Citometría de flujo (FACS)

Para analizar la expresión de los distintos marcadores celulares, se preparó una suspensión de 1 millón o 500.000 células en 100 µl de medio de citometría (PBS con 2% FBS y 5 mM EDTA). Después, la suspensión se bloqueó con 10 µl de agente de bloqueo (Miltenyi Biotec) y se incubó 10 minutos a 4°C en oscuridad. A continuación, se añadió el volumen necesario de cada anticuerpo que se puede observar en la **Tabla 5**, dejando un tubo sin marcar como control. El marcaje con los anticuerpos se incubó en oscuridad, primero 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y luego otros 15 minutos en hielo. Posteriormente, se hicieron 2 lavados, se centrifugaron 5 minutos a 900 g y se resuspendieron en 500 µl de medio de citometría. Finalmente, el porcentaje de la población celular positiva para cada marcador se cuantificó mediante un citómetro de flujo analítico FACS Canto II (BD Biosciences) y los resultados se analizaron mediante el software Diva.

3.3.3. Separación celular (*Sorting*)

Para separar la población celular positiva y negativa para cada marcador, se preparó una suspensión de 15 millones de células en 200 µl de medio de citometría. Después, la suspensión se bloqueó con 30 µl de agente de bloqueo y se incubó 10 minutos a 4°C en oscuridad. A continuación, se añadió el volumen necesario de cada anticuerpo de la **Tabla 5**, dejando un tubo sin marcar como control. El marcaje con los anticuerpos se incubó en oscuridad, primero 15 minutos a temperatura ambiente y luego otros 15 minutos en hielo. Posteriormente, se hicieron 2 lavados, se centrifugaron 5 minutos a 900 g y se resuspendieron en 1,5 ml de medio de citometría. Finalmente, se aislaron las poblaciones celulares positivas y negativas del marcador de interés mediante el citómetro Fusion o Astrios (BD Biosciences). Las células separadas fueron sembradas directamente para realizar ensayo de clonabilidad o ensayo de formación de tumoresferas, o bien, las células fueron recogidas para la extracción total de ARN.

4. Ensayos *in vivo*

Todos los ratones se mantuvieron de acuerdo con las normas establecidas en el animalario del IBiS (basadas en lo estipulado en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero del Ministerio de la Presidencia) y se sacrificaron mediante inhalación de CO₂ cuando se detectó cualquier signo importante de enfermedad, con el fin de evitar el sufrimiento del animal. El comité ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío/IBiS aprobó los procedimientos (Código: 0309-N-15)

4.1 Generación de xenotransplantes

Se generaron xenotransplantes a partir de células tumorales, a partir de tumoresferas y a partir de células sorteadas por citometría en ratones atímicos de la especie *Nude-Foxn1* (Charles River Laboratories). En los tres casos, los ratones fueron anestesiados con 100 µL de los agentes anestésicos diazepam (Rocher) y ketamina (Pfizer) en una proporción 1:3 administrados por inyección intraperitoneal. A continuación, a las células se añadió matrigel (Corning) en una relación 1:1 de forma que el volumen final de la mezcla células/matrigel que se inoculó a cada ratón fue de 100 µL. La mezcla se inyectó en el flanco derecho de la pata trasera por inyección subcutánea. Por último, se marcaron las orejas de los ratones y se colocaron en una placa térmica a 37°C durante 30-60 minutos, hasta que se recuperaron del procedimiento.

Una o cuatro semanas después de inocular las células en los ratones, se comenzó a observar la aparición de tumor en el flanco derecho. Cuando el tumor formado alcanzó un tamaño de 25 mm³, se comenzó a medir el tumor una o dos veces a la semana con un escalímetro digital hasta que alcanzó un tamaño aproximado de 300 mm³, momento en el que se procedió al sacrificio del animal. Si los ratones presentaban signos de aparición de metástasis antes de que creciera el tumor u otro malestar, se sacrificaban en ese momento.

4.1.1 Generación de xenotransplantes a partir de células tumorales

Para generar los xenotransplantes, se inocularon 2 millones de células de la línea RPMI-2650 y 1 millón de células de la línea Detroit-562 en ratones inmunodeprimidos. Se utilizaron 4 hembras de 6-8 semanas de edad por condición.

4.1.2 Generación de xenotransplantes a partir de tumoresferas

Para generar los xenotransplantes a partir de tumoresferas, se sembraron 10.000 células de la línea RPMI-2650 y 20.000 células de la línea Detroit-562 en 6 pocillos de una placa de 24 pocillos de baja adherencia (Costar) en 1 ml de medio MammoCult. A los 7 días, en caso de RPMI-2650, o 3 días, en caso de Detroit-562, se recogieron todas las células de los 6 pocillos, se tripsinizaron y se resuspendieron en un volumen de medio adecuado. Se utilizaron 4 hembras de 6-8 semanas de edad por condición de ratones inmunodeprimidos.

4.1.3 Generación de xenotransplantes a partir de células sorteadas por citometría

Para generar los xenotransplantes a partir de células sorteadas, en primer lugar, se trataron para el procedimiento de separación celular y se separaron a través del citómetro Fusion o Astrios

(protocolo detallado en el apartado 3.3.3). Posteriormente, se inocularon 10.000 células positivas o negativas del marcador de interés en ratones inmunodeprimidos. Se utilizaron 6 hembras de 6-8 semanas de edad por condición.

4.2 Tratamientos con inhibidores tumorales

En primer lugar, se generaron modelos de xenotransplantes a partir de células de la línea RPMI-2650 y de Detroit-562 en ratones atímicos de la especie *Nude-Foxn1* (Charles River Laboratories). Una vez que los tumores alcanzaron un volumen de 200-300 mm³, los tumores fueron extraídos y fraccionados para volverlos a implantar subcutáneamente en el flanco derecho de nuevos ratones. Dos semanas después, los animales fueron randomizados en 9 grupos (n=6) para cada tratamiento. GNE-617 fue administrado por vía oral a una dosis de 30mg/kg durante cinco días consecutivos seguido de cinco días de descanso. GMX1778 fue administrado por vía oral a una dosis de 200mg/kg una vez a la semana. Cisplatino fue administrado por vía IP a una dosis de 2mg/kg dos veces a la semana. Y docetaxel fue administrado por vía IP a una dosis de 15mg/kg dos veces a la semana. Los tratamientos duraron 3 semanas en total, durante las cuales se midieron los tumores dos veces a la semana y, posteriormente, se continuó la medición dos semanas después de terminar los tratamientos.

4.3 Necropsias

Una vez sacrificados los animales, se realizó la necropsia completa (a excepción del cerebro) y se recogieron muestras del tumor y de los tejidos afectados para realizar, si fuera necesario, el correspondiente análisis histológico y molecular. Las muestras tumorales se dividieron en 3 partes; una para histología, otra para análisis de ARN y otra para proteínas. Las muestras para histología se fijaron en formol (Thermo Fisher Scientific) al 4% durante 24 horas. Tras un proceso de deshidratación con etanol a distintas concentraciones y xilol, se introdujeron en bloques de parafina a 65°C (realizado por el servicio de Histología del IBiS). Por otro lado, las muestras destinadas para análisis de ARN y proteínas se congelaron en criotubos a -80°C.

5. Técnicas de análisis de expresión a nivel de ARN

5.1. Extracción de ARN total

La extracción del ARN total de las líneas celulares y las tumoresferas se realizó con el kit *miRNeasy® MiniKit* (QUIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío antes de ser recogidas en un tubo de 1,5 ml con ayuda de un rascador y centrifugadas 5 minutos a 4800 rpm. El pellet fue resuspendido en 700 µL del agente surfactante *QIAzol* (trizol) para lisar las células y liberar el contenido celular. Luego, se añadió 140 µL de cloroformo, se mezcló la solución con un vórtex y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó 15 minutos a 12.000 g y a 4°C para separar las diferentes fases. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se adicionaron 1,5 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el ARN. Seguidamente, se traspasó todo el volumen a una minicolumna, se centrifugó 15 segundos a 8.000 g y se descartó el líquido colector. Se lavó la columna con

solución de extracción de ARN, se centrifugó 15 segundos a 8.000 g y se descartó el líquido colector. A continuación, se realizó un tratamiento con ADNasa I durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se volvió a echar solución de extracción de ARN a la columna y se volvió a centrifugar. Después, se lavó dos veces la columna con solución de lavado, centrifugando en ambas ocasiones 15 segundos a 8.000 g. Se sustituyó el tubo colector por un tubo nuevo de 1,5 ml, se añadió agua libre de nucleasas y se centrifugó 1 minuto a 14.000 rpm para eluir el ARN. Finalmente, se cuantificó la concentración de ARN mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

5.2. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La transcripción reversa se realizó con el kit *high Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante. Para ello, en hielo, se mezclaron 2 μ l de tampón de retrotranscripción 10X, 0,8 μ l de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) 25X, 2 μ l de cebadores de secuencia aleatoria (*random primers*) 10X, 1 μ l de la enzima transcriptasa reversa y 4,2 μ l de agua libre de nucleasas. Esta mezcla de 10 μ l se añadió a un tubo de PCR que contenía 10 μ l con 1 μ g de ARN total diluido en agua libre de nucleasa para completar el volumen de la reacción y se mezcló con un vórtex. A continuación, se puso el tubo de PCR en un termociclador para llevar a cabo la reacción de transcripción reversa que consta de los siguientes pasos: 10 minutos a 25°C, 37 minutos a 120°C y 5 minutos a 85°C. Una vez finalizada la reacción se guardó el ADN complementario (ADNc) a -20°C hasta su uso.

5.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

La detección de cambios en la expresión génica se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) con ADNc procedente de la retrotranscripción reversa como material genético de partida (RT-qPCR). Para ello, se añadieron las siguientes cantidades en cada pocillo de placas de 384 pocillos (Applied Biosystem): 2 μ l de ADNc (diluido 1:3 del producto de la transcripción reversa), 5 μ l de la mezcla para qPCR *GoTaq® Probe* (Promega) 2X y 0,5 μ l de ensayo TaqMan 20X (Applied Biosystem) que contiene los cebadores y la sonda para el ARNm de interés. Las distintas sondas TaqMan utilizadas se describen en la **Tabla 6**. Las sondas para diferenciar los niveles de expresión de las distintas variantes de *NAMPT* fueron diseñadas IDT (Integrated DNA Technologies). Para la sonda *NAMPT1* se utilizó como secuencia diana la parte final de la secuencia codificante específica de la variante 1. Para la sonda *NAMPT1/2* se utilizó como diana una secuencia común de las variantes 1 y 2. Y para la sonda *NAMPT1/2/3/4* se utilizó como diana parte del inicio de la secuencia que es común a todas las variantes.

La qPCR se realizó en el termociclador ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). El programa de PCR consistió en 10 minutos a 95°C seguidos por 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. El análisis de los cambios relativos en la expresión génica se realizó con el método comparativo de ciclo umbral ($\Delta\Delta$ Ct) y con los programas SDS y RQ Manager (Applied Biosystem).

Para normalizar las muestras se usó GAPDH como control endógeno. Cada reacción se hizo por triplicado y se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada gen analizado.

Tabla 6. Sondas TaqMan utilizadas

	Gen	Sonda	Secuencia diana
Variantes de <i>NAMPT</i>	<i>NAMPT1</i>	Tamaño del amplicón: 123 Secuencia de la diana (en negrita) 127-151 del ARNm (exon 10) Secuencia de los cebadores (subrayada)	<u>TGTTTCCTTCAAGTGTAGCTATGTTGT</u> AACTAATGGCCTTGGGATTA AACGTCT TCAAGGACCCAGTTGCT GATCCCAA CAAAAGGTCCAAAAGGGCCGATTA <u>TCTTTACATAGGACGCCAGCA</u>
	<i>NAMPT1/2</i>	Tamaño del amplicón: 110 Secuencia de la diana (en negrita): 96-120 del ARNm (exón 4) Secuencia de los cebadores (subrayada)	<u>AGTATGATGGGCATCTTCCAATAGAA</u> ATAAAAGCTGTTCC TGAGGGCTTTG TCATTCCCAGAGG AAAATGTTCTCTTC ACGGTGGAACCA CACAGATCCAGAGT <u>GTTACTGG</u>
	<i>NAMPT1/2/3/4</i>	Tamaño del amplicón: 106 Secuencia de la diana (en negrita): 41-68 del ARNm (exón 1-2) Secuencia de los cebadores (subrayada)	<u>ATGAATCCTGCGGCAGAAAGCCGAGT</u> <u>TCAACATCCTCCTGGCCACCGACTCC</u> TACAAGTTACTACT ATAAAACAAT ATCCACCAACACAAGCAAAGTTTAT <u>TCCTACTTTGATGCCGTGAAAAGAA</u> GACAGAAAACCTCAAATTAAGGAAG GTGAAATATGAGGAAACAGTATTTTA TG
	<i>NAMPT</i>	Hs00237184_m1	
Genes de marcadores de células madre del cáncer	<i>CD10</i>	Hs00153510_m1	
	<i>CD184</i>	Hs00607978_s1	
	<i>CD19</i>	Hs01047413_g1	
	<i>CD133</i>	Hs01009257_m1	
	<i>CD166</i>	Hs.PT.56a.20098970.g	
Genes de fenotipo célula madre tumoral (STEM)	<i>OCT4</i>	Hs00999632_g1	
	<i>SOX2</i>	Hs01053049_s1	
	<i>KLF4</i>	Hs00358836_m1	
	<i>MYC</i>	Hs00153408_m1	
	<i>NANOG</i>	Hs04260366_g1	
	<i>SOX9</i>	Hs01001343_g1	
	<i>BMI1</i>	Hs00995536_m1	
Genes de la transición epitelio-mesénquima (EMT)	<i>FOXC2</i>	Hs00270951_s1	
	<i>SNAI1</i>	Hs00195591_m1	
	<i>TWIST1</i>	Hs01675818_s1	
	<i>VIM</i>	Hs00185584_m1	
	<i>CDH1</i>	Hs01023894_m1	
	<i>CDH2</i>	Hs00983056_m1	
Control endógeno	<i>GAPDH</i>	Hs03929097_g1	

5.4. PCR "array"

Se analizó la diferencia en expresión para un conjunto de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima (EMT) en células con la sobreexpresión de NAMPT. Para ello, se utilizó la tarjeta de PACR "array" (matriz de genes prediseñada) de Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific 4391016) que contenía los siguientes genes: 18S (endógeno), GAPDH (endógeno), GUSB

(endógeno), HPRT1 (endógeno), ILR1N (endógeno), ACTB, AHNK, AKT1, B2M, BMP1, BMP7, CALD1, CAMK2N1, CAV2, CDH1, CDH2, COL3A1, COL5A2, CTNNA1, DESI1, DSC2, DSP, EGFR, ERBB3, F11R, FGF1, FN1, FOXC2, FZD7, GEMIN2, GNG11, GSK3B, HMBS, IGFBP4, ILK, ILR1N, IPO8, ITGA5, ITGAV, ITGB1, JAG1, KRT19, KRT7, MAP1B, MITF, MMP2, MMP3, MMP9, MSN, MST1R, NOTCH1, NUDT13, OCLN, PDGFRB, PGK1, PLEK2, PTK2, PTP4A1, RAC1, RGS2, RPLP0, SERPINE1, SMAD2, SNAI1, SNAI2, SNAI3, SPARC, SPP1, STAT3, STEAP1, TBP, TCF3, TCF4, TFPI2, TFRC, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TIMP1, TMEFF1, TMEM132A, TSPAN13, VCAN, VIM, VPS13A, WNT11, WNT5A, WNT5B, ZEB1, ZEB2

Los resultados se representaron a modo de diagrama de Venn utilizando la herramienta online del grupo de Bioinformática y Genómica evolutiva de la Universidad de Gante (Bélgica) (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)

6. Técnicas de análisis de expresión a nivel de proteínas

6.1. Anticuerpos para proteínas

Los anticuerpos utilizados en esta tesis, su procedencia, especie, tipo (monoclonal o policlonal), aplicaciones y diluciones empleadas se detallan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Anticuerpos utilizados

Tipo	Anticuerpo	Proveedor	Dilución(WB)
Primarios	Visfatin 450-491aa (policlonal conejo)	Bethyl (A300-779A)	1:2.000
	Visfatin 1-100aa (policlonal conejo)	Abcam (ab45890)	1:500
	α-Tubulina (monoclonal conejo)	Sigma (T9026)	1:10.000
	NAPRT (policlonal ratón)	Sigma (SAB1400768)	1:500-2000
Secundarios	Anti-conejo HRP (policlonal cabra)	Abcam (ab97051)	1:10.000
	Anti-ratón HRP (policlonal conejo)	Abcam (ab97046)	1:10.000

WB: *Western-blot*

6.2. Extracción de proteínas total

Para extraer las proteínas, se lavaron las células dos veces con PBS frío y se añadió un volumen adecuado de tampón de lisis RIPA compuesto por: Tris-HCl 25 mM pH 8, NaCl 150 mM, NP-40 (IGEPAL) 1% (Sigma), desoxicolato de sodio 1% (Sigma), SDS 0,1%, Na₃VO₄ 1mM (Sigma), EDTA 0,5 M pH 8, cóctel de inhibidores de fosfatasa (Sigma) y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma). Se mantuvieron 5 minutos en hielo y en agitación, después se recogieron los lisados en tubos de 1,5 ml. A continuación, las muestras se sonicaron durante 3 ciclos de 5 segundos al 40% de potencia. Los restos de debris celular se eliminaron por centrifugación durante 10 minutos a 15.000 rpm a 4°C y el sobrenadante (extracto proteico) se guardó a -20°C.

La cuantificación del extracto proteico se realizó utilizando dos métodos: el método Bradford modificado (BioRad) midiendo la absorbancia a 595nm y el método BCA Assay con B:A mix (Thermo) midiendo la absorbancia a 570nm mediante un lector de absorbancias. Para ello, se utilizaron concentraciones conocidas de la albúmina sérica bovina (BSA) como control para hacer la curva patrón.

6.3. *Western-blot*

La inmunodetección de proteínas se realizó siguiendo un protocolo estándar. Para ello, se disolvieron 30 µg de proteínas en tampón de carga (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,002% (Sigma)) y se desnaturalizaron 5 minutos a 95°C. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida 10-12%, dependiendo del tamaño de la proteína a detectar, utilizando el sistema *Mini-Protean Tetra Cell* (BioRad). La electroforesis se realizó a una potencia de 100-120 V en un tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3). A continuación, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Protran 0,2 µm) utilizando el sistema *Mini Trans-Blot Cell* (BioRad) durante 2 horas a 400 mA en un tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8,3). Tras la transferencia, las membranas se bloquearon en agitación durante 2 horas en un tampón de bloqueo (PBS, Tween 20 0,1%, PBS 3%). Posteriormente, se incubaron toda la noche con la dilución adecuada de anticuerpo primario en tampón de bloqueo y en agitación. Al día siguiente, se hicieron tres lavados con PBS-Tween 0,1% para eliminar el exceso de anticuerpo primario. A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en PBS-Tween 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos secundarios utilizados estaban conjugados con la enzima peroxidasa (HRP). Luego, se hicieron 3 lavados con PBS-Tween 0,1% para eliminar el exceso de anticuerpo secundario.

Finalmente, la detección se realizó mediante una reacción de quimioluminiscencia utilizando los reactivos *ECL Western Blotting Detection Reagents* (Amersham) y la visualización con el equipo Chemidoc Touch (BioRad).

6.4. *Cuantificación de bandas de Western-blot*

Para cuantificar las bandas de proteínas se usó el programa *Image Lab* (BioRad). Se seleccionó cada banda de forma individual, se restó el fondo inespecífico a cada una y se normalizó con respecto al valor de la banda de la proteína α -Tubulina que sirvió de control de carga.

7. *Secuenciación NGS*

La secuenciación NGS, también llamada secuenciación de nueva generación, se realizó en colaboración con el grupo de Medicina Xenómica del Instituto de Investigación de Santiago (IDIS) en Santiago de Compostela.

8. *Análisis de bases de datos*

En esta tesis se han utilizado las siguientes bases de datos:

- **R2-Genomics** (<http://hgserver1.amc.nl>): bases de datos transcriptómicas públicas desarrollada por el Departamento de Oncogenómica del Centro Médico Académico (AMC) de Ámsterdam.
- **SurvExpress** (<http://bioinformatica.mty.itesm.mx:8080/Biomatec/SurvivaX.jsp>): análisis de supervivencia en cáncer.

- **NCBI** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>): utilizada para obtener la secuencia de nucleótidos.
- **Uniprot** (<https://www.uniprot.org/>): utilizada para obtener información de proteínas.
- **GeneCards** (<http://www.genecards.org/>): utilizada para obtener información de genes.
- **PhosphoSitePlus** (<https://www.phosphosite.org/homeAction>): utilizada para obtener información de las modificaciones post-traduccionales de las proteínas.
- **CBioPortal** (<https://www.cbioportal.org/>): utilizada para el análisis de mutaciones en tumores humanos.
- **Pfam** (<http://pfam.xfam.org/search/sequence>): utilizada para obtener información sobre los dominios de las proteínas.
- **Ensembl** (<http://www.ensembl.org/index.html>): utilizada para obtener información de las variantes.
- **PBD** (<http://www.rcsb.org/>): utilizada para obtener las estructuras tridimensionales de la proteínas (NAMPT: archivo 3dhf). Las imágenes se retocaron en el programa ViewerLite.

9. Análisis estadístico

Utilizamos el programa *GraphPad Prism* para el análisis estadístico de los experimentos realizados. Dependiendo de si los datos estaban normalizados con respecto al EV/control o no utilizamos el test estadístico T-student para muestras no pareadas o el test T-student con la corrección de Welch. Valores de p inferiores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos y se representaron según la siguiente clasificación: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***).

RESULTADOS

1. Estudio de las propiedades de célula madre de las subpoblaciones CSC en CCyC

Dentro del tumor, la subpoblación de células madre tumorales (CSCs) es responsable, no sólo del inicio y progresión tumoral, sino también de la metástasis y resistencia a las terapias convencionales.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Existe una elevada heterogeneidad entre los distintos tipos de cáncer de cabeza y cuello (CCyC), lo que complica en gran medida la identificación de marcadores específicos de esta subpoblación celular.¹⁵⁰ Siendo necesario establecer los marcadores de CSC en CCyC, decidimos estudiar las propiedades de célula madre de diferentes marcadores en dos líneas celulares comerciales de CCyC humano: RPMI-2650, procedente de carcinoma de células escamosas de nariz, y Detroit-562, originaria de carcinoma de faringe. En primer lugar, analizamos la expresión de los marcadores de superficie reportados como posibles marcadores de CSC en células de CCyC: CD10, CD184, CD19, CD133, CD166 y CD44, mediante citometría de flujo (FACS) (**Tabla 8**). Basándonos en los datos obtenidos, descartamos CD44 como marcador de CSC, ya que, en ambas líneas celulares, toda la población celular era positiva para este marcador y no todas las células son capaces de regenerar el cultivo. También descartamos el marcador CD166 en la línea Detroit-562, ya que, al igual que CD44, toda la población era positiva para este marcador.

Tabla 8. Expresión de marcadores de célula madre tumorales por citometría de flujo (FACS) en las líneas celulares de CCyC.

(%±SD)	CD10+	CD184+	CD19+	CD133+	CD166+	CD44+
RPMI-2650	1,018 ±0,27	0,801±0,73	1,721±1,45	0,056±0,12	60,75±1,48	99,68±0,20
Detroit-562	0,609±0,41	0,185±0,10	0,388±0,28	0,049±0,05	99,63±0,23	99,76±0,17

1.1. Marcador CD10

El marcador CD10, también llamado CALLA (antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda), es una proteína de superficie de membrana que actúa como una metaloendopeptidasa que se encarga de escindir péptidos de señalización.^{173,174} Algunos estudios han mostrado que las células CD10 positivas presentan propiedades relacionadas con el fenotipo CSC en líneas celulares de CCyC.¹⁷³ Altos niveles de este marcador se han correlacionado con una mayor resistencia a la quimio y radioterapia.¹⁷³ Además, CD10 ha sido propuesto como un posible marcador de peor pronóstico en carcinoma oral de células escamosas.^{174,175}

Evaluamos al marcador CD10 como posible marcador de CSC en nuestras líneas celulares de CCyC. Para ello, generamos tumoresferas, que son agrupaciones celulares capaces de crecer en suspensión en ausencia de suero. Estas poblaciones se caracterizan por su capacidad de autorrenovación tras ser disgregadas y por estar enriquecidas en progenitores epiteliales multipotentes.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ Cuantificamos los niveles de expresión de *CD10* por RT-qPCR y encontramos una mayor expresión en las tumoresferas generadas de la línea Detroit-562 en comparación con el extracto total celular. Sin embargo, no observamos diferencias en el caso de la línea RPMI-2650 (**Figura 6A**). Luego, comprobamos el porcentaje de la subpoblación positiva para el marcador

CD10 en las tumoresferas por citometría de flujo (FACS). Las tumoresferas mostraron un menor porcentaje de células CD10 positivas en comparación con el extracto total en ambas líneas celulares (**Figura 6B**).

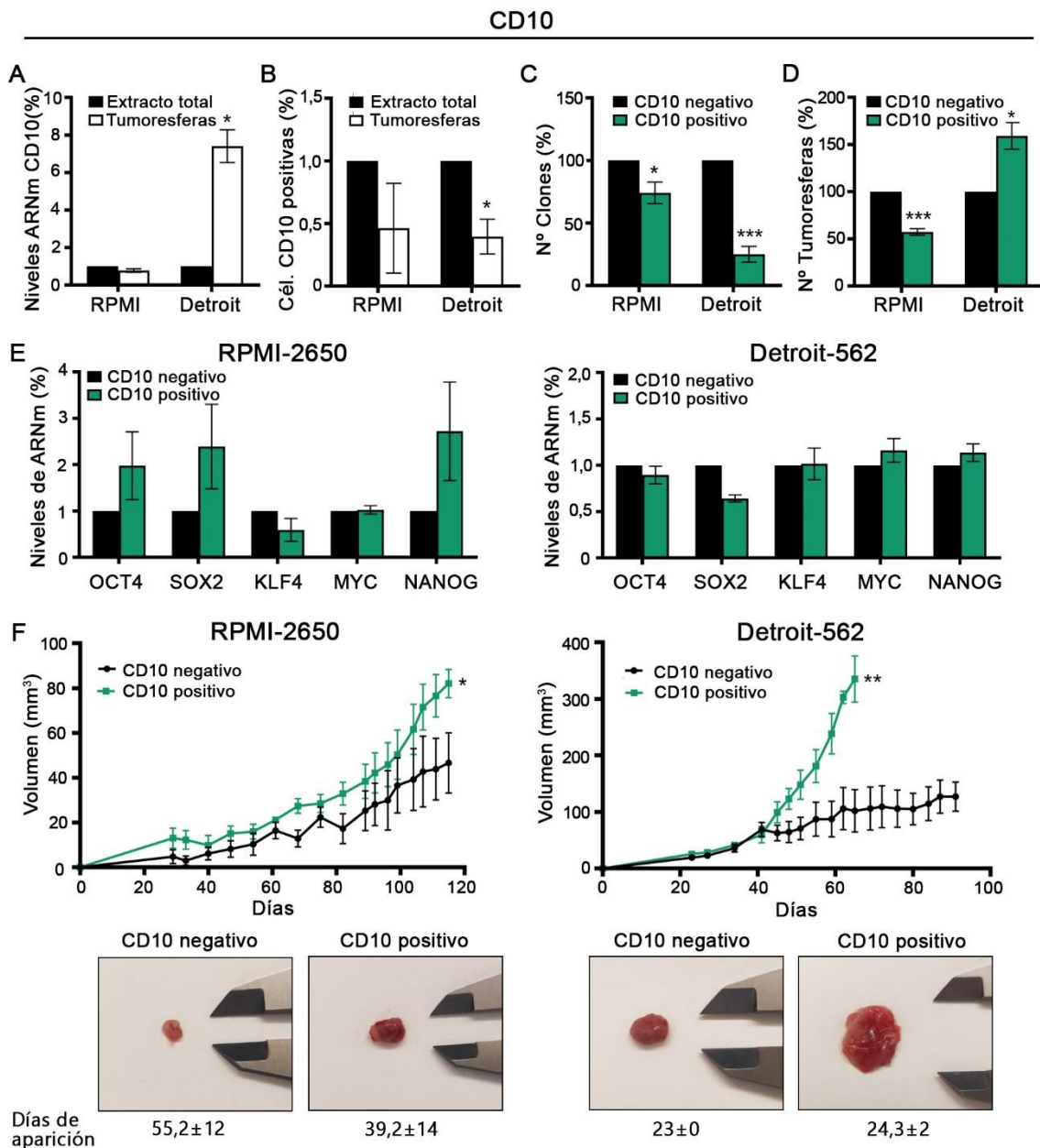


Figura 6. Propiedades de célula madre tumorales de la subpoblación CD10 en CCyC. A) Niveles de expresión de *CD10* en extracto total y tumoresferas de las líneas celulares RPMI-2650 y Detroit-562. **B)** Porcentaje de células CD10 positivas del extracto total y tumoresferas de las líneas celulares medido por citometría de flujo. **C)** Ensayo de clonabilidad de las células CD10 negativas y positivas previamente aisladas por el citómetro. **D)** Ensayo de formación de tumoresferas de las células CD10 negativas y positivas previamente aisladas por el citómetro. **E)** Niveles de expresión de genes relacionados con el fenotipo de célula madre en las células CD10 negativas y positivas previamente aisladas por el citómetro. **F)** Crecimiento tumoral *in vivo* en xenotransplantes (N=6) de las células CD10 negativas y positivas de las líneas celulares RPMI-2650 y Detroit-562. Se muestra imágenes representativas de los tumores y los días que tardaron en aparecer. Los resultados se expresan en niveles normalizados al extracto total o negativo (1% o 100%). Se representa la media ± SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Posteriormente, se aislaron mediante citómetro las subpoblaciones CD10 positiva y negativa para realizar un ensayo de clonabilidad, un ensayo de generación de tumoresferas y para extracción de ARN. El ensayo de clonabilidad nos permitió medir la capacidad de las células de formar clones y de regenerar de nuevo el cultivo.¹⁶⁹⁻¹⁷² Para ello, se sembraron 500 células CD10 positivas o negativas para RPMI-2650 y 2.000 células para Detroit-562 directamente del citómetro y, tras un periodo de incubación de 7 o 10 días, se cuantificaron el número de clones que habían crecido. Esta diferencia técnica del número de células se debe a que las células Detroit-562 sufrían más que las RPMI-2650 durante el proceso de separación celular mediante citometría, lo que disminuía bastante la supervivencia celular. Observamos que las células CD10 positivas de ambas líneas generaron un menor número de clones en comparación con las células negativas (**Figura 6C**). Para el ensayo de formación de tumoresferas, se sembraron una única célula CD10 positiva o negativa de la línea RPMI-2650 por pocillo y se incubaron durante aproximadamente un mes para estudiar el porcentaje de células que formaron una tumoresfera siendo capaz de reconstituir la población celular. Y se sembraron 20.000 células CD10 positivas o negativas de la línea Detroit-562, se cultivaron durante 72 horas y se cuantificó el número de tumoresferas formadas. Observamos una menor eficiencia en la formación de tumoresferas a partir de una célula aislada en las células CD10 positivas en la línea RPMI-2650. En cambio, las células CD10 positivas de Detroit-562 generaron un mayor porcentaje de tumoresferas que las células negativas (**Figura 6D**). Además, se extrajo ARN de las células CD10 positivas y negativas para medir la expresión de los factores de Yamanaka (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC*) y *NANOG*. Estos genes están implicados en rutas de señalización que regulan la pluripotencia de las células madre¹¹⁷⁻¹²². Observamos que las células CD10 positivas de la línea RPMI-2650 tenían una mayor expresión de *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*, pero no encontramos diferencias significativas en la línea Detroit-562 (**Figura 6E**). Por último, quisimos validar el efecto *in vivo* de células CD10 positivas en xenotransplantes en ratones inmunodeprimidos. Para ello, se inyectaron 10.000 células positivas o negativas, previamente aisladas por citómetro, en el flanco derecho de 6 ratones. Observamos un crecimiento más rápido y agresivo en los tumores generados a partir de la subpoblación celular CD10 positiva, especialmente en el caso de la línea Detroit-562 (**Figura 6F**).

1.2. Marcador CD184

La proteína CD184, también llamada CXCR4 (receptor de quimiocina CXC tipo 4), es un receptor de superficie específico del factor 1 derivado de células estromales (SDF-1). La unión del sustrato SDF-1 a su receptor CD184 induce una cascada de señalización que está implicada en la interacción entre las CSCs y las células del estroma que conforman el nicho del tumor. De modo que, CD184 está involucrado en la progresión, angiogénesis, metástasis y supervivencia del tumor.^{179,180} Se ha propuesto que la interacción SDF-1-CD184 cumple un papel importante en el desarrollo de la población CSC en CCyC.^{181,182} Cuantificamos los niveles de expresión de *CD184* en las tumoresferas generadas mediante RT-qPCR para validar este marcador en nuestras líneas

celulares de CCyC. Observamos altos niveles de expresión de *CD184* en las tumoresferas generadas en ambas líneas en comparación con el extracto total celular (**Figura 7A**).

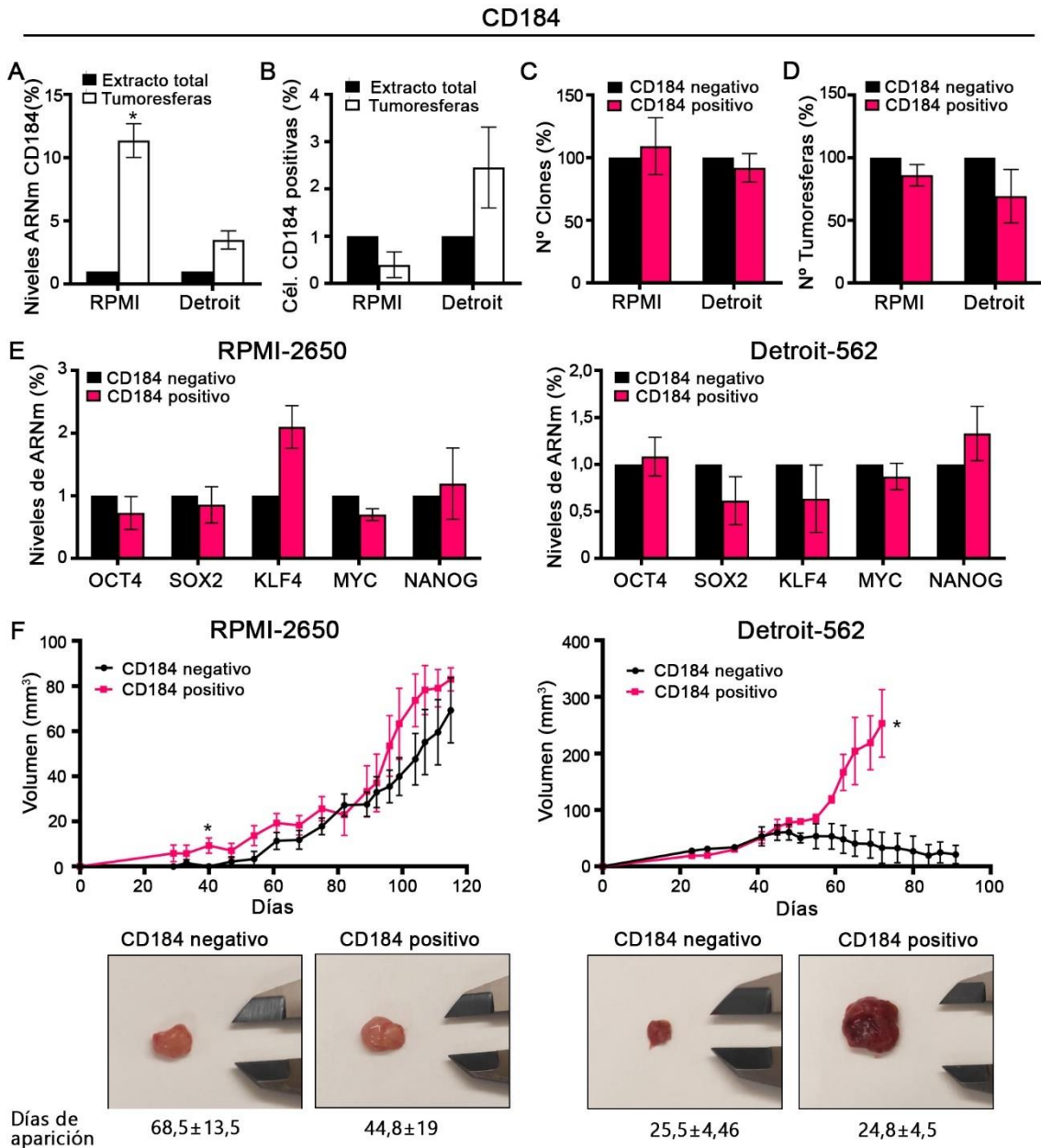


Figura 7. Propiedades de célula madre tumorales de la subpoblación CD184 en CCyC. **A)** Niveles de expresión de *CD184* en extracto total y tumoresferas de las líneas celulares RPMI-2650 y Detroit-562. **B)** Porcentaje de células *CD184* positivas del extracto total y tumoresferas de las líneas celulares medido por citometría de flujo. **C)** Ensayo de clonabilidad de las células *CD184* negativas y positivas previamente aisladas por el citómetro. **D)** Ensayo de formación de tumoresferas de las células *CD184* negativas y positivas previamente aisladas por el citómetro. **E)** Niveles de expresión de genes relacionados con el fenotipo de célula madre en las células *CD184* negativas y positivas previamente aisladas por el citómetro. **F)** Crecimiento tumoral *in vivo* en xenotransplantes (N=6) de las células *CD184* negativas y positivas de las líneas celulares RPMI-2650 y Detroit-562. Se muestra imágenes representativas de los tumores y los días que tardaron en aparecer. Los resultados se expresan en niveles normalizados al extracto total o negativo (1% o 100%). Se representa la media ± SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Luego, comprobamos el porcentaje de la subpoblación positiva para el marcador CD184 en las tumoresferas por citometría de flujo. Las tumoresferas de Detroit-562 mostraron un mayor porcentaje de células CD184 positivas en comparación con el extracto total, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (**Figura 7B**). Como hicimos anteriormente, las subpoblaciones CD184 positivas y negativas fueron aisladas mediante citómetro para realizar un ensayo de clonabilidad, un ensayo de generación de tumoresferas y para extracción de ARN. No observamos diferencias significativas en la formación del número de clones entre las células CD184 positivas y negativas (**Figura 7C**). Tampoco observamos diferencias significativas en la generación de tumoresferas entre las células CD184 positivas y negativas (**Figura 7D**). Analizamos la expresión de varios genes relacionados con el fenotipo de célula madre tumoral del ARN extraído de ambas subpoblaciones. Observamos que las células CD184 positivas de la línea RPMI-2650 tenían mayores niveles de expresión de *KLF4*, mientras que las células positivas de la línea Detroit-562 tenían ligeramente altos niveles de *OCT4* y *NANOG* en comparación con las células negativas (**Figura 7E**). Por último, generamos modelos de xenotransplantes en ratones inmunodeprimidos para validar el efecto *in vivo* del marcador CD184. Para ello, se inyectaron 10.000 células positivas o negativas, previamente aisladas por citómetro, en el flanco derecho de 6 ratones. Observamos un crecimiento más rápido y agresivo en los tumores generados a partir de la subpoblación celular CD184 positiva, especialmente en el caso de Detroit-562 (**Figura 7F**).

1.3. Marcador CD133

CD133 es un marcador de superficie que ha sido utilizado para identificar la población CSC en muchos tipos de tumores, incluyendo cáncer de colon, gástrico, sarcoma y glioblastoma.^{126,127} Sin embargo, su uso en CCyC ha sido muy discutido debido a que se han obtenido resultados contradictorios. Mientras que unos estudios observaron que las células CD133 positivas presentan propiedades de CSC,^{152,159} otros estudios no encontraron diferencias entre el comportamiento de las células positivas y negativas para este marcador.^{151,160} Cuantificamos los niveles de expresión de *CD133* en las tumoresferas generadas mediante RT-qPCR para validar este marcador en nuestras líneas celulares de CCyC. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en los niveles de expresión entre las tumoresferas en comparación con el extracto total celular (**Figura 8A**). No obstante, las tumoresferas de ambas líneas mostraron un mayor porcentaje de células CD133 positivas en comparación con el extracto total por citometría de flujo (**Figura 8B**). Como anteriormente, las subpoblaciones CD133 positivas y negativas fueron aisladas mediante citómetro. Las células CD133 positivas de la línea RPMI-2650 formaron un mayor porcentaje de clones que las células negativas. No pudimos realizar este ensayo en el caso de la línea Detroit-562 (**Figura 8C**). Las células CD133 positivas de ambas líneas generaron un menor porcentaje de tumoresferas que las células negativas (**Figura 8D**). Además, las células CD133 positivas de RPMI-2650 tenían significativamente mayores niveles de expresión de *KLF4*, mientras que en las células positivas de Detroit-562 observamos un ligero incremento de los niveles de *SOX2* en comparación con las células negativas (**Figura 8E**). Por último, generamos modelos de

xenotransplantes en ratones inmunodeprimidos para validar el efecto *in vivo* del marcador CD133. Para ello, se inyectaron 10.000 células positivas o negativas, previamente aisladas por citómetro, en el flanco derecho de 6 ratones. Sin embargo, observamos que los tumores generados a partir de las células CD133 positivas de ambas líneas celulares crecieron más lento que los tumores formados de las células negativas (**Figura 8F**).

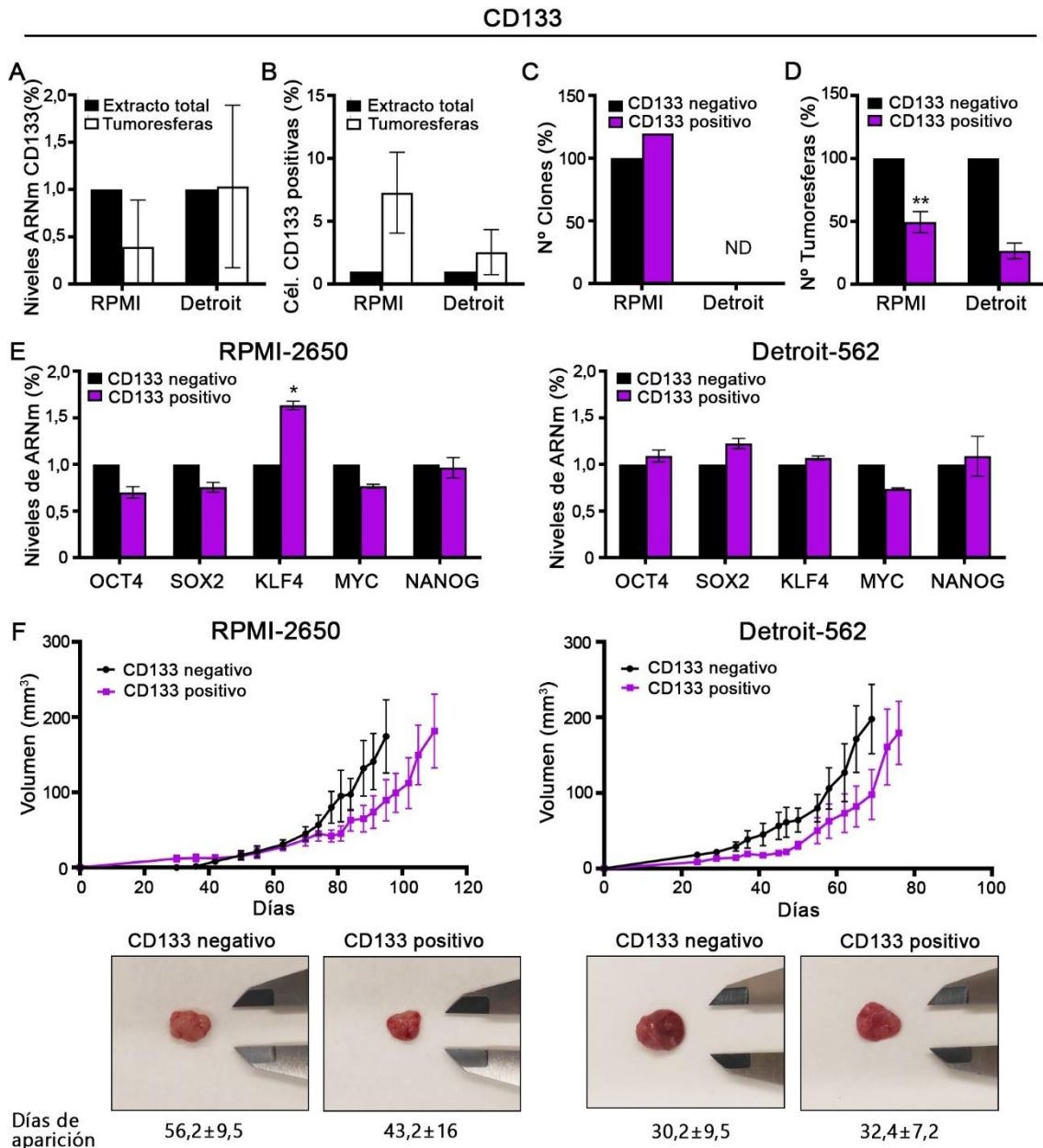


Figura 8. Propiedades de célula madre tumorales de la subpoblación CD133 en CCyC. **A**) Niveles de expresión de *CD133* en extracto total y tumoresferas de las líneas celulares RPMI-2650 y Detroit-562. **B**) Porcentaje de células CD133 positivas del extracto total y tumoresferas de las líneas medido por citometría de flujo. **C**) Ensayo de clonabilidad de las células CD133 negativas y positivas previamente aisladas por el citómetro. **D**) Ensayo de formación de tumoresferas de las células CD133 negativas y positivas previamente aisladas por el citómetro. **E**) Niveles de expresión de genes relacionados con el fenotipo de célula madre en las células CD133 negativas y positivas. **F**) Crecimiento tumoral *in vivo* en xenotransplantes (N=6) de las células CD133 negativas y positivas de las líneas celulares RPMI-2650 y Detroit-562. Se muestra imágenes representativas de los tumores y los días que tardaron en aparecer. Los resultados se expresan en niveles normalizados al extracto total o negativo (1% o 100%). Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). ND: no determinado.

1.4. Marcador CD19

La proteína de superficie CD19 es un correceptor propio de los linfocitos B que interviene en la diferenciación de las células madre hematopoyéticas. Por consiguiente, CD19 es un marcador muy usado principalmente en tumores líquidos para su diagnóstico y pronóstico.^{183,184} CD19 está relacionado, además, con el fenotipo CSC en algunos tipos de tumores. En mieloma, por ejemplo, hallaron que la subpoblación de linfocitos CD19⁺/CD34⁺ estaba enriquecida de células con propiedades típicas de CSC.¹⁸⁵ En linfoma, CD19 actúa como un regulador independiente de la oncoproteína MYC que regula la pluripotencia en el tumor.^{186,187} Por otro lado, el papel del sistema inmune en CCyC, especialmente en los tumores VPH positivos, ha sido foco de estudio recientemente. En estos tumores se ha encontrado una mayor infiltración de células plasmáticas (CD19⁺CD38⁺) y células B de memoria, lo que se ha correlacionado con un mejor pronóstico.^{188,189} Por lo que, CD19 ha sido propuesto como un biomarcador pronóstico en tumores de CCyC positivos para el virus VPH.^{190,191} Cuantificamos los niveles de expresión de *CD19* en las tumoresferas generadas mediante RT-qPCR para validar este marcador en nuestras líneas celulares de CCyC. Observamos que las tumoresferas de la línea RPMI-2650 tenían menores niveles de expresión de *CD19*, mientras que las tumoresferas de Detroit-2650 tenían mayores niveles de este gen en comparación con el extracto total celular (**Figura 9A**).

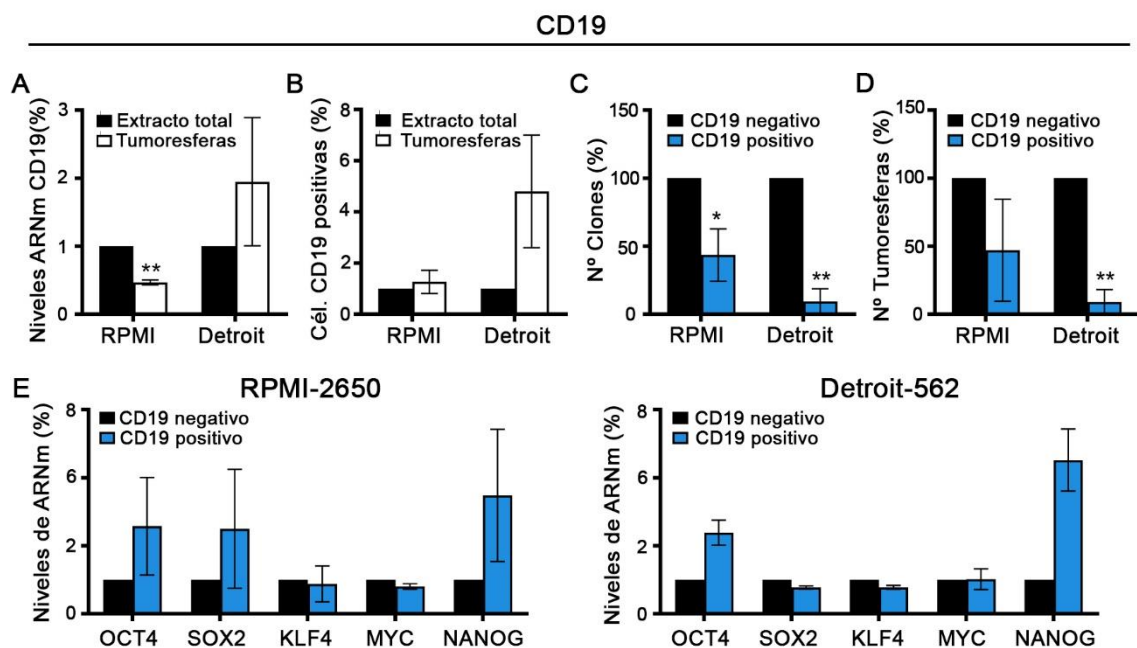


Figura 9. Propiedades de célula madre tumorales de la subpoblación CD19 en CCyC. **A)** Niveles de expresión de *CD19* en extracto total y tumoresferas de las líneas celulares RPMI-2650 y Detroit-562. **B)** Porcentaje de células CD19 positivas del extracto total y tumoresferas de las líneas celulares medido por citometría de flujo. **C)** Ensayo de clonabilidad de las células CD19 negativas y positivas previamente aisladas por el citómetro. **D)** Ensayo de formación de tumoresferas de las células CD19 negativas y positivas previamente aisladas por el citómetro. **E)** Niveles de expresión de genes relacionados con el fenotipo de célula madre en las células CD19 negativas y positivas previamente aisladas por el citómetro. Los resultados se expresan en niveles normalizados al extracto total o negativo (1% o 100%). Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Luego, comprobamos el porcentaje de la subpoblación positiva para el marcador CD19 en las tumoresferas por citometría de flujo. Encontramos un aumento del porcentaje de células CD19 positivas en las tumoresferas de ambas líneas celulares en comparación con el extracto total, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (**Figura 9B**). Como anteriormente, las poblaciones CD19 positivas y negativas fueron aisladas mediante citómetro. Las células CD19 positivas de ambas líneas generaron un menor porcentaje de número de clones (**Figura 9C**) y un menor porcentaje de tumoresferas (**Figura 9D**). Las células CD19 de la línea RPMI-2650 tenían mayor nivel de expresión de *NANOG*, mientras que las células positivas de Detroit-562 tenían mayores niveles de *OCT4* y *NANOG* en comparación con las células negativas (**Figura 8E**). Debido a estos datos en conjunto, decidimos no estudiar el efecto *in vivo*.

1.5. Marcador CD166

La proteína CD166, también llamada ALCAM (molécula de adhesión celular leucocitaria activada), es una glucoproteína de membrana involucrada en la adhesión celular.^{192,193} CD166 se ha relacionado con una mayor agresividad y capacidad de metástasis en varios tipos de tumores, incluyendo cáncer de próstata, ovario, mama, esófago, páncreas y melanoma.¹⁹³⁻¹⁹⁷ En CCyC, CD166 también ha sido propuesto como un marcador específico de CSC, ya que altos niveles de CD166 en tumores de CCyC humanos se correlacionan con un peor pronóstico.¹⁹² Sin embargo, otros estudios no encontraron ninguna relación importante entre el marcador CD166 y parámetros clínicos de pacientes. Algunos datos indican que CD166 está frecuentemente expresado en CCyC, lo que pone en duda su relación con la población CSC.^{198,199}

Teniendo en cuenta los datos de la **Tabla 8**, utilizamos sólo la línea RPMI-2650 como modelo para validar este marcador. Observamos que las tumoresferas generadas de esta línea celular expresaban menos *CD166* en comparación con el extracto total celular (**Figura 10A**). Las tumoresferas mostraron un menor porcentaje de células CD166 positivas en comparación con el extracto total por citometría de flujo (**Figura 10B**). No obstante, observamos que las células CD166 positivas, previamente aisladas por citómetro, formaron un mayor porcentaje de clones (**Figura 10C**) y de tumoresferas en comparación con las células negativas (**Figura 10D**). Las células positivas mostraron un mayor nivel de expresión de *KLF4* que las células negativas (**Figura 10E**). Por último, generamos modelos de xenotransplantes en ratones inmunodeprimidos para validar el efecto *in vivo* del marcador CD166. Para ello, se inyectaron 10.000 células positivas o negativas, previamente aisladas por citómetro, en el flanco derecho de 6 ratones. Observamos un crecimiento más rápido y agresivo en los tumores generados a partir de la subpoblación celular CD166 positiva (**Figura 10F**).

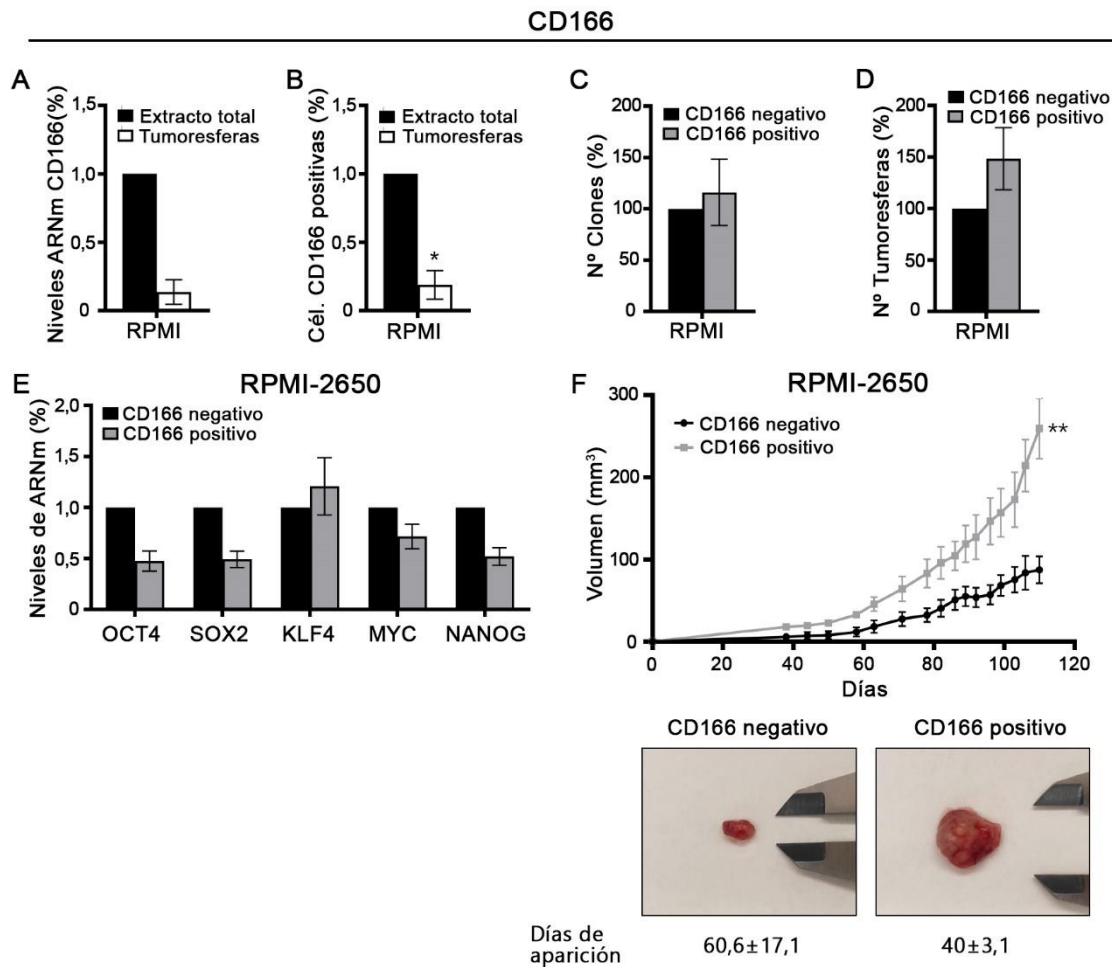


Figura 10. Propiedades de célula madre tumorales de la subpoblación CD166 en CCyC. **A)** Niveles de expresión de *CD166* en extracto total y tumoresferas de la línea celular RPMI-2650. **B)** Niveles de expresión de *CD166* en extracto total y tumoresferas de RPMI-2650. **C)** Ensayo de clonabilidad de las células CD166 negativas y positivas previamente aisladas por el citómetro. **D)** Ensayo de formación de tumoresferas de las células CD166 negativas y positivas previamente aisladas por el citómetro. **E)** Niveles de expresión de genes relacionados con el fenotipo de célula madre en las células CD166 negativas y positivas previamente aisladas por el citómetro. **F)** Crecimiento tumoral *in vivo* en xenotransplantes (N=6) de las células CD166 negativas y positivas de la línea RPMI-2650. Se muestra imágenes representativas de los tumores y los días que tardaron en aparecer. Los resultados se expresan en niveles normalizados al extracto total o negativo (1% o 100%). Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

1.6. Plasticidad celular entre los distintos marcadores

Hemos obtenido algunos resultados divergentes y bastantes diferencias entre las líneas RPMI-2650 y Detroit-562 a la hora de estudiar las propiedades de célula madre tumoral de los marcadores CD10, CD184, CD19, CD133 y CD166. Los datos obtenidos sugieren que no existe una única población CSC en nuestras líneas celulares de CCyC. Por lo que quisimos estudiar la plasticidad celular de las distintas subpoblaciones de los marcadores propuestos. Para ello, las células positivas y negativas separadas por el citómetro, de acuerdo a su expresión en los distintos marcadores, fueron cultivadas 1 o 2 semanas en condiciones normales y, posteriormente, analizamos de nuevo la expresión de cada marcador por citometría de flujo. Todas las subpoblaciones puras regeneraron las distintas poblaciones de los otros marcadores

reconstituyendo así la heterogeneidad del cultivo. Estos datos indican que existe una gran plasticidad celular de manera natural entre las distintas subpoblaciones (**Figura 11**). Esta plasticidad podría explicar la existencia de varias subpoblaciones distintas de CSC dentro de los cultivos y la dificultad de identificar marcadores de una única subpoblación de CSC.

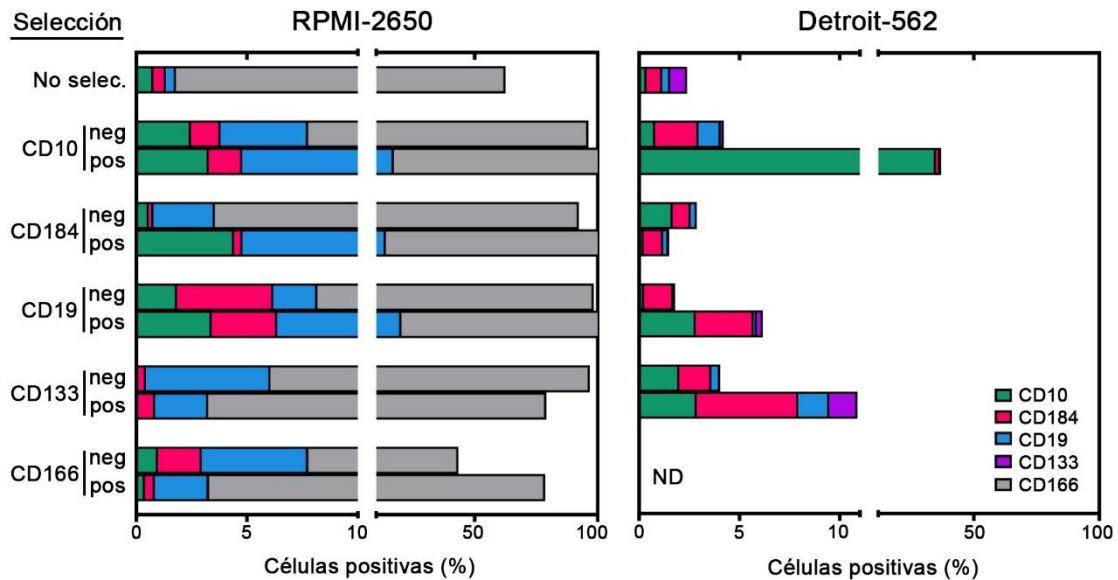


Figura 11. Plasticidad celular de las subpoblaciones CSC en CCyC. Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células positivas para los marcadores de superficie CD10, CD184, CD19, CD133 y CD166 de las subpoblaciones CD10, CD184, CD19, CD133 y CD166 positivas y negativas tras ser separadas por citómetro y cultivadas. Como control se usaron células no seleccionadas. ND: no determinado

Mediante secuenciación NGS (secuenciación de nueva generación) se realizó un análisis transcriptómico para identificar los genes comunes a las posibles poblaciones pluripotentes de las líneas celulares de CCyC. Se analizaron los genes diferenciales entre las células positivas y negativas para los marcadores CD10, CD184 y CD19. La comparación de estos genes diferenciales mostró 8 genes comunes a los tres marcadores, que fueron: *IFIT3*, *MAP4K4*, *BAGALT4*, *ZMYND11*, *ECHDC1*, *EIF4A1*, *TP53BP1* y *HAUS4* (**Figura 12**). Varios de estos genes están involucrados en procesos típicos de células con fenotipo CSC, como son la migración celular, la metástasis, la supervivencia de los pacientes y la resistencia a la quimioterapia. *IFIT3* promueve la metástasis en carcinoma oral de células escamosas²⁰⁰ y puede ser un marcador pronóstico de la eficacia de la inmunoterapia en cáncer de mama.²⁰¹ La proteína MAP4K4 es activada por SOX2 ejerciendo un papel importante en la supervivencia de las células tumorales de cáncer de pulmón.²⁰² Además, *MAP4K4* está involucrado en el procesos de migración y metástasis, y podría ser un indicador pronóstico en varios tipos de cáncer²⁰³. *BAGALT4* ha sido asociado con el proceso de metástasis en carcinoma hepatocelular.²⁰⁴ *ZMYND11* actúa como un supresor tumoral que actúa reprimiendo la transcripción de varios factores necesarios para el crecimiento tumoral.²⁰⁵ Se ha observado que la inhibición de *ZMYND11* puede favorecer la capacidad de invasión y metástasis de las células de cáncer de ovario.²⁰⁶ *ECHDC1* está relacionado con la resistencia a gemcitabina en cáncer de vejiga.²⁰⁷ *EIF4A1* ha sido propuesto como un indicador de mal pronóstico en cáncer de

estómago²⁰⁸ y en carcinoma oral de células escamosas²⁰⁹ y se ha relacionado con la metástasis y la resistencia a la terapia clásica en cáncer de mama triple negativo²¹⁰. *TP53BP1* participa en la respuesta al daño de ADN y en la parada del ciclo celular. La pérdida de *TP53BP1* se ha asociado a un peor pronóstico en cáncer de mama triple negativo.^{211,212} Y *HAUS4* está implicado en el proceso de mitosis de las células con fenotipo CSC en glioblastoma.²¹³

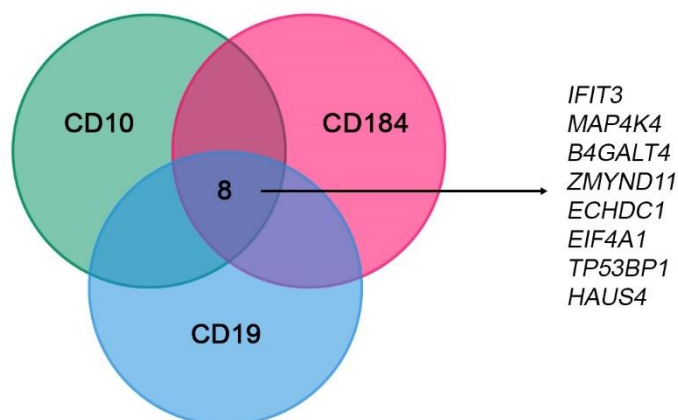


Figura 12. Análisis transcriptómico de genes comunes a CD10, CD184 y CD19. Diagrama de venn de los genes diferenciales entre CD10, CD184 y CD19 positivas y negativas en las líneas RPMI-2650 y Detroit-562. Los genes seleccionados fueron resultados de una secuenciación NGS (secuenciación de nueva generación).

1.7. NAMPT, un nuevo marcador

NAMPT ha sido descrito como un oncogén en varios tipos de tumores, en los que no sólo aumenta las propiedades tumorigénicas, sino que también permite la adquisición de las propiedades y el fenotipo de célula madre tumoral. NAMPT enriquece esta población CSC del tumor a través de la activación de la ruta de rescate y de factores de transcripción que inducen la pluripotencia^{1,42,43,45}. Dada esta información, quisimos estudiar el papel de NAMPT como un posible marcador específico de CSC en CCyC.

En primer lugar, tal y como hicimos con los anteriores marcadores, analizamos los niveles de expresión de *NAMPT* en las tumoresferas generadas en nuestras líneas celulares. Observamos que las tumoresferas de RPMI-2650 y Detroit-562 expresaban mayores niveles de *NAMPT* en comparación con el extracto total celular (**Figura 13A**). Luego, transfectamos las células de ambas líneas con un plásmido comercial para sobreexpresar NAMPT y un vector vacío como control para realizar un ensayo de clonabilidad y de tumoresferas. Observamos que las células que sobreexpresaban NAMPT tendieron a formar un mayor porcentaje de clones y de tumoresferas en comparación con las células EV (vector vacío), sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (**Figura 13B y C**). Analizamos la expresión de varios genes relacionados con el fenotipo de célula madre tumoral mediante RT-qPCR. Las células que sobreexpresaban NAMPT tenían una mayor expresión de todos los genes analizados, especialmente *SOX2* y *NANOG*. Sin embargo, no encontramos diferencias claras en el caso de la línea Detroit-562 (**Figura 13D**).

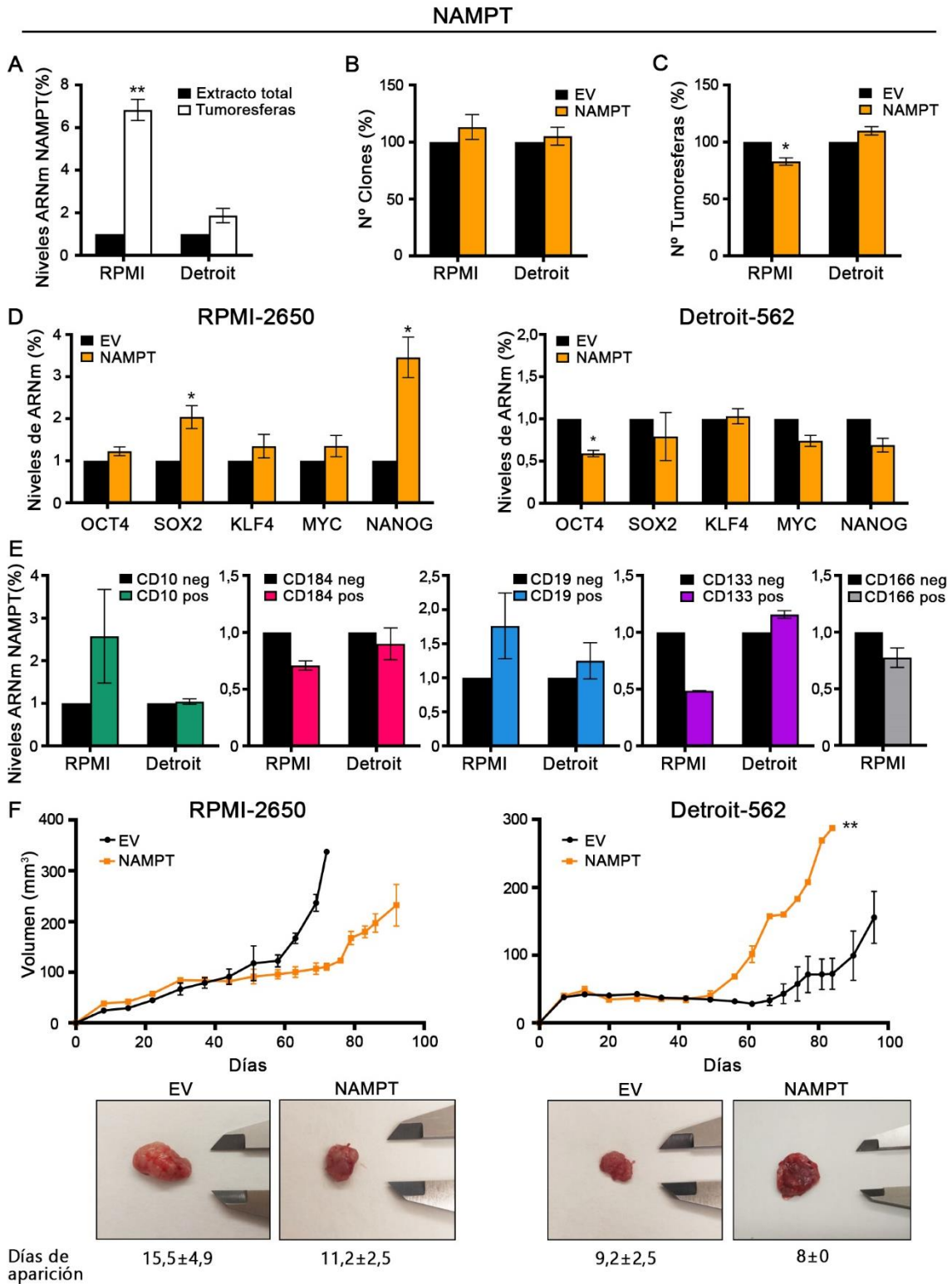


Figura 13. NAMPT, un marcador común de célula madre tumoral en CCyC. A) Niveles de expresión de *NAMPT* en extracto total y tumoresferas de las líneas celulares RPMI-2650 y Detroit-562. **B)** Ensayo de clonabilidad, **C)** Ensayo de formación de tumoresferas y **D)** Niveles de expresión de genes relacionados con el fenotipo de célula madre en las células EV y sobreexpresión de *NAMPT*. **E)** Niveles de expresión de *NAMPT* en las subpoblaciones CD10, CD184, CD19, CD133 y CD166 negativas y positivas previamente aisladas por el citómetro. **F)** Crecimiento tumoral *in vivo* en xenotransplantes (N=4) de las células EV y sobreexpresión de *NAMPT*. Se muestra imágenes representativas de los tumores y los días que tardaron en aparecer. Los resultados se expresan en niveles normalizados al EV (1% o 100%). Se representa la media ± SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Posteriormente, comprobamos los niveles de expresión de *NAMPT* en las distintas subpoblaciones positivas y negativas para los marcadores propuestos anteriormente que habían sido previamente aisladas por citómetro. Observamos que las subpoblaciones CD10 y CD19 positivas de RPMI-2650 y las subpoblaciones CD133 positivas de Detroit-562 expresaban altos niveles de *NAMPT* en comparación con las subpoblaciones negativas (**Figura 13E**). Por último, generamos modelos de xenotransplantes en ratones inmunodeprimidos para validar el efecto *in vivo* de *NAMPT*. Para ello, se inyectaron 2 millones de células de la línea RPMI-2650 y 1 millón de células de la línea Detroit-562 en el flanco derecho de 4 ratones. Observamos que los tumores generados a partir de las células RPMI-2650 con *NAMPT* sobreexpresado crecieron más lento que los tumores formados por las células controles. Mientras que los tumores originados a partir de las células Detroit-562 con *NAMPT* sobreexpresado crecieron de forma más rápida y agresiva. En ambos casos, los tumores de las células con *NAMPT* sobreexpresado aparecieron antes (**Figura 13F**). Todos estos datos sugieren que *NAMPT* podría ser un marcador tumoral de las distintas subpoblaciones de CSC en CCyC.

A continuación, estudiamos la posible relevancia clínica de los marcadores propuestos (CD10, CD184, CD19, CD133 y *NAMPT*) en CCyC. Para ello, analizamos la supervivencia global de pacientes con CCyC de la base de datos *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), N=520. En los Kaplan-Meier, pudimos observar una reducción de la supervivencia global en el grupo de pacientes con alto nivel de expresión de *CD133*, *CD166* y *NAMPT*. La reducción de la supervivencia de los pacientes era bastante importante en el caso de *NAMPT* (**Figura 14**), lo que sugiere que *NAMPT* podría ser un indicador de mal pronóstico en CCyC.

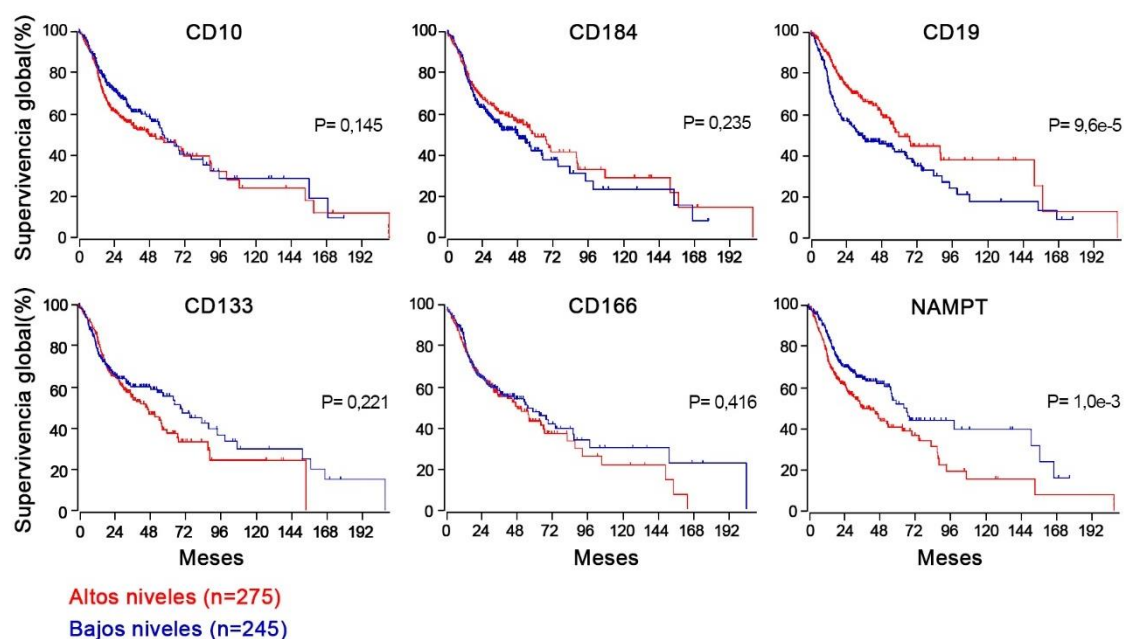


Figura 14. Supervivencia global de pacientes con CCyC de la base de datos TCGA. Curvas Kaplan-Meier que representan la supervivencia global de grupos de pacientes con altos y bajos niveles de expresión de los genes *CD10*, *CD184*, *CD19*, *CD133*, *CD166* y *NAMPT* en CCyC de la base de datos TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), N=520.

2. Estudio del papel funcional de NAMPT en líneas celulares de CCyC

2.1. Efecto de reducción de los niveles de NAMPT en líneas celulares de CCyC

Estudiamos el efecto de la reducción de los niveles de NAMPT en nuestros modelos celulares de CCyC. Para ello, generamos modelos *knock-down* (o reducción de expresión) utilizando el sistema CRISPR-Cas9 (del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – associated protein 9*), ya que estos modelos son más estables que los que se generan utilizando un shARN (horquilla corta de ARN). La secuencia diana del sgARN (ARN de guía única quimérico) del plásmido que utilizamos se localiza en el exón 10 del gen *NAMPT*, específicamente a la secuencia CTTTACATAGGACGCCAGCA, afectando exclusivamente a la expresión de la variante principal. Una vez generados los clones de los CRISPRs (siguiendo el protocolo detallado en el apartado 2.4 de materiales y métodos), analizamos la expresión de la proteína de NAMPT mediante *Western-blot* para comparar la expresión de cada clon de CRISPR con la expresión de la línea celular parental que nos sirvió de control. No encontramos clones con la eliminación completa de la proteína. No obstante, de cada línea celular, elegimos los dos clones de CRISPRs que presentaban la menor expresión de la proteína: elegimos los clones 46 y 48 de la línea celular RPMI-2650 y los clones 11 y 16 de la línea Detroit-562 (**Figura 15A**). A continuación, comprobamos la actividad biológica de los CRISPRs mediante la cuantificación de NAD total y NAD⁺. Observamos una disminución significativa de los niveles de NAD (total y NAD⁺) en los CRISPRs de ambas líneas, lo que sugiere que la actividad enzimática de NAMPT estaba reducida (**Figura 15B**). Los clones seleccionados fueron secuenciados y, a partir de la secuencia obtenida, pudimos hacer una simulación de la secuencia de aminoácidos de la proteína mediante el software SnapGene (**Figura 16**).

Una vez comprobado que los CRISPRs producían menor cantidad de proteína NAMPT y que la actividad de ésta se encuentra comprometida, realizamos una serie de ensayos funcionales para estudiar algunas propiedades tumorigénicas de los CRISPRs en las líneas de CCyC. En primer lugar, realizamos una curva de crecimiento para estudiar la tasa de proliferación celular. Curiosamente, los CRISPRs R46 y R48 de la línea RPMI-2650 crecían significativamente más lentos que las células parentales los primeros días, sin embargo, tras pasar unos días, recuperaban la capacidad proliferativa. El CRISPR D16 de la línea Detroit-562 crecía más lento en los últimos días del ensayo, mientras que el CRISPR D11 mostraba una velocidad de proliferación bastante similar al de las células parentales de esta línea (**Figura 17A**). Luego, realizamos un ensayo de clonabilidad para medir la capacidad de las células para formar clones en ausencia de contacto celular. Observamos que los CRISPRs de ambas líneas formaban menor número de clones que las células parentales (**Figura 17B**).

Posteriormente, realizamos un ensayo de competición de los CRISPRs de NAMPT. El objetivo de este ensayo fue el de estudiar la capacidad que tienen las células de competir entre sí por las mismas condiciones ambientales. Para ello, transfectamos las células con un plásmido que expresa la proteína verde fluorescente (GFP), luego, seleccionamos las células con la droga

correspondiente y las separamos mediante citometría de flujo para obtener un cultivo más puro. A continuación, sembramos en una placa la misma cantidad de células transfectadas con el vector vacío y células con los CRISPR de NAMPT y la proteína GFP. Mantuvimos este cocultivo durante 30 días. Mediante citometría de flujo, analizamos el porcentaje de células que expresan GFP al inicio (día 0) y al final del mes (día 30). Observamos que en los cocultivos EV+R46-GFP, EV+R48-GFP había un menor porcentaje de células GFP positivas a los 30 días, mientras que no se observaron diferencias en el cocultivo EV+D11-GFP (**Figura 18**). Este dato podría explicarse si tenemos en cuenta que las células del CRISPR D11 crecen de manera muy similar a las células parentales de la línea Detroit-562.

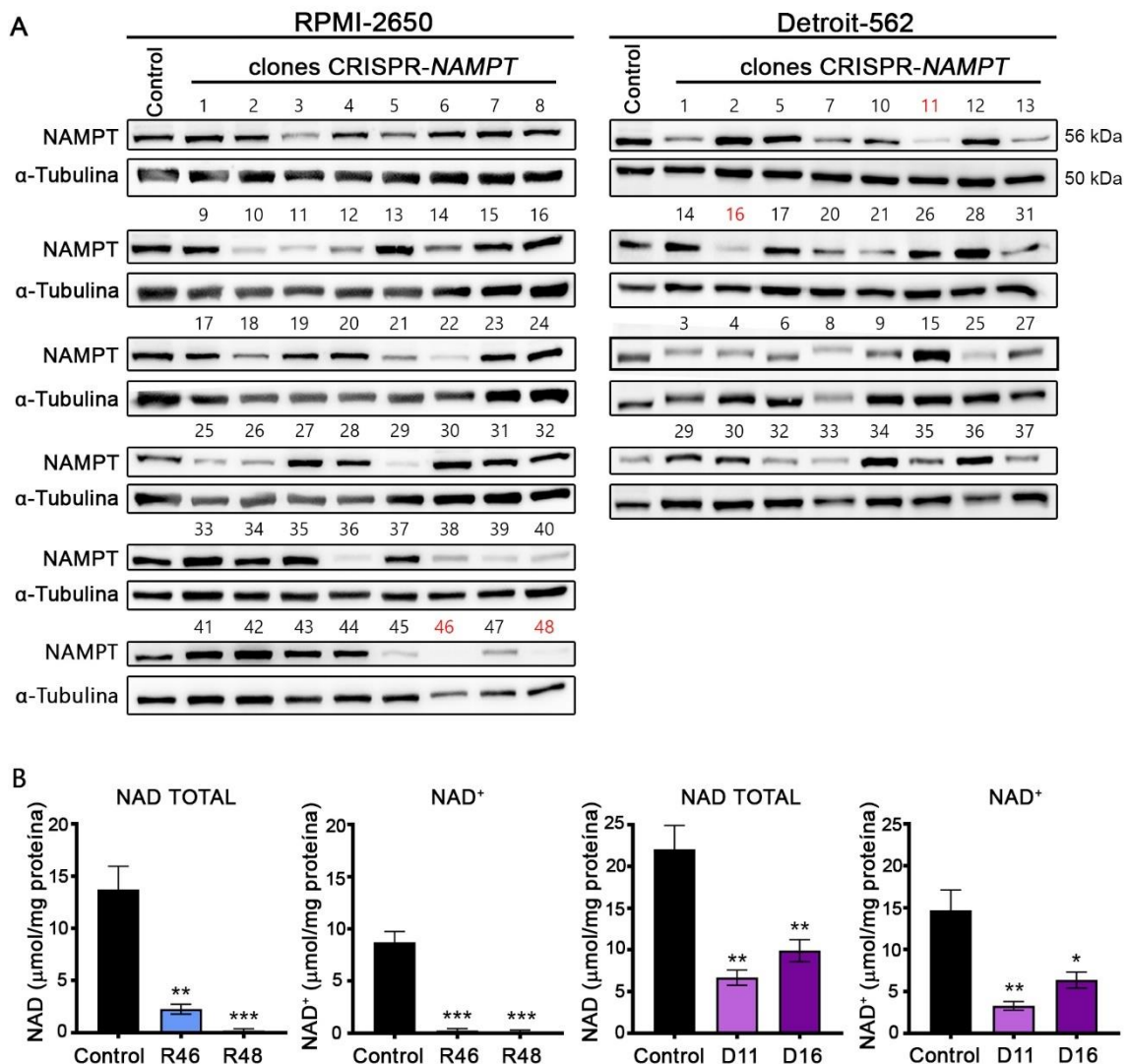


Figura 15. Generación y validación de los CRISPRs de NAMPT en las líneas celulares CCyC. A) Comprobación a nivel proteico de los CRISPRs de NAMPT por *Western-blot*. Se seleccionaron los clones marcados en rojo: 46 y 48 de la línea RPMI-2650, y 11 y 16 de la línea Detroit-562. **B)** Comprobación de la actividad biológica de los CRISPRs seleccionados por cuantificación de los niveles de NAD total y NAD⁺. Los resultados que se expresan en % se debe a que se ha normalizado el control al 1%. Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

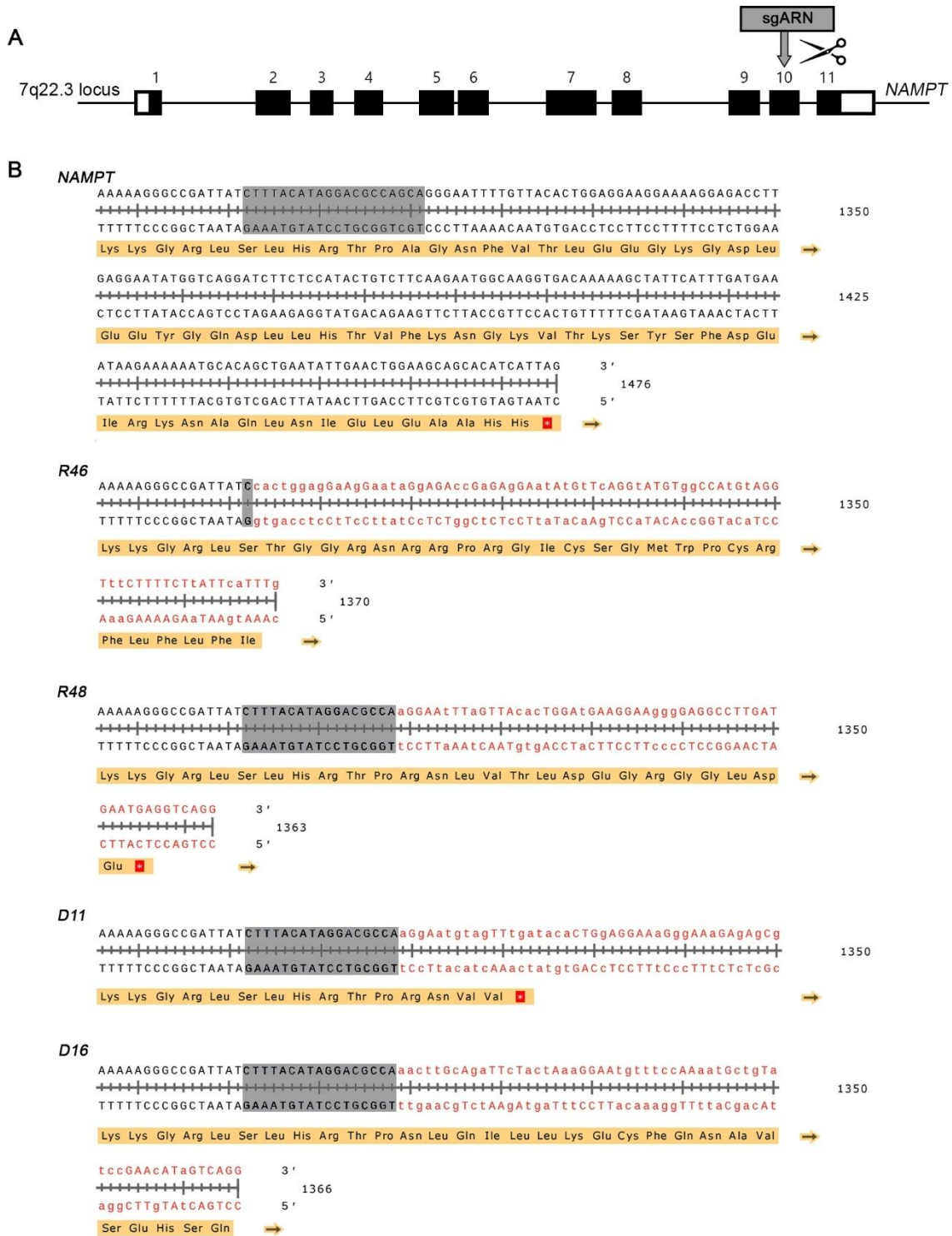


Figura 16. Simulación de la secuenciación de los clones de los CRISPRs de NAMPT en las líneas celulares de CCyC. A) Esquema de la secuencia diana del sgARN del sistema CRISPR-Cas9. **B)** Secuenciación de la parte del ADN que contiene la secuencia sgARN (marcada en celeste) de los clones R46 y R48 de la línea RPMI-2650, y de los clones D11 y D16 de la línea Detroit-562. Tras la secuencia sgARN, le sigue la secuencia de nucleótidos modificada por el corte de Cas9 (en rojo) y aminoácidos.

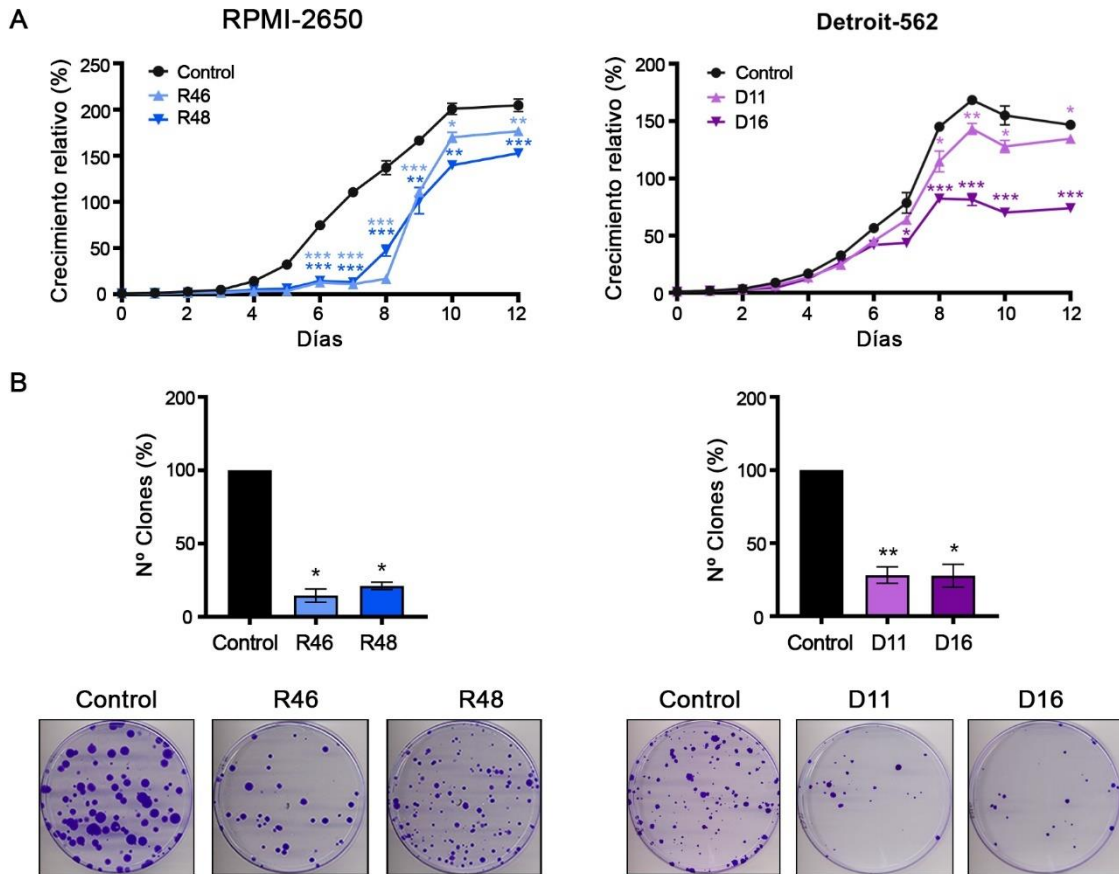


Figura 17. Efecto de los CRISPRs de NAMPT en la capacidad proliferativa y la capacidad de formación de clones en las líneas celulares de CCyC. A) Representación de las curvas de crecimiento de las células que sobreexpresan las diferentes variantes de NAMPT en las líneas RPMI-2650 y Detroit-562. Se representa la media \pm SD. **B)** Ensayo de clonabilidad de los CRISPRs de NAMPT. Los resultados se expresan en niveles normalizados al control (100%). Se representa la media \pm SEM. Se muestran imágenes representativas de las placas teñidas con cristal violeta. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

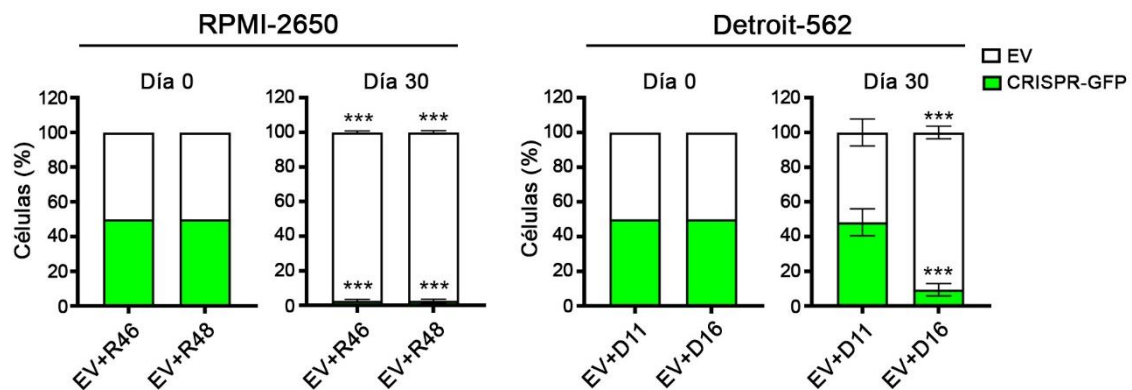


Figura 18. Efecto de los CRISPRs de NAMPT en la capacidad de competición en las líneas celulares de CCyC. Se realizó un ensayo de competición en el que se transfectaron las células de los CRISPRs de NAMPT con un plásmido que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). Se sembró la misma cantidad de células EV y de células transfectadas con GFP, y se subcultivaron durante 30 días. El % de células de color verde se midió el día 0 y el día 30. Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) comparando los porcentajes del día 30 frente a los del día 0.

Tras validar el efecto tumorigénico *in vitro* de los CRISPRs de NAMPT, decidimos realizar un ensayo *in vivo* en el que generamos modelos de xenotransplantes de cada línea celular en ratones inmunodeprimidos. Para ello, inyectamos 2 millones de células de la línea RPMI-2650 y 1 millón de células de la línea Detroit-562 en el flanco derecho de 4 ratones. Observamos que los tumores formados a partir de las células de los CRISPRs de NAMPT crecieron más lento que los tumores originados a partir de las células parentales (**Figura 19**).

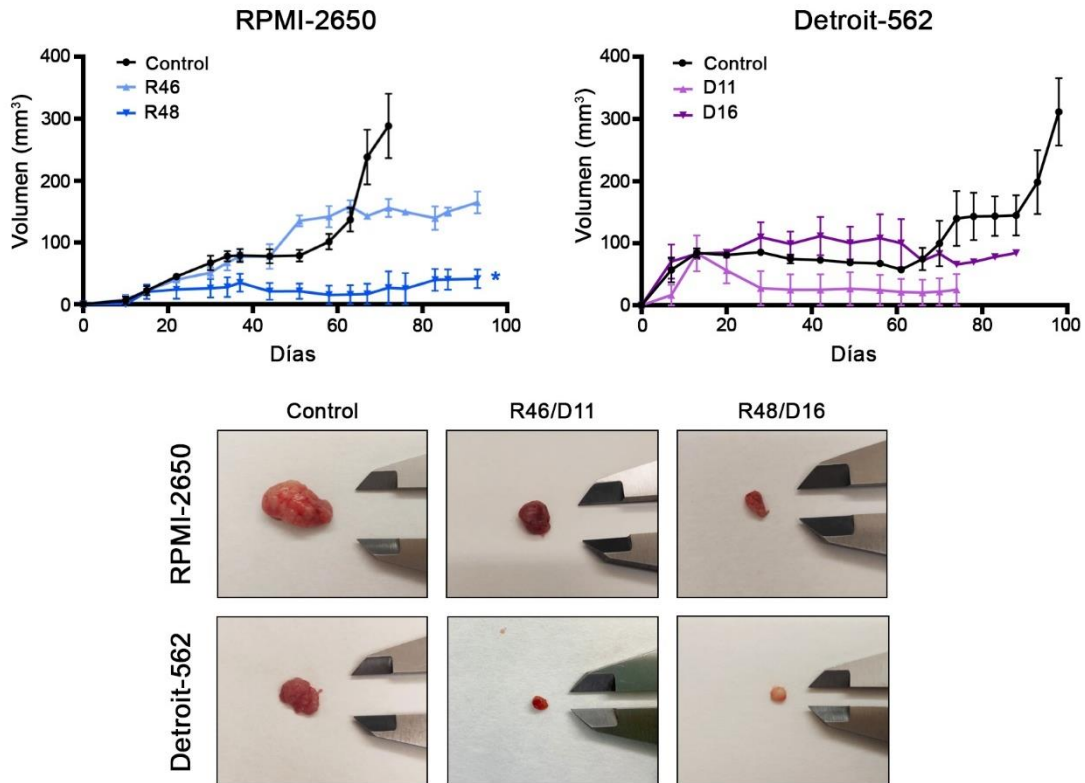


Figura 19. Efecto de los CRISPRs de NAMPT en el crecimiento tumoral *in vivo* en xenotransplantes de las líneas celulares de CCyC. Se realizaron xenotransplantes en ratones inmunodeprimidos (N=4). Se muestran las gráficas del crecimiento tumoral de los tumores, así como una foto representativa del tumor de cada condición. Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2.2. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en el fenotipo de célula madre en líneas celulares de CCyC

En la literatura, se ha descrito que NAMPT favorece la adquisición de las propiedades típicas de las células CSC, enriqueciendo esta subpoblación tumoral.^{1,42,43,45} En el primer apartado estudiamos que NAMPT podría ser un marcador de CSC en CCyC. Por consiguiente, decidimos realizar una serie de ensayos para estudiar el efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en el fenotipo de CSC en nuestros modelos celulares de CCyC. En primer lugar, realizamos un ensayo de clonabilidad para analizar el fenotipo de los clones formados en ausencia de contacto celular. Los clones se pueden clasificar en: holoclonos, enriquecidos en células con propiedades de células madre y capaces de reconstituir el cultivo; paraclones, formados por células más

diferenciadas e incapaces de reconstituir el cultivo; y meroclones, compuestos por células con características intermedias entre holoclones y paraclones¹⁶⁹⁻¹⁷². Observamos que los CRISPRs de NAMPT de la línea RPMI-2650 formaron un menor porcentaje de holoclones y un mayor porcentaje de paraclones en comparación con las células parentales. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en los clones generados por las células que sobreexpresaban NAMPT. Los CRISPRs de la línea Detroit-562 también tendieron a formar un menor porcentaje de holoclones y un mayor porcentaje de paraclones, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Las células Detroit-562 que sobreexpresaban NAMPT formaron un mayor porcentaje de holoclones y un menor porcentaje de paraclones de manera significativa (**Figura 20**).

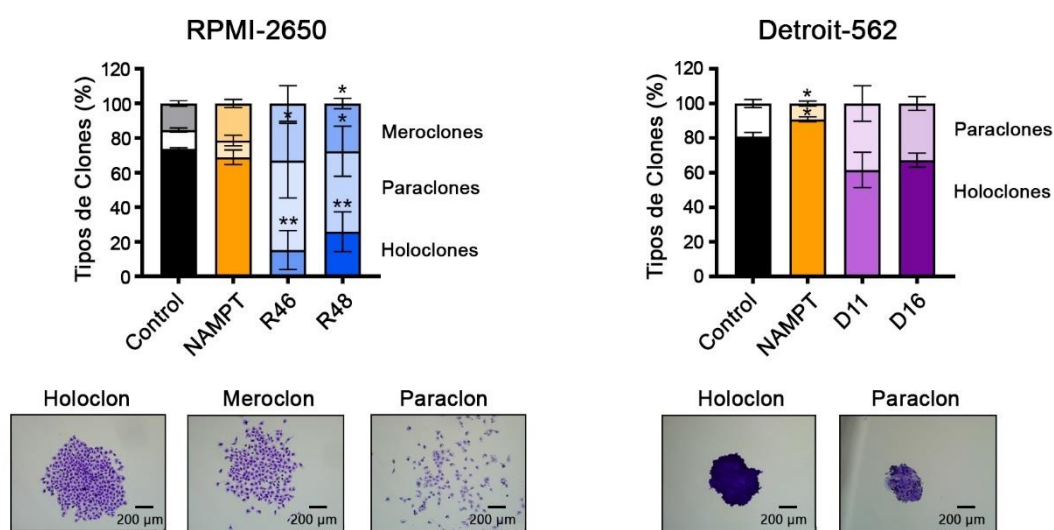


Figura 20. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en el fenotipo de los tipos de clones en las líneas celulares de CCyC. Se analizaron los diferentes tipos de clones formados en el ensayo de clonabilidad en las líneas RPMI-2650 y Detroit-562. Se muestra el porcentaje de cada fenotipo (holoclon, meroclon y paraclon) de clon, así como imágenes representativas de cada fenotipo. Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A continuación, estudiamos la capacidad de formación de tumoresferas de las células con NAMPT sobreexpresado y los CRISPRs de NAMPT en nuestras líneas celulares. Para ello, se sembró una única célula por pocillo de la línea RPMI-2650 para analizar el porcentaje de células que formaban una tumoresfera capaz de reconstituir la población celular. Y se sembraron 20.000 células de la línea Detroit-562 para cuantificar el porcentaje de tumoresferas formadas 72 horas después. Observamos una menor eficiencia de la formación de tumoresferas tanto en los CRISPRs como en las células que sobreexpresaban NAMPT en la línea RPMI-2650. Por otra parte, las células Detroit-562 con NAMPT sobreexpresado formaron un mayor porcentaje de tumoresferas, aunque de manera no significativa. Mientras que los CRISPRs de esta línea formaron un menor porcentaje de tumoresferas, especialmente en el caso del CRISPR D16 (**Figura 21A**). En cuanto al tamaño, las tumoresferas generadas por las células con NAMPT sobreexpresado y los CRISPRs de ambas líneas tenían un área menor en comparación con las tumoresferas de las células parentales

(Figura 21B y C). Posteriormente, medimos la expresión de los factores de Yamanaka (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC*)¹²¹ y otros factores de transcripción (*NANOG*, *BMI1*, *SOX9*) implicados en rutas de señalización que regulan la pluripotencia de las células madre¹¹⁷⁻¹²². Observamos que las células RPMI-2650 que sobreexpresaban NAMPT mostraban una mayor expresión de todos los factores de Yamanaka, *NANOG* y *SOX9*, mientras que los CRISPRs R46 y R48 tenían una menor expresión de *SOX2* y *KLF4*. Sin embargo, no observamos diferencias claras en la línea Detroit-562 **(Figura 22).**

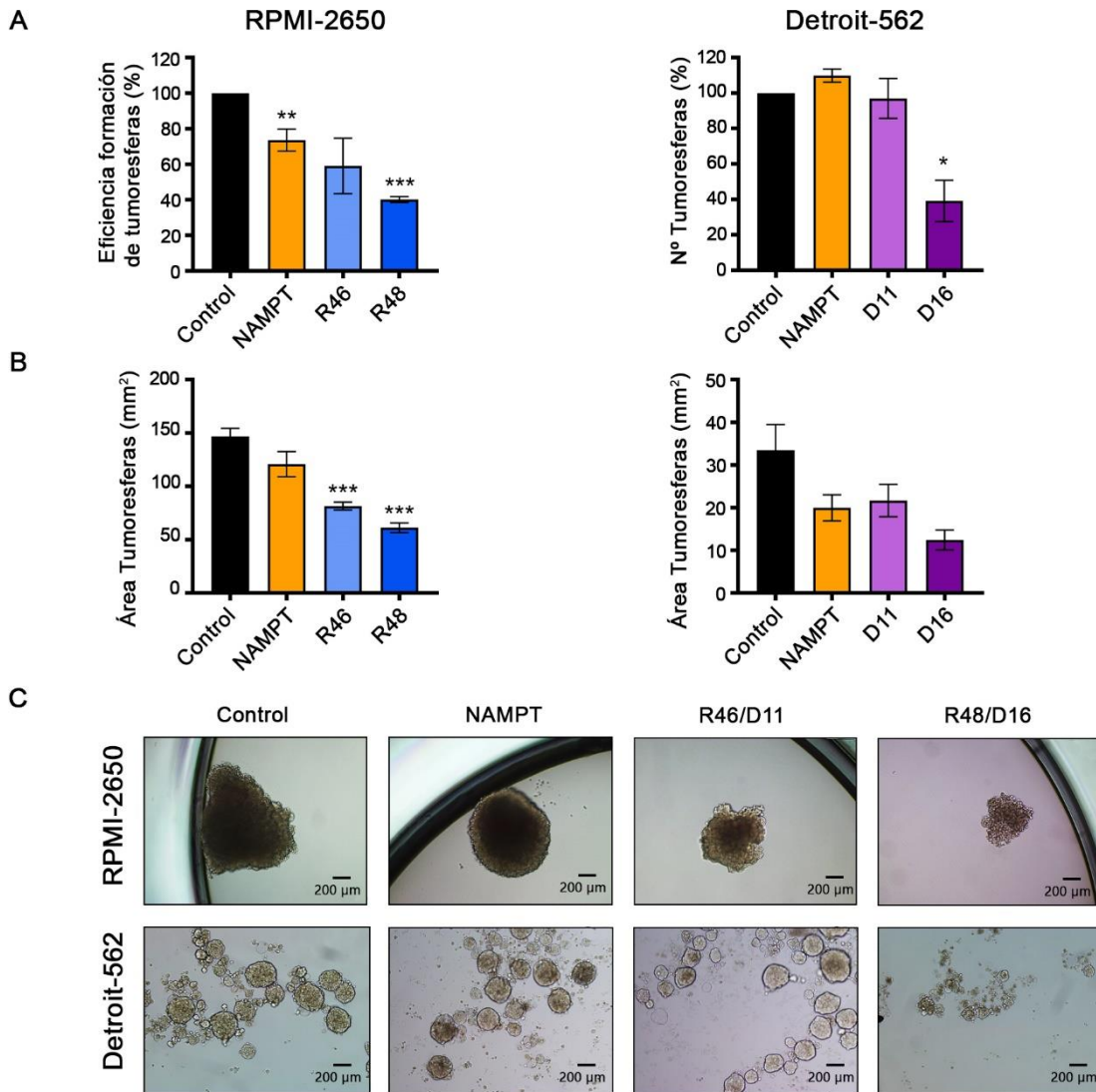


Figura 21. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en la formación de tumoresferas en las líneas celulares de CCyC. **A)** Ensayo de formación de tumoresferas a partir de una célula aislada en la línea RPMI-2650 y ensayo de formación de tumoresferas en la línea Detroit-562 **B)** Tamaño de las tumoresferas formadas en ambas líneas celulares **C)** Imágenes representativas de las tumoresferas generadas en cada condición. Los resultados se expresan en niveles normalizados al control (100%). Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

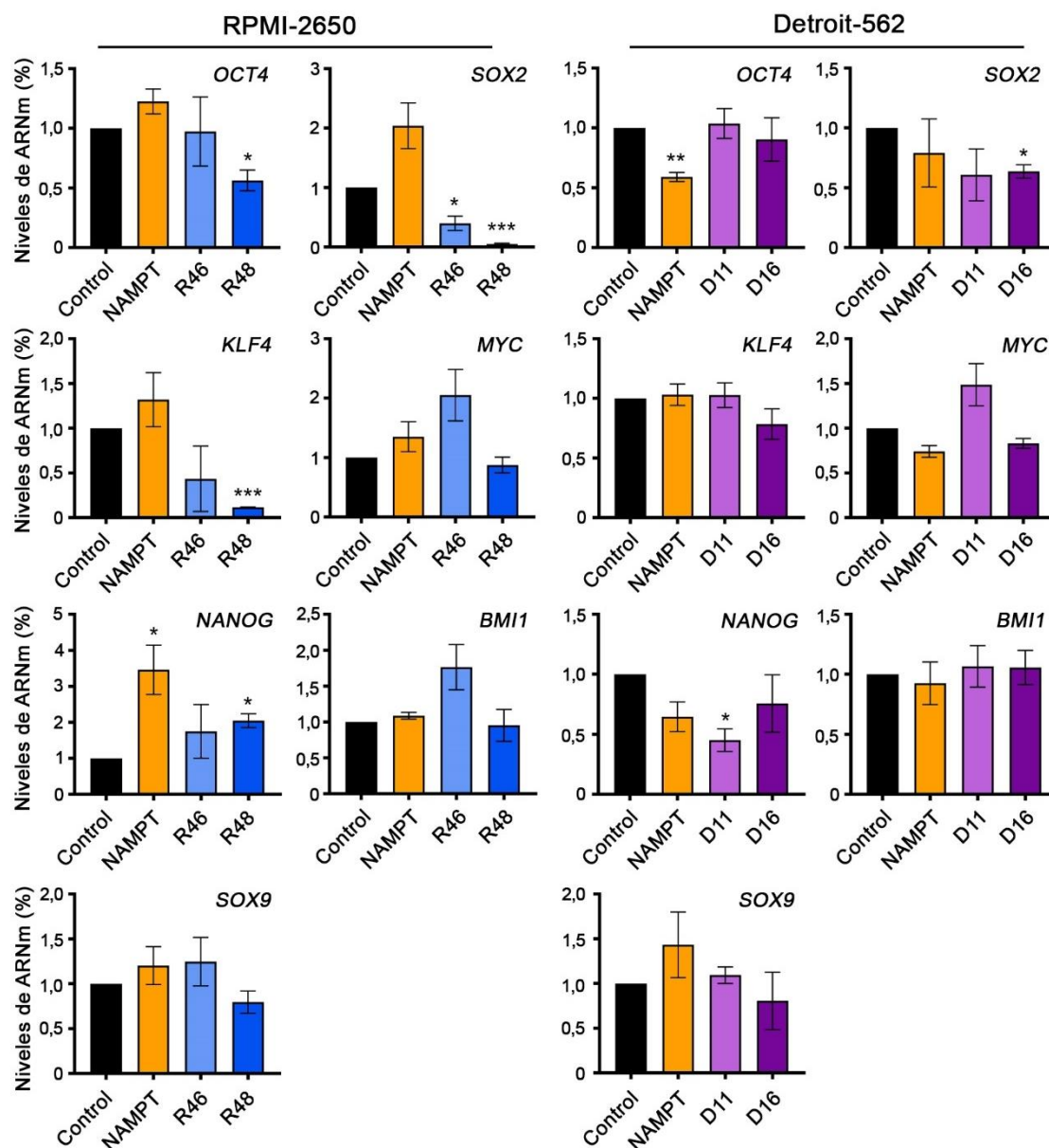


Figura 22. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en la expresión de genes relacionados con el fenotipo de célula madre tumoral en las líneas celulares de CCyC. Se cuantificaron los niveles de ARNm de los genes *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *MYC*, *NANOG*, *BMI1* por RT-qPCR. Los resultados se expresan en niveles normalizados al control (1%). Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A continuación, analizamos por citometría de flujo (FACS) el porcentaje de las subpoblaciones positivas para los marcadores que propusimos en el anterior apartado: CD10, CD184, CD19, CD133 y CD166. Observamos que las células RPMI-2650 que sobreexpresaban NAMPT mostraban un mayor porcentaje de células CD10 y CD19 positivas, mientras que los CRISPRs presentaban un menor porcentaje de células CD10, CD184, CD19, CD133 y CD166 positivas en comparación con las células parentales. La reducción observada de la subpoblación CD166 positiva de los CRISPRs fue bastante llamativa. De manera similar, las células Detroit-562 con NAMPT sobreexpresado mostraban un mayor porcentaje de células CD10 y CD184 positivas, mientras que los CRISPRs presentaban un menor porcentaje de células CD10, CD184 y CD19 positivas. Toda la población

celular de la línea Detroit-562 fue positiva para el marcador CD166, lo que confirma que CD166 no es un marcador específico de CSC en esta línea, al igual que el marcador CD44, que tampoco es específico para ambas líneas (**Tabla 9**). Estos resultados apoyan la propuesta de NAMPT como un posible marcador común de CSC en nuestras líneas de CCyC.

Tabla 9. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en la expresión de marcadores de CSC por citometría de flujo (FACS) en las líneas celulares de CCyC.

	(%±SD)	CD10+	CD184+	CD19+	CD133+	CD166+	CD44+
RPMI-2650	Control	1,018±0,27	0,801±0,73	1,721±1,45	0,056±0,12	60,75±1,48	99,68±0,20
	NAMPT	2,061±0,25	0,498±0,34	3,009±1,49	0,006±0,01	63,50±4,66	99,60±0,11
	R46	0,409±0,38	0,358±0,25	0,629±0,65	0,006±0,01	17,49±9,97	99,92±0,01
	R48	0,074±0,11	0,240±0,20	0,556±0,53	0,01±0,01	15,82±1,36	99,93±0,01
Detroit-562	Control	0,609±0,41	0,185±0,10	0,388±0,28	0,049±0,05	99,63±0,23	99,76±0,17
	NAMPT	2,935±1,14	0,527±0,52	0,216±0,05	0,017±0,01	99,82±0,14	99,85±0,16
	D11	0,065±0,05	0,139±0,02	0,178±0,13	0,041±0,03	99,79±0,20	99,31±0,54
	D16	0,099±0,12	0,065±0,03	0,226±0,17	0,022±0,02	99,66±0,30	99,69±0,24

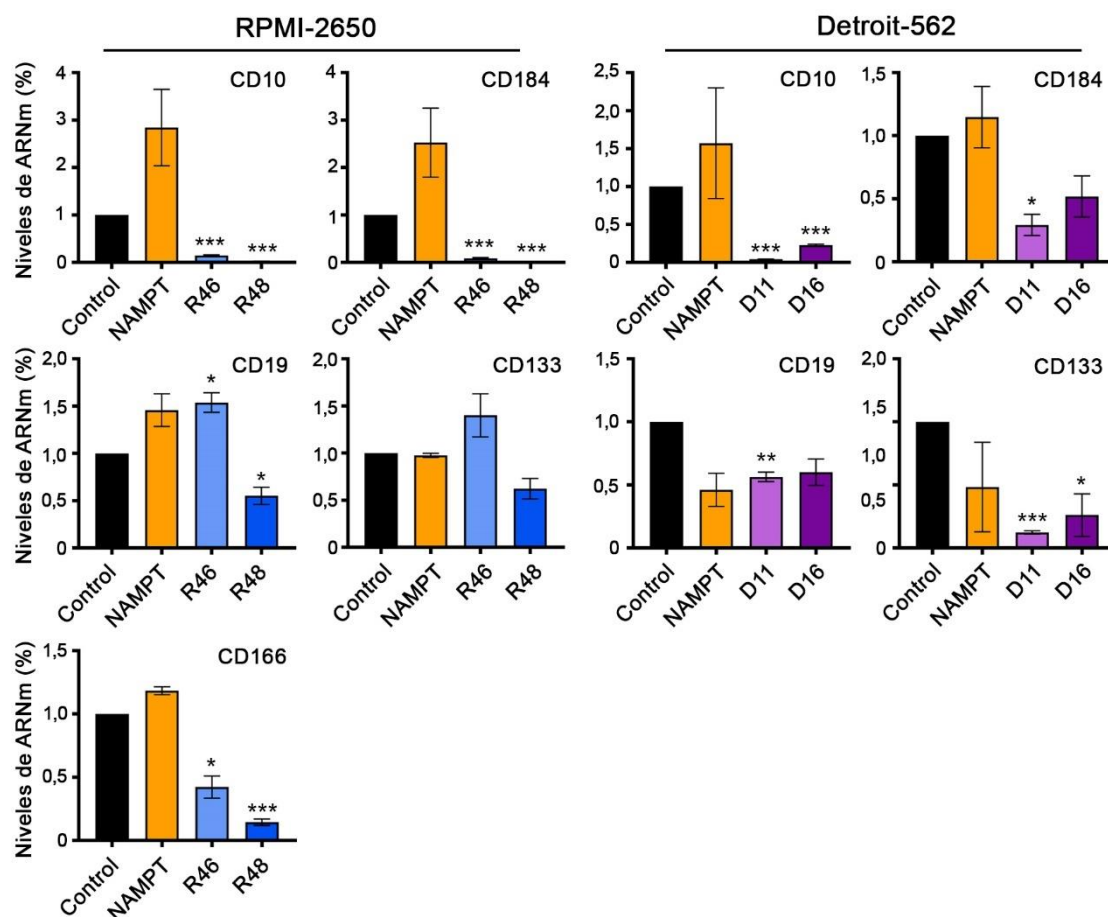


Figura 23. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en la expresión de los genes marcadores de CSC en las líneas celulares de CCyC. Se cuantificaron los niveles de ARNm de los genes *CD10*, *CD184*, *CD19*, *CD133* y *CD166* por RT-qPCR. Los resultados se expresan en niveles normalizados al control (1%). Se representa la media ± SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Quisimos verificar a nivel transcripcional los datos obtenidos del análisis de los marcadores por citometría. Observamos que las células RPMI-2650 que sobreexpresaban NAMPT tenían una mayor expresión de *CD10*, *CD184*, *CD19* y *CD166*, mientras que los CRISPRs expresaban menos *CD10*, *CD184* y *CD166* en comparación con las células parentales. De manera similar, las células Detroit-562 que sobreexpresaban NAMPT tenían una mayor expresión de *CD10* y *CD184*, mientras que los CRISPRs expresaban menos *CD10*, *CD184*, *CD19* y *CD133* (**Figura 23**). Mediante secuenciación NGS se realizó un análisis transcriptómico para identificar los genes comunes a los marcadores CD10, CD184, CD19 y NAMPT en nuestras líneas celulares de CCyC. Se analizaron los genes diferenciales entre las células positivas y negativas para los marcadores y las células con la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT. Encontramos varios genes relacionados con tumorigénesis, proliferación celular, metástasis y resistencia al tratamiento. Y se obtuvieron 3 genes diferenciales comunes: *DDX3X*, *NFE2L1* y *GLUL* (**Tabla 10 y Figura 24A**). El gen *DDX3X* regula el ciclo celular, apoptosis, transcripción, exportación y translación del ARN. Está involucrado en el proceso tumorigénesis y metástasis, siendo un factor clave en las vías de señalización de WNT y CTNNB1.^{214,215} El gen *NFE2L1* está implicado en la respuesta al estrés oxidativo, respuesta inflamatoria, proceso de diferenciación y mantenimiento de la proteostasis,²¹⁶ y participa en la vía de señalización de mTOR.²¹⁷ El gen *GLUL* codifica a la proteína glutamina sintetasa que cataliza la síntesis de glutamina a partir de glutamato y amonio.²¹⁸ Las células tumorales dependen del metabolismo de la glutamina para la síntesis de otros aminoácidos no esenciales, GSH, NADPH y ácidos nucleicos.^{1,31,33-35}

Tabla 10. Genes diferenciales de las subpoblaciones CD10, CD184, CD19 y NAMPT obtenidos del análisis transcriptómico. Oncogenes (en rojo), genes supresores de tumores (en azul), genes ambiguos que pueden actuar como oncogenes o supresores dependiendo del tipo de cáncer (en verde).

NAMPT CD10		NAMPT CD184		NAMPT CD19	NAMPT CD10 CD184	NAMPT CD10 CD184 CD19
<i>NFYC</i>	<i>PAPSS1</i>	<i>ZNF74</i>	<i>GUCD1</i>	<i>PTK2</i>	<i>C1QBP</i>	<i>MELK</i>
<i>EIF3C</i>	<i>MED17</i>	<i>VDAC2</i>	<i>TOM1L1</i>	<i>TXNRD2</i>	<i>DGKZ</i>	<i>PKM</i>
<i>KIF1B</i>	<i>TUBD1</i>	<i>RHOBTB3</i>	<i>GATD1</i>	<i>RASGRP1</i>	<i>PRMT5</i>	<i>AKT2</i>
<i>ABCC5</i>	<i>RALBP1</i>	<i>YPEL5</i>	<i>CCNB1</i>	<i>NDUVF1</i>	<i>FKBP10</i>	<i>ATP5F1B</i>
<i>SEC31A</i>	<i>PIGT</i>	<i>IGFBP3</i>	<i>P4HA1</i>	<i>TP53I11</i>	<i>CD63</i>	<i>MORF4L2</i>
<i>AP2M1</i>	<i>CERS2</i>	<i>C9ORF72</i>	<i>OPA1</i>	<i>PEX13</i>	<i>DDB1</i>	<i>SAMHD1</i>
<i>PMS2</i>	<i>SCARA3</i>	<i>NARF</i>	<i>EIF4G1</i>	<i>SIN3B</i>	<i>PUM1</i>	<i>GOSR2</i>
<i>SLC35F6</i>	<i>CNIH1</i>	<i>RDX</i>	<i>SLC11A2</i>	<i>RAB5IF</i>	<i>STAU1</i>	<i>EHMT2</i>
<i>SH3GLB2</i>	<i>NFKBIA</i>	<i>MSH6</i>	<i>NAA80</i>	<i>CNOT6L</i>	<i>ZNF189</i>	<i>UACA</i>
<i>MKRN1</i>	<i>MARK3</i>	<i>RNMT</i>	<i>PHETA1</i>	<i>IL1R1</i>	<i>RPL29</i>	<i>PRMT2</i>
<i>LARP1B</i>	<i>GTF2IP1</i>	<i>RRBP1</i>	<i>FUT8</i>	<i>CCDC90B</i>	<i>MACROH2A1</i>	<i>KAT6B</i>
<i>FBXL18</i>	<i>DIABLO</i>	<i>CASP8</i>	<i>MBNL1</i>	<i>STX1A</i>	<i>ARHGAP21</i>	<i>ABCA5</i>
<i>ARHGEF10</i>	<i>DAB2</i>	<i>SHMT2</i>	<i>GIT2</i>	<i>NEDD1</i>	<i>MATR3</i>	
<i>BCS1L</i>	<i>TANGO2</i>	<i>JMJD1C</i>	<i>NR3C1</i>	<i>LINC02210</i>	<i>SIRT1</i>	
<i>TAF1C</i>	<i>FKTN</i>	<i>REPIN1</i>	<i>DERL1</i>	<i>MYH10</i>	<i>ELOVL1</i>	
<i>KMT2E</i>	<i>HIPK1</i>	<i>RXRB</i>	<i>SMIM7</i>	<i>TLCD3A</i>	<i>RIOK3</i>	
<i>GNB2</i>	<i>PRPF31</i>	<i>F11R</i>	<i>GNAI1</i>	<i>WASH6P</i>	<i>RO60</i>	
<i>ERC1</i>	<i>JUP</i>	<i>CCNL1</i>	<i>MON2</i>	<i>LIN9</i>	<i>TM2D1</i>	
		<i>SARNP</i>	<i>EPS15L1</i>	<i>PDXDC1</i>		
		<i>DOCK9</i>	<i>SCAF11</i>	<i>AURKB</i>		
		<i>DDX11</i>	<i>STX3</i>	<i>MICOS10</i>		

N=36

N=63

N=18

N=13

N=3

Por otra parte, se estudiaron los términos GO de varias categorías de los genes diferenciales entre la sobreexpresión de NAMPT y los CRISPRs obtenidos de la secuenciación NGS. Dentro de la categoría *Biological process*, los procesos más significativos, es decir, los de menor valor p, relacionados con NAMPT fueron procesos metabólicos, como por ejemplo el metabolismo de nucleósidos y de nucleótidos y procesos catabólicos de ATP y de ribonucleótidos. Estos datos confirman que NAMPT está implicado principalmente en el metabolismo de la célula. Dentro de la categoría *Molecular function*, las funciones moleculares más significativas relacionadas con NAMPT fueron la de unión a proteínas, poly(A) ARN, nucleótidos, ribonucleósidos y ATP entre otros. Y, por último, los datos obtenidos de la categoría *Cellular component* indican que NAMPT puede alterar la transcripción de componentes que forman las fibras del estrés, el centrosoma, el puente intercelular, el núcleo, etc. (Figura 24B).

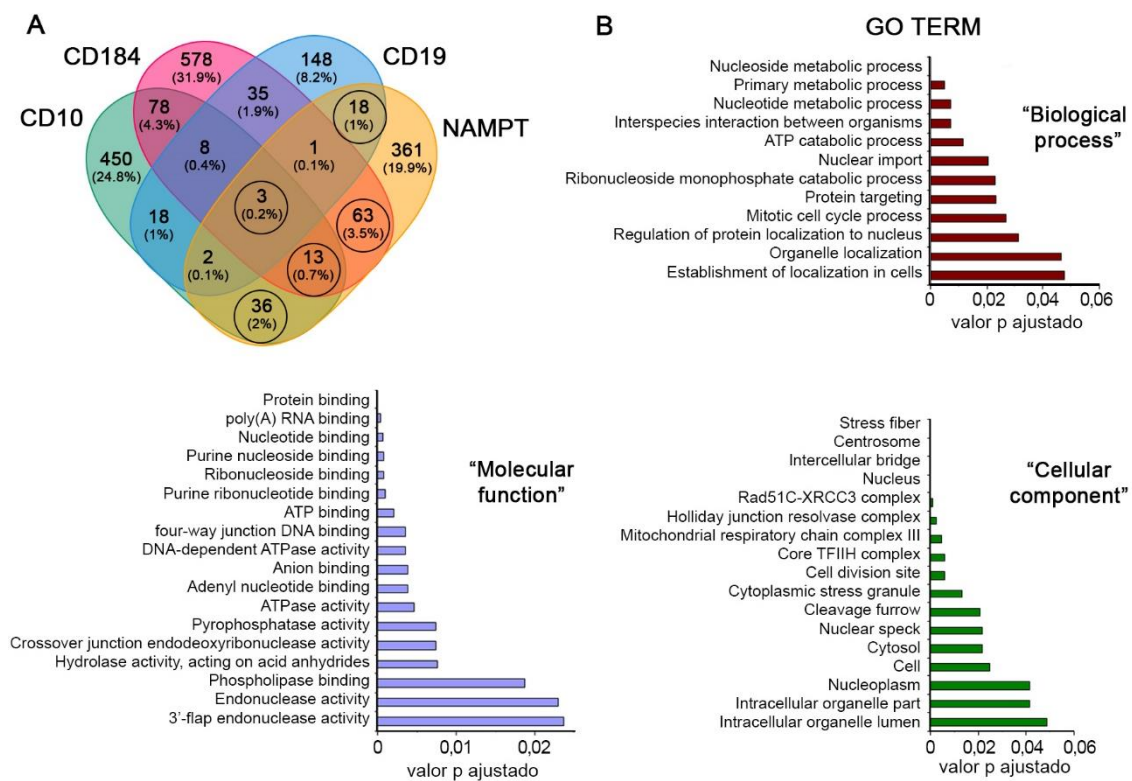


Figura 24. Análisis transcriptómico de genes comunes a CD10, CD184 y CD19 en las líneas celulares de CCyC A) Diagrama de venn de los genes obtenidos por secuenciación NGS (secuenciación de nueva generación). Se representan los genes diferencialmente expresados entre las células CD10, CD184 y CD19 positivas y negativas, y la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en las líneas RPMI-2650 y Detroit-562. B) Se realizó un análisis de los genes obtenidos utilizando los términos GO *Biological process*, *Molecular function* y *Cellular component* ($p < 0,05$).

Tras validar el efecto *in vitro* de NAMPT en el fenotipo de célula madre, decidimos realizar un ensayo *in vivo* en el que generamos modelos de xenotransplantes en ratones inmunodeprimidos a partir de tumoresferas, enriquecidas en CSC. Se sembraron 10.000 células de la línea RPMI-2650 y 20.000 células de Detroit-562 para generar tumoresferas. Las tumoresferas formadas se inyectaron en el flanco derecho de 4 ratones. Observamos que los tumores originados a partir de las tumoresferas de los CRISPRs de NAMPT de la línea RPMI-2650 fueron de menor tamaño. La

eficiencia de formación de estos tumores fue de tan sólo el 50% y tardaron bastante tiempo en aparecer, a partir del día 44. No observamos diferencias significativas entre los tumores formados a partir de las tumoresferas con NAMPT sobreexpresado y las tumoresferas control. La eficiencia de estos tumores fue del 100% y aparecieron en torno al día 26-27. Por otra parte, los tumores originados a partir de las tumoresferas del CRISPR D16 de la línea Detroit-562 tuvieron un tamaño bastante reducido, con una eficiencia de formación de tan sólo 50% y aparecieron más tarde, a partir del día 26. Los tumores procedentes de las tumoresferas con NAMPT sobreexpresado tuvieron un mayor tamaño, aunque la diferencia con respecto a los otros tumores no fue estadísticamente significativa. Los tumores de las tumoresferas con NAMPT tuvieron una eficiencia de formación del 100% y aparecieron antes, al igual que los tumores de las tumoresferas control (**Figura 25**).

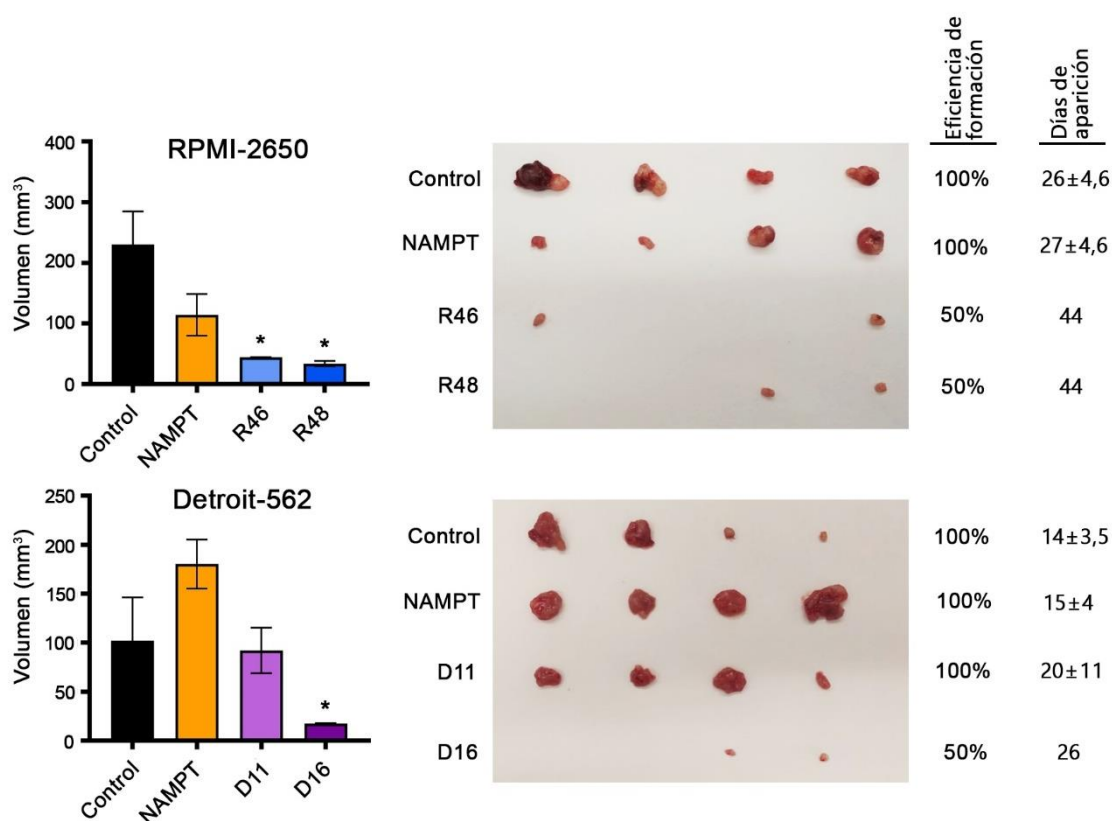


Figura 25. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en el crecimiento tumoral in vivo en xenotransplantes de tumoresferas de las líneas celulares de CCyC. Se realizaron xenotransplantes en ratones inmunodeprimidos (N=4) para analizar la capacidad de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT de formar tumores a partir de tumoresferas. Se muestran las gráficas del volumen tumoral, las imágenes representativas, la eficiencia de la formación de los tumores y los días que tardaron en aparecer los tumores. Se representa la media ± SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

2.3. Efecto de los niveles de NAMPT en la migración celular en líneas celulares de CCyC

La migración celular es una propiedad importante de las células que adquieren la transición epitelio-mesénquima (EMT). Por este motivo, quisimos estudiar el efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT de la línea celular RPMI-2650 en el proceso de migración. Para ello, realizamos un ensayo de Boyden en el que sembramos las células en ausencia de suero fetal bovino (FBS) en una cámara de 8 μ m y la colocamos en un pocillo con medio con FBS, que actúa como agente quimioatrayente. Las células que migraron se fijaron y se tiñeron a las 24 horas. Luego, se realizaron fotos por el microscopio con el objetivo X20 para el posterior recuento de las células. Observamos que las células que sobreexpresaban NAMPT migraron con mayor facilidad, mientras que los CRISPRs de NAMPT migraron menos en comparación con las células parentales (**Figura 26**). Estos resultados sugieren que NAMPT favorece el proceso de migración de las células de esta línea celular. Este ensayo no se pudo realizar en la línea Detroit-562 ya que las células no fueron capaces de migrar a través de la cámara de Boyden.

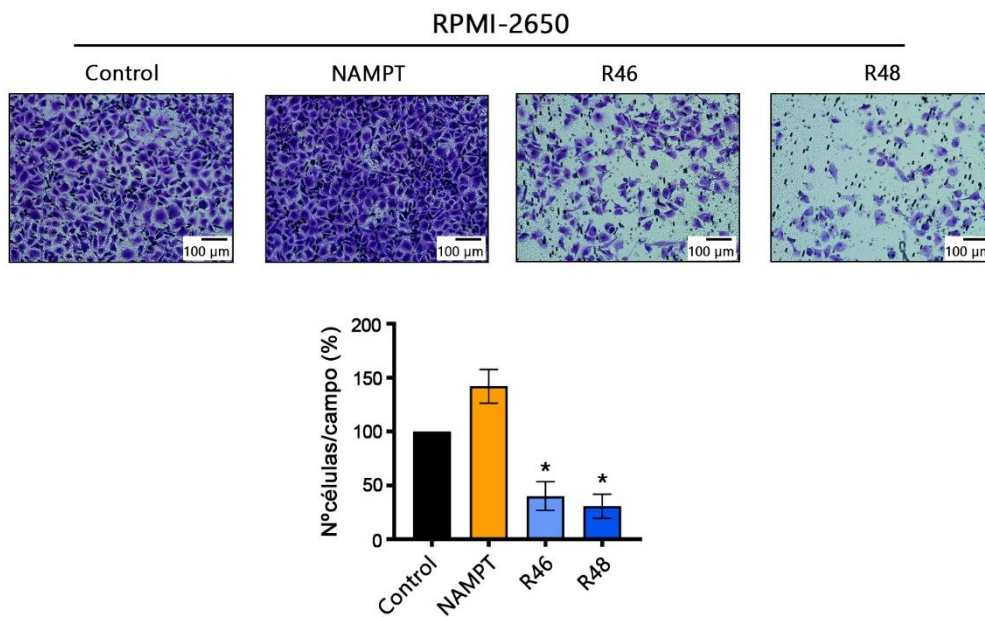


Figura 26. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en la capacidad de migración en las líneas celulares de CCyC. Se muestran imágenes al microscopio (X20) representativas de las células migratorias por el ensayo de la cámara de Boyden (8 μ m). La gráfica muestra el número de las células migratorias por campo (X20) de la línea celular RPMI-2650. Los resultados se expresan en niveles normalizados al control (100%). Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Dado que los datos del ensayo de migración sugieren que NAMPT puede favorecer el proceso migratorio de las células tumorales, quisimos medir la expresión de algunos genes implicados en la transición epitelio-mesénquima. Los genes *SNAI1*, *TWIST1*, *FOXC2*, *VIM*, *CDH1* y *CDH2* están implicados en la migración celular, la metástasis y la aparición de células madre tumorales²¹⁹⁻²²¹. Observamos que las células RPMI-2650 que sobreexpresaban NAMPT tenían una mayor expresión de *TWIST1*, *VIM* y *CDH2*, mientras que los CRISPRs expresaban más *CDH1*, especialmente el

CRISPR R48, y expresaban menos *FOXC2*, *VIM* y *CDH2*. Por otra parte, las células Detroit-562 que sobreexpresaban NAMPT tenían una mayor expresión de *FOXC2*, *CDH1* y *CDH2*, mientras que los CRISPRs expresaban menos *FOXC2* y *CDH1* (Figura 27).

A continuación, quisimos ampliar el estudio de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima mediante un PCR-array con una matriz de genes prediseñada. Con este array, además de *CDH2*, hallamos otros 3 genes comunes a las dos líneas celulares: *GSC*, *TWIST1* y *VIM* (Figura 28A). El gen *GSC* también está implicado en la migración celular y en la transición epitelio-mesénquima favoreciendo la metástasis de las células tumorales.^{222,223} Adicionalmente, correlacionamos la lista de los genes del array con el gen *NAMPT* en la base de datos pública *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) de CCyC y los representamos en un diagrama de venn con los genes hallados en el array en nuestras líneas celulares. No encontramos ningún gen común entre los datos de TCGA y la línea RPMI-2650, sin embargo, obtuvimos 14 genes comunes en el caso de la línea Detroit-562. Estos genes fueron: *CDH1*, *DES11*, *MAP1B*, *TMEFF1*, *OCLN*, *TCF4*, *SMAD2*, *TFRC*, *AHNAK*, *PATP4A1*, *MSN*, *STEAP1*, *PGK1* y *F11R* (Figura 28B).

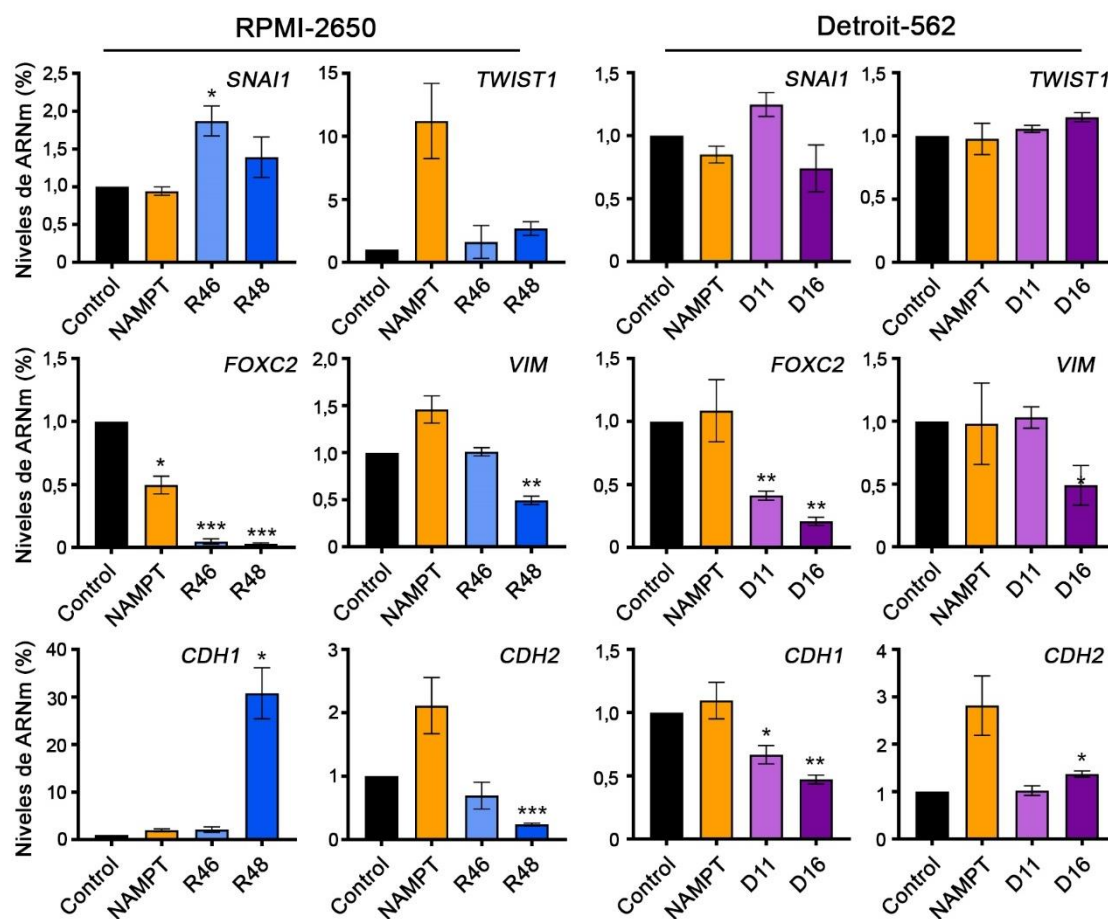


Figura 27. Efecto de la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en la expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima en las líneas celulares de CCyC. Se cuantificaron los niveles de ARNm de los genes *SNAI1*, *TWIST1*, *FOXC2*, *VIM*, *CDH1* y *CDH2* por RT-qPCR. Los resultados se expresan en niveles normalizados al control (1%). Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

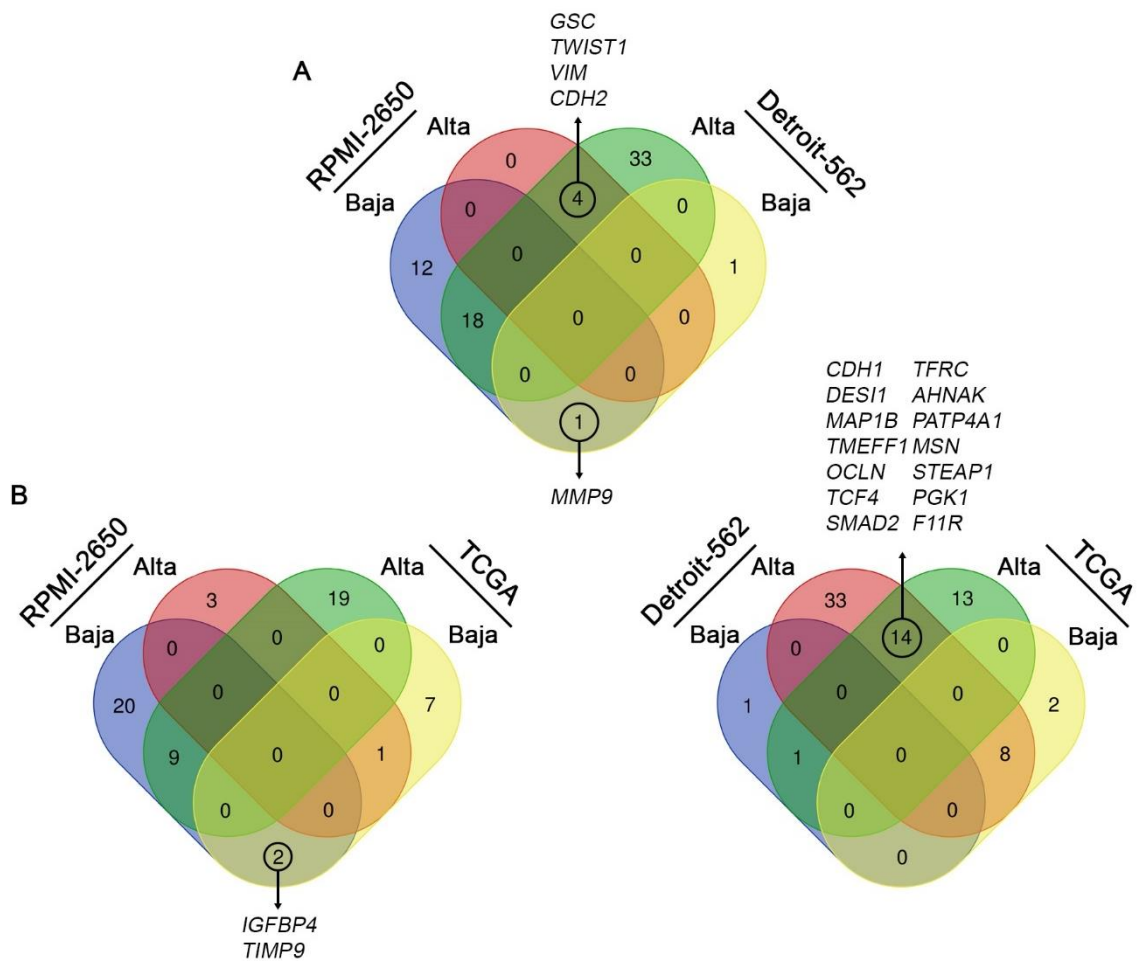


Figura 28. Análisis de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima en las líneas celulares de CCyC y la base de datos TCGA. A) Se realizó un PCR array de la expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima en las células que sobreexpresan NAMPT de las líneas celulares RPMI-2650 y Detroit-562. Los genes regulados a la alta y a la baja están representados en el diagrama de venn. B) Se representó en un diagrama de venn los genes resultantes del array de RPMI-2650 o Detroit-562 y los genes correlacionados positivamente (alta) y negativamente (baja) con NAMPT en la base de datos pública TCGA de CCyC.

2.4. Efecto de la sobreexpresión de las variantes de NAMPT en CCyC

Se han descrito 14 variantes de empalmes alternativos o *splicing* dentro del gen *NAMPT*. De todas estas variantes, solamente 4 producirían proteína: NAMPT1, NAMPT2, NAMPT3 y NAMPT4 (**Figura 29A**). La variante 1, NAMPT1, es la predominante y es la única a la que se le ha atribuido una actividad biológica.^{53,54} No obstante, quisimos estudiar el efecto de la sobreexpresión de las otras variantes menos conocidas en CCyC. Para sobreexpresar las variantes 2, 3 y 4 realizamos un subclonaje del plásmido pCMV-NAMPT-10his. Una vez obtenidos los plásmidos, transfectamos nuestras líneas celulares de CCyC con cada variante de NAMPT y un vector vacío (EV) como control. Con el objetivo de comprobar la transfección a nivel de ARNm, diseñamos tres sondas TaqMan diferentes: la sonda *NAMPT1* que se une a la secuencia 127-151 del ARNm (exón 10) que detecta exclusivamente la variante 1, la sonda *NAMPT1/2* que se une a la secuencia 96-120 (exón

4) que detecta tanto la variante 1 como la 2, y la sonda *NAMPT1/2/3/4* que se une a la secuencia 41-68 (exón 1-2) detectando todas las variantes (**Figura 29A**).

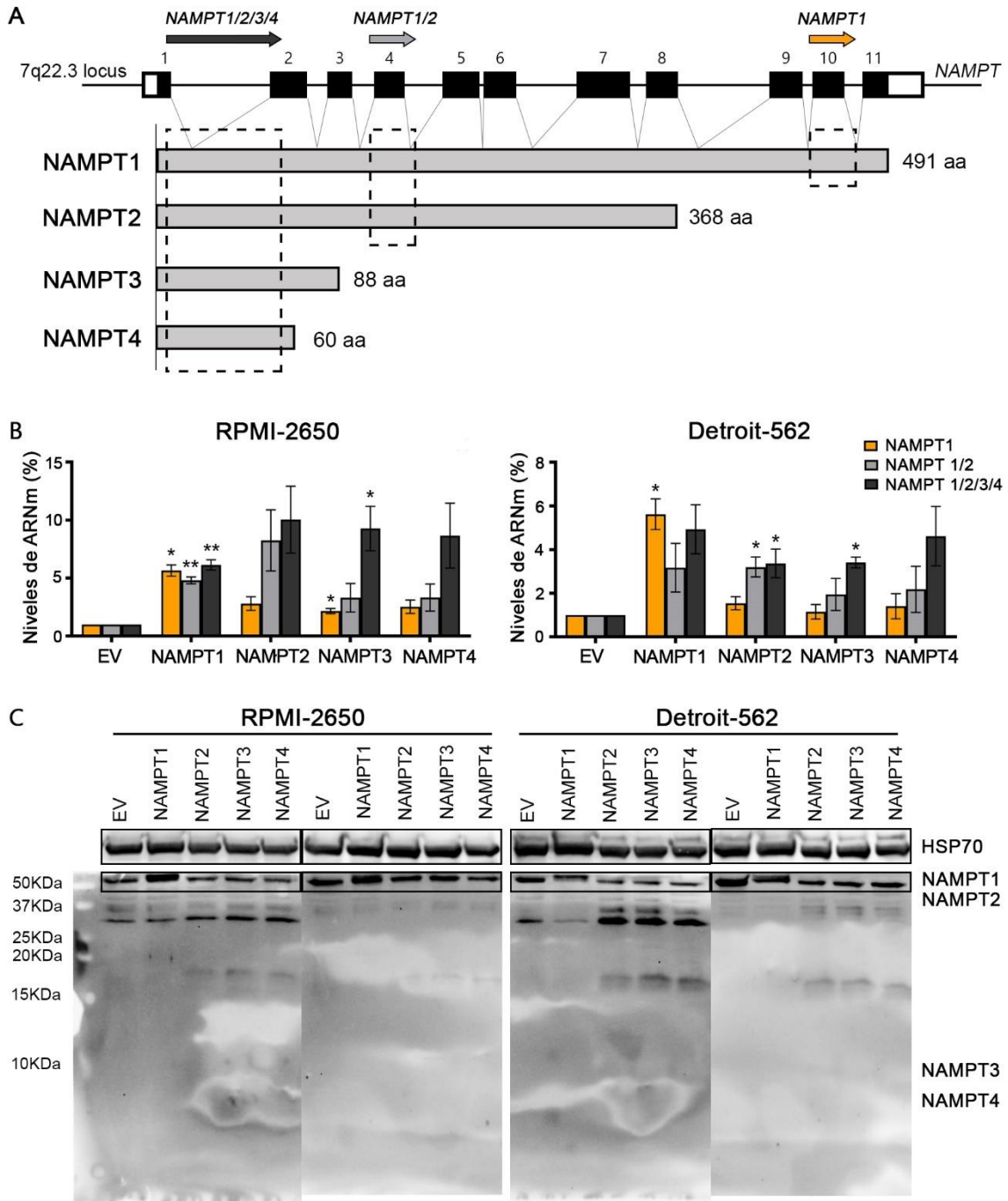


Figura 29. Validación de los modelos de sobreexpresión de las variantes de NAMPT en las líneas celulares de CCyC. A) Esquema de las sondas diseñadas para detectar las variantes de NAMPT por RT-qPCR: *NAMPT1* (se une al exón 10), *NAMPT1/2* (exón 4) y *NAMPT1/2/3/4* (exón 1-2). **B)** Comprobación de la sobreexpresión de las variantes de NAMPT en las líneas RPMI-2650 y Detroit-562 por RT-qPCR. Los resultados se expresan en niveles normalizados al EV (1%). Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). **C)** Comprobación de la sobreexpresión de las variantes *NAMPT1* (56kDa), *NAMPT2* (42kDa), *NAMPT3* (10kDa) y *NAMPT4* (7kDa) por *Western-blot* utilizando dos anticuerpos diferentes: Ac NAMPT total (hibrida en el extremo N-terminal de la proteína) y Ac NAMPT1 (hibrida en el extremo C-terminal).

Se cuantificaron los niveles de ARNm de los modelos de sobreexpresión de las variantes mediante RT-qPCR utilizando las sondas diseñadas (**Figura 29B**). Posteriormente, comprobamos la traducción de las proteínas de las variantes mediante *Western-blot* utilizando dos anticuerpos diferentes: uno que hibrida en el extremo N-terminal de la proteína (1-100 aa) detectando todas las variantes de NAMPT, a este anticuerpo lo llamamos Ac NAMPT total, y otro que hibrida en el extremo C-terminal de la proteína (450-491 aa) detectando exclusivamente la variante 1, dicho anticuerpo lo llamamos Ac NAMPT1. En nuestro análisis, solamente observamos la proteína NAMPT1 (de tamaño 55kDa) y una banda inespecífica de tamaño 37-25kDa, sin observar las bandas correspondientes a las variantes 2 (42kDa), 3 (10kDa) y 4 (7kDa). Estos datos sugieren que las variantes 2, 3 y 4 de NAMPT se transcriben a nivel de ARNm, pero no codifican para proteína (**Figura 29C**). No obstante, estas variantes podrían ejercer alguna función regulando a NAMPT1.

Bien sabido es que la variante 1 de NAMPT cataliza la reacción limitante de la ruta de rescate de la biosíntesis de NAD^+ en la célula. Se desconoce si las otras variantes de NAMPT interfieren en dicha actividad. Por este motivo, quisimos comprobar el efecto biológico de la sobreexpresión de las variantes de NAMPT en nuestras líneas celulares de CCyC. Para ello, medimos los niveles de NAD total y NAD^+ . Observamos un incremento significativo de NAD (NAD total y NAD^+) en las células que sobreexpresaban NAMPT1 en ambas líneas. Sin embargo, no observamos diferencias en los niveles de NAD generados por las células que sobreexpresaban las otras variantes de NAMPT (**Figura 30**).

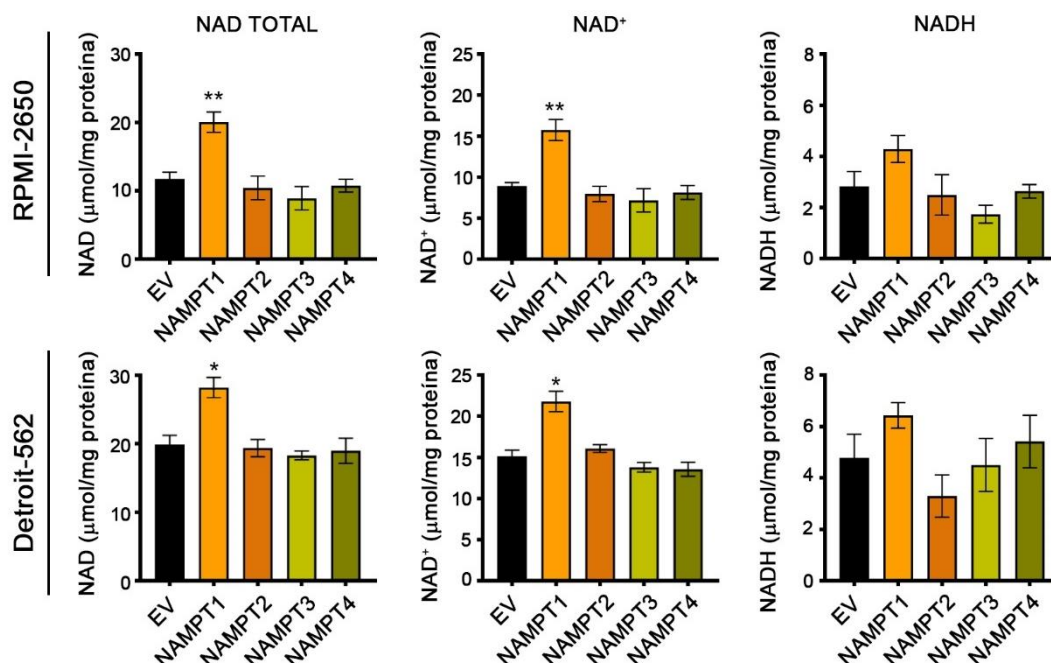


Figura 30. Validación de la actividad biológica de la sobreexpresión de las variantes de NAMPT en las líneas celulares de CCyC. Cuantificación de los niveles de NAD total, NAD^+ y NADH de las líneas RPMI-2650 y Detroit-562 mediante un ensayo de ciclación. Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Una vez generados los modelos de sobreexpresión de las variantes de NAMPT y validado la actividad biológica de las mismas, el siguiente paso consistió en estudiar si tenían algún efecto tumoral en las líneas de CCyC. Para ello, se realizaron una serie de ensayos funcionales para medir las propiedades tumorales de la sobreexpresión de las variantes de NAMPT. En primer lugar, realizamos una curva de crecimiento para estudiar la tasa de proliferación celular. Observamos que las células que sobreexpresaban NAMPT1 crecieron más lento, en cambio, no observamos diferencias significativas en las células que sobreexpresaban las demás variantes en comparación con el EV (**Figura 31**).

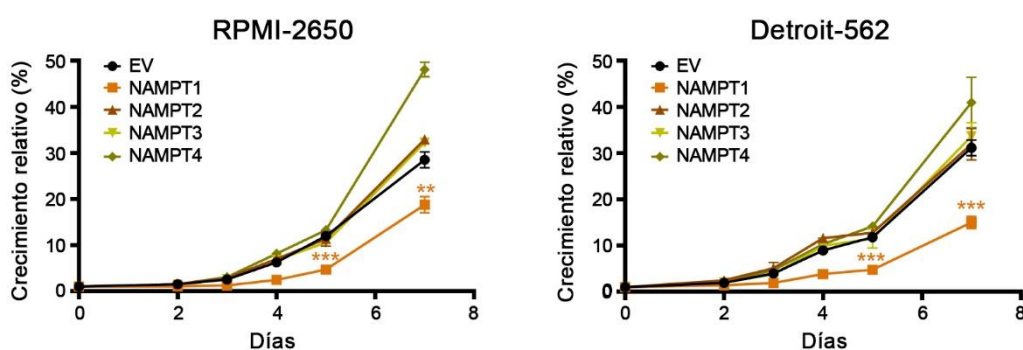


Figura 31. Efecto de la sobreexpresión de las variantes de NAMPT en la capacidad proliferativa en las líneas celulares de CCyC. Representación de las curvas de crecimiento de las células que sobreexpresan las diferentes variantes de NAMPT en las líneas RPMI-2650 y Detroit-562. Se representa la media \pm SD. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A continuación, realizamos un ensayo de clonabilidad para medir la capacidad de las células de formar clones en ausencia de contacto celular y analizar el fenotipo de los clones formados. No observamos diferencias significativas en el porcentaje de clones formados, aunque las células RPMI-2650 con NAMPT1 sobreexpresado y las células Detroit-562 con la variante 2 sobreexpresada mostraron una tendencia a formar mayor número de clones (**Figura 32A**). Respecto al fenotipo de los clones, las células Detroit-562 con NAMPT1 sobreexpresado formaron un mayor porcentaje de holoclones (enriquecidos en células con propiedades de célula madre) y un menor porcentaje de paraclones (formados por células más diferenciadas). Sin embargo, las diferentes variantes de NAMPT no parecen tener un efecto significativo en el porcentaje del tipo de clones observado en ambas líneas celulares (**Figura 32B**).

Posteriormente, medimos la capacidad de formación de tumoresferas de las variantes de NAMPT en nuestras líneas celulares de CCyC. Sin embargo, una vez más, no observamos diferencias significativas en el porcentaje de tumoresferas formadas en los modelos de la sobreexpresión de las variantes de NAMPT (**Figura 33**).

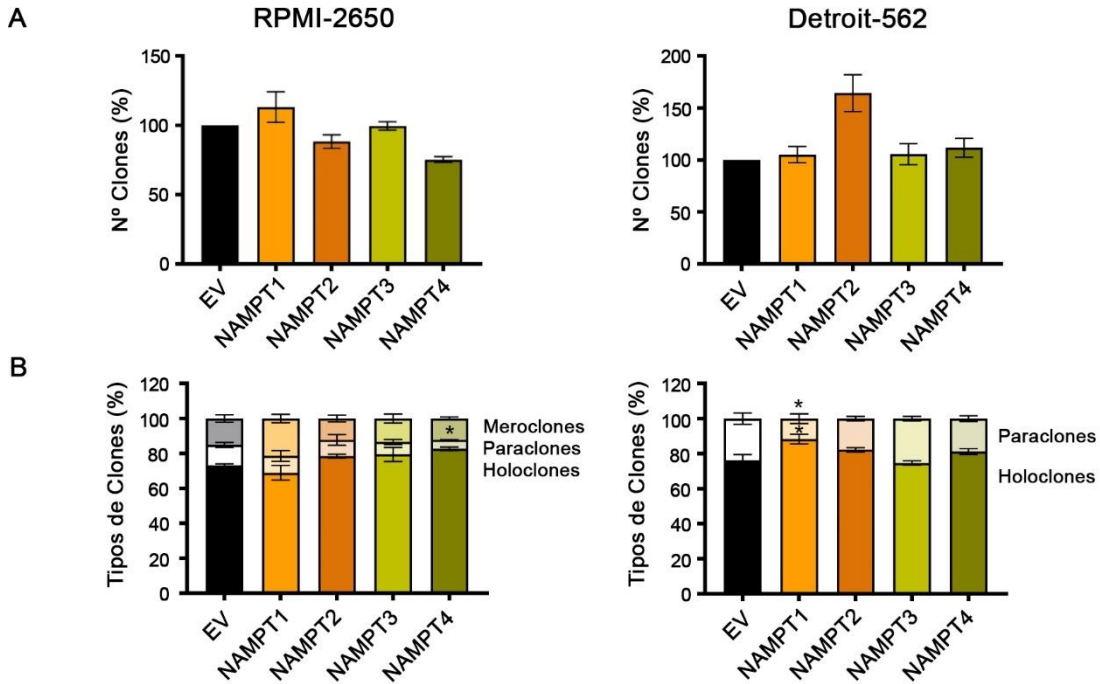


Figura 32. Efecto de la sobreexpresión de las variantes de NAMPT en la capacidad de formación de clones y en el fenotipo de los mismos, en las líneas celulares de CCyC. A) Ensayo de clonabilidad de las células que sobreexpresan las variantes de NAMPT. **B)** Se analizaron los diferentes tipos de clones formados en el ensayo de clonabilidad. Se muestran el porcentaje de cada fenotipo de clon en las líneas RPMI-2650 y Detroit-562. Los resultados se expresan en niveles normalizados al EV (100%). Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

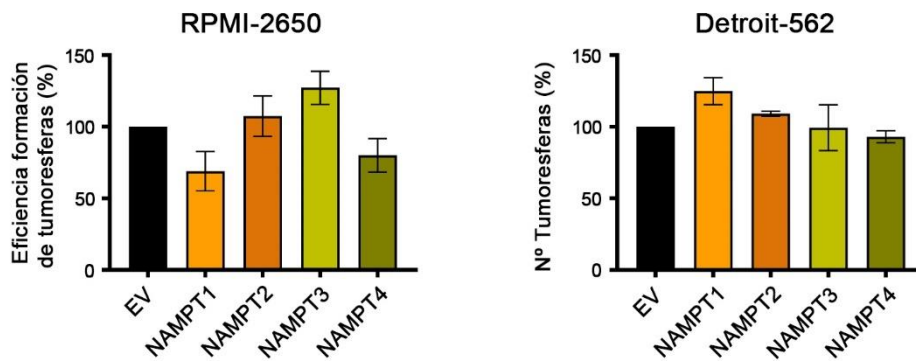


Figura 33. Efecto de la sobreexpresión de las variantes de NAMPT en la formación de tumoresferas en las líneas celulares de CCyC. Ensayo de formación de tumoresferas a partir de una célula aislada en la línea RPMI-2650 y ensayo de formación de tumoresferas en la línea Detroit-562. Los resultados se expresan en niveles normalizados al EV (100%). Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3. NAMPT como diana terapéutica en CCyC

NAMPT cataliza la principal ruta de síntesis de NAD⁺ en las células (la ruta de rescate), por lo que su inhibición produce una depleción importante del contenido NAD⁺ y una inhibición de la síntesis de ATP, afectando a la proliferación y viabilidad de las células tumorales. Por tanto, NAMPT ha sido propuesto como una diana terapéutica en cáncer. De hecho, en los últimos años, se han desarrollado varios inhibidores específicos contra NAMPT y algunos de ellos se encuentran actualmente en fase 1/2 en ensayos clínicos.^{1,32,45,63,76} Nosotros quisimos analizar el efecto citotóxico de algunos de estos inhibidores de NAMPT en nuestras líneas celulares de CCyC. En primer lugar, medimos los niveles de NAD para comprobar la actividad biológica de los inhibidores de NAMPT: FK866 (principal compuesto que inhibe la proteína de manera no competitiva)^{1,58}, GMX1778 (inhibidor competitivo que se administra por vía oral)^{1,90} y GNE617 (inhibidor de segunda generación que se administra por vía oral)^{1,104,105}. También comprobamos la actividad del ácido 2-hidroxinicotínico (2HNA)⁹⁹, un inhibidor de la enzima NAPRT que cataliza la ruta alternativa de síntesis de NAD⁺, la vía *Preiss-Handler*. Cuando tratamos las células parentales RPMI-2650 y Detroit-562 con los inhibidores de NAMPT, observamos una depleción importante del contenido celular de NAD (NAD total y NAD⁺). Sin embargo, cuando tratamos las células con 2HNA no observamos ningún efecto reductor en los niveles de NAD. Estos datos sugieren que las células dependen completamente de la actividad de NAMPT para la generación de NAD, mientras que la actividad de NAPRT parece ser prescindible si NAMPT está activo (**Figura 34**).

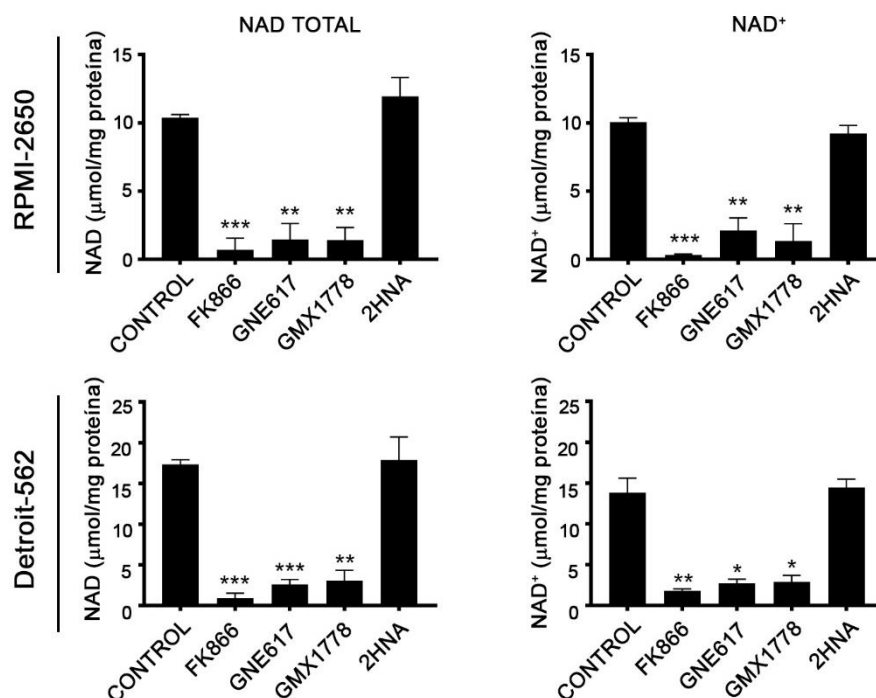


Figura 34. Comprobación del efecto biológico de los inhibidores de NAMPT y NAPRT en las líneas celulares CCyC. Cuantificación de los niveles de NAD total y NAD⁺ mediante un ensayo de ciclación tras el tratamiento de 24 horas de los inhibidores de NAMPT: FK866 (10μM), GNE617 y GMX1778; Y del inhibidor de NAPRT: 2HNA (1mM) en las líneas RPMI-2650 y Detroit-562. Se representa la media ± SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Tras comprobar el efecto biológico, quisimos estudiar el efecto citotóxico de los inhibidores según los niveles de expresión de NAMPT. Para ello, realizamos un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de los inhibidores FK866, GNE617 y GMX1778 en los que se midió el valor del IC₅₀, es decir, la concentración en la que se produce la inhibición del 50% de las células. Observamos que las células de ambas líneas que sobreexpresaban NAMPT tenían un IC₅₀ más alto en comparación con las células control, mientras que el IC₅₀ de los CRISPRs de NAMPT era más bajo. (**Figura 35**).

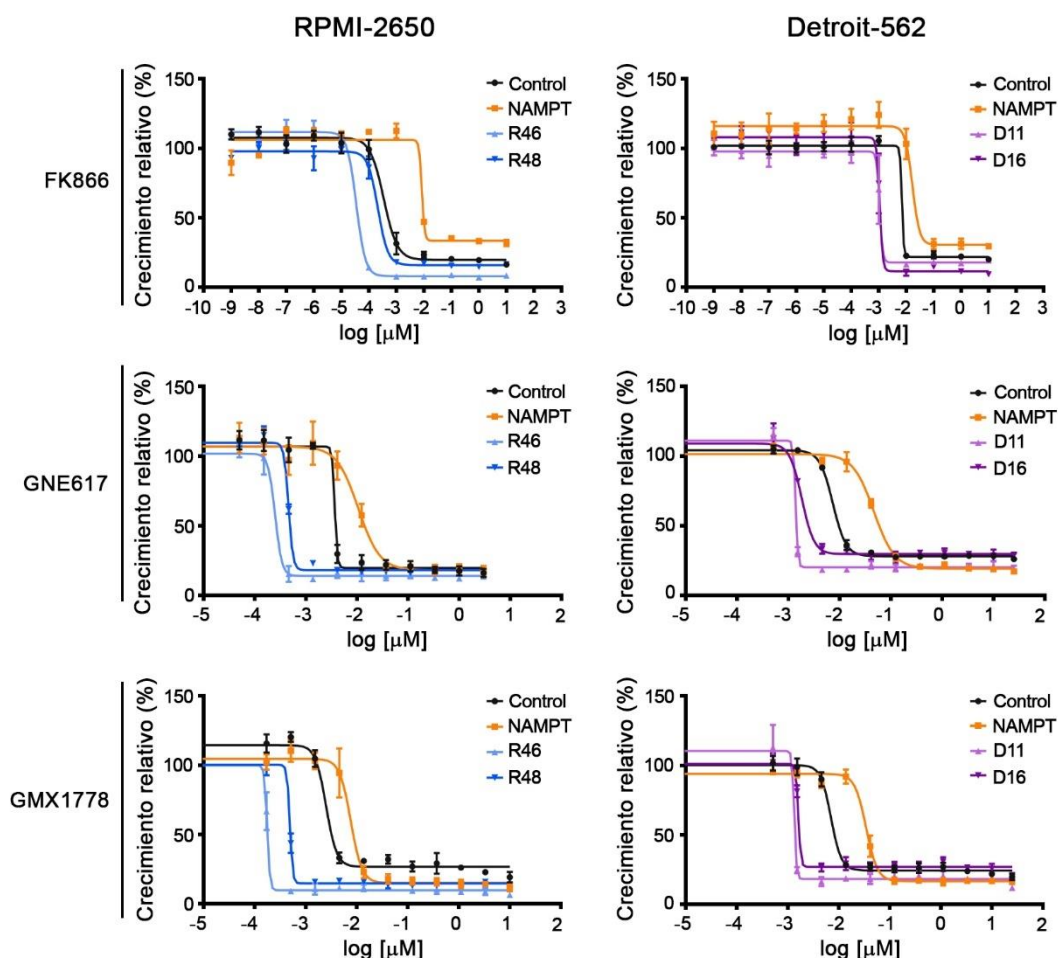


Figura 35. Efecto de citotoxicidad de los inhibidores de NAMPT en la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en las líneas celulares de CCyC. Gráficas representativas del IC₅₀ de los inhibidores FK866, GNE617 y GMX1778 en la sobreexpresión y los CRISPRs de NAMPT en las líneas RPMI-2650 y Detroit-562. Se representa la media \pm SD.

Posteriormente, estudiamos el uso de los inhibidores de NAMPT como un posible tratamiento coadyuvante a la quimioterapia clásica para CCyC, la cual se basa principalmente en derivados del platino y taxanos.¹³⁵ Para ello, tratamos las células parentales con cisplatino o docetaxel en monoterapia y en combinación con los inhibidores FK866, GNE617 o GMX1778 a dosis constante (IC₅₀ establecidos anteriormente). En el caso del cisplatino, la respuesta citotóxica fue bastante diferente entre las líneas celulares. Los inhibidores de NAMPT hicieron a las células RPMI-2650 más resistentes y a las células Detroit-562 más sensibles al efecto citotóxico de cisplatino. La

combinación con FK866 hizo a las células de ambas líneas ligeramente más resistentes a docetaxel mientras que la combinación de GNE617 o GMX1778 las hicieron más sensibles (**Figura 36**).

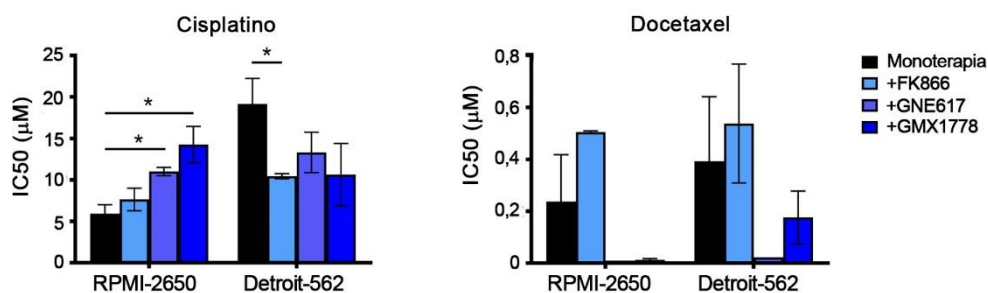


Figura 36. Efecto de citotoxicidad de los inhibidores de NAMPT en combinación con cisplatino y docetaxel en las líneas celulares de CCyC. Se muestran los valores de IC₅₀ de cisplatino y docetaxel en monoterapia y en combinación con los inhibidores FK866, GNE617 y GMX1778 en las células parentales de las líneas RPMI-2650 y Detroit-562. Se representa la media ± SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Los datos *in vitro* del tratamiento coadyuvante de los inhibidores de NAMPT sugieren que, dentro de la variabilidad observada, los inhibidores de NAMPT podrían sensibilizar a cisplatino y, especialmente, a docetaxel. Por ello, decidimos estudiar el efecto coadyuvante de estos inhibidores GNE617 y GMX1778 *in vivo*. En primer lugar, generamos modelos de xenotransplantes de cada línea celular en ratones inmunodeprimidos. Una vez generados los tumores, éstos fueron extraídos y fraccionados para reimplantarlos subcutáneamente en el flanco derecho de nuevos ratones. Dos semanas después, los animales se distribuyeron en 12 grupos (n=6) para tratarlos con los inhibidores GNE617 y GMX1778 en monoterapia y en combinación con cisplatino y docetaxel durante 3 semanas. Decidimos descartar al inhibidor FK866, debido a la toxicidad observada en ratones en otros estudios.^{101,224-226}

El tratamiento de cisplatino, GNE617 y GMX1778 en monoterapia redujo significativamente el crecimiento de los tumores originados de las células de RPMI-2650 y Detroit-562. La combinación de estos inhibidores con cisplatino no produjo cambios observables en el crecimiento tumoral, manteniéndose una reducción del tumor similar al tratamiento de cisplatino en monoterapia (**Figura 37A**). El tratamiento de docetaxel en monoterapia también redujo significativamente el crecimiento de los tumores de las dos líneas celulares. La combinación de GNE617 y GMX1778 con docetaxel mostró un efecto sinérgico de ambos fármacos, consiguiendo la desaparición de los tumores una vez finalizado el tratamiento (**Figura 37B**). Estos resultados indican que GNE617 y GMX1778 tiene un potente efecto antitumoral, especialmente en combinación con docetaxel, por lo que podrían ser candidatos coadyuvantes a la quimioterapia clásica para CCyC. En cuanto a la toxicidad observada en los experimentos, el tratamiento con docetaxel causó varios efectos secundarios, tales como piel seca, pérdida de peso y mal aspecto. Esta toxicidad se acentuó en la combinación de docetaxel con GNE617, llegando a tener que detener el tratamiento con docetaxel antes de las tres semanas, observándose, aun así, una alta eficacia.

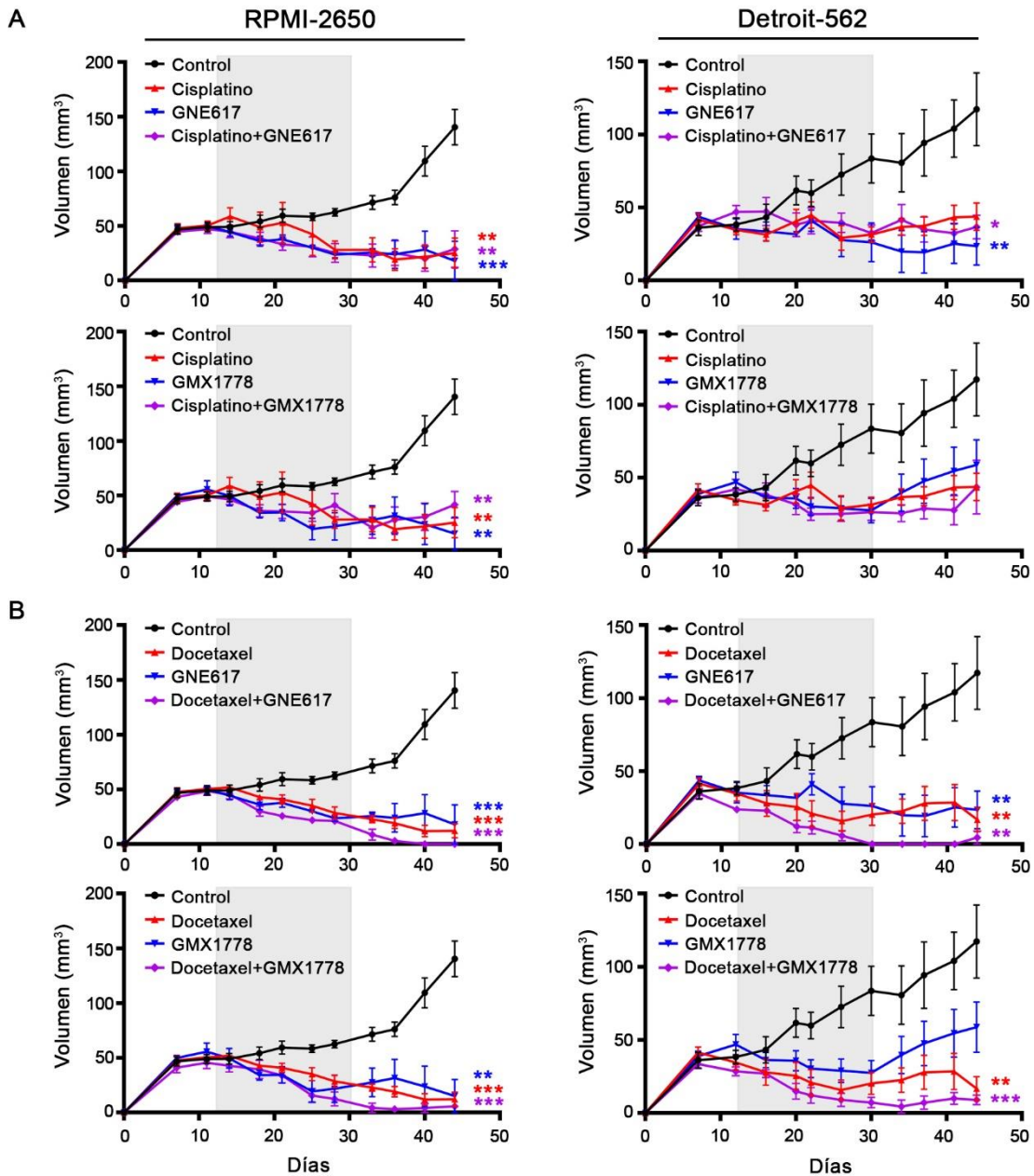


Figura 37. Efecto del tratamiento de los inhibidores de NAMPT en monoterapia y en combinación con cisplatino y docetaxel en el crecimiento tumoral *in vivo* en xenotransplantes en las líneas celulares de CCyC. Tratamiento de ratones xenotransplantados con fármacos experimentales (en azul) y con fármacos tradicionales para CCyC (en rojo) en monoterapia y en combinación (en morado). Los fármacos experimentales fueron: GNE-617 (30mg/kg) 5 días consecutivos seguido de 5 días de descanso por vía oral y GMX1778 (200mg/kg) 1 vez a la semana por vía oral. Los fármacos tradicionales fueron: cisplatino (2mg/kg) 4 veces a la semana por vía IP (**A**) y docetaxel (15mg/kg) 2 veces a la semana por vía IP (**B**). Se muestran las gráficas del volumen tumoral desde la implantación de las fracciones del tumor hasta el sacrificio de los animales. Los tratamientos duraron 3 semanas (franja en gris) y la medición de los tumores se continuó dos semanas más. Los tumores xenotransplantados se generaron a partir de células de las líneas celulares RPMI-2650 y Detroit-562. Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico del último punto se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4. Estudio del papel de NAMPT en la biosíntesis y metabolismo de NAD⁺ en CCyC

Las células de los mamíferos dependen principalmente de la ruta de rescate para regenerar y mantener sus niveles de NAD⁺ y así satisfacer sus demandas glucolíticas y no-glucolíticas.^{1,8-11,39} No obstante, existen rutas alternativas que sintetizan NAD⁺ a partir de precursores procedentes de la dieta: la ruta *De novo* (a partir del triptófano, Trp), la ruta *Preiss-Handler* (a partir del ácido nicotínico, NA) y ruta de nucleósido (a partir del ácido nicotínico ribósido, NAR, o de la nicotinamida ribósido, NR).^{1,3,21} Debido a esta complejidad, quisimos estudiar el papel de NAMPT en las otras rutas alternativas de la biosíntesis de NAD en CCyC.

Anteriormente, observamos que las células de los CRISPRs de NAMPT, a pesar de tener bajos niveles de NAD, son capaces de crecer y restaurar el cultivo celular. Cuando realizamos la curva de crecimiento para estudiar la capacidad proliferativa de estas células, observamos que los CRISPRs tenían un crecimiento lento al principio de la curva, pero luego asemejaban su tasa proliferativa al de las células parentales. Este comportamiento fue bastante notable en la línea celular RPMI-2650. Posiblemente, los CRISPRs de NAMPT estarían recuperando de algún modo el contenido NAD celular utilizando alguna vía alternativa. Para comprobarlo, sembramos las células parentales y los CRISPRs para realizar un ensayo de curva de crecimiento (**Figura 38A**) y recogimos las células en tres puntos distintos: en el día 4, día 7 y día 11. Luego, extrajimos proteínas y analizamos la expresión de las proteínas NAMPT y NAPRT (la principal enzima de la ruta *Preiss-Handler*) mediante *Western-blot*. Observamos que tanto las células parentales como los CRISPRs poseían niveles similares de la proteína NAPRT al inicio de la curva de la línea RPMI-2650. A partir del día 7, las células parentales aumentaban ligeramente los niveles de NAMPT, pero no modificaban los niveles de NAPRT. En cambio, los CRISPRs aumentaban considerablemente los niveles de NAPRT al final de la curva, en el día 11. En la línea Detroit-562, el CRISPR D11 presentaba niveles altos de NAPRT al inicio de la curva, no obstante, no observamos cambios significativos en la expresión de esta proteína a lo largo de la curva. Respecto a la proteína NAMPT, observamos que los CRISPRs, especialmente D11, aumentaban los niveles de la proteína al final de la curva. Estos datos podrían justificar porqué la capacidad de proliferación de D11 era bastante similar a las células parentales (**Figura 38B**).

Por otra parte, medimos los niveles de NAD total y NAD⁺ de las células en el día 4, 7 y 11. Pudimos apreciar un aumento de los niveles de NAD (total y NAD⁺) al final de la curva de crecimiento, en el día 11, en los CRISPRs de ambas líneas celulares (**Figura 38C**). Todos estos datos sugieren que los CRISPRs de NAMPT aumentan su contenido de NAD para recuperar la tasa de proliferación celular durante la curva de crecimiento. Los CRISPRs de RPMI-2650 podrían hacerlo a través de la ruta *Preiss-Handler*, potenciando la actividad de NAPRT, mientras que los CRISPRs de Detroit-562 lo harían a través de la ruta de rescate, potenciando la actividad remanente de NAMPT.

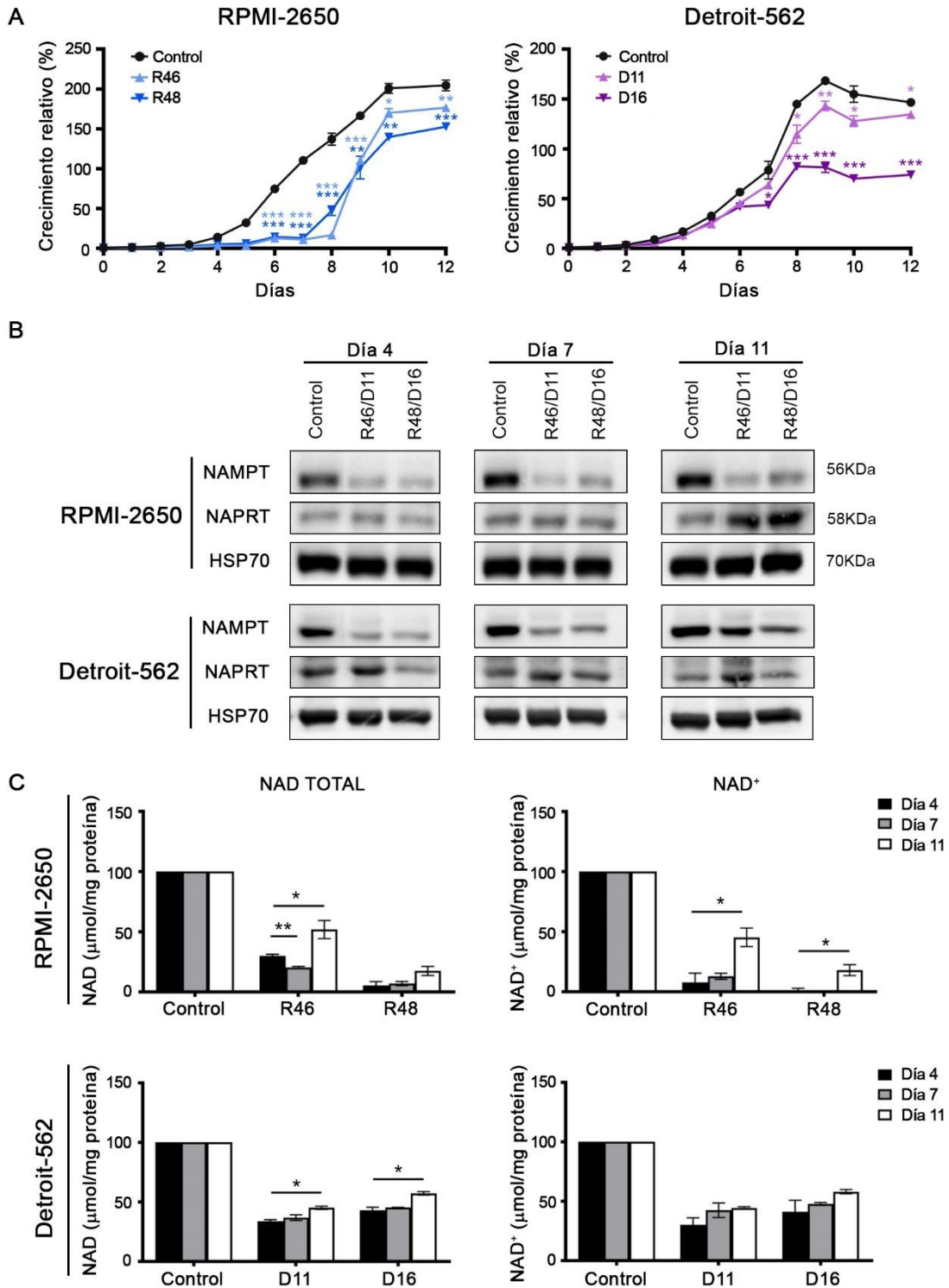


Figura 38. Recuperación de la tasa de proliferación de los CRISPRs de NAMPT durante la curva de crecimiento en las líneas celulares de CCyC. A) Representación gráfica de las curvas de crecimiento de los CRISPRs de NAMPT en las líneas RPMI-2650 y Detroit-562. **B)** Comprobación de las proteínas NAMPT y NAPRT por *Western-blot* en el día 4, 7 y 11 de la curva de crecimiento. **C)** Cuantificación de los niveles de NAD total y NAD⁺ en el día 4, 7 y 11 de la curva de crecimiento mediante un ensayo de ciclación. Los resultados se expresan en niveles normalizados al control (100%). Se representa la media ± SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

A continuación, realizamos algunos ensayos funcionales para comprobar si los CRISPRs de NAMPT pueden recuperar las propiedades tumorigénicas activando la vía alternativa *Preiss-Handler*. Para ello, tratamos las células con el sustrato de NAPRT, el ácido nicotínico (NA), o con el inhibidor de NAPRT, el ácido 2-hidroxinicotínico (2HNA). Realizamos una curva de crecimiento, en la que comprobamos que los CRISPRs de la línea RPMI-2650 recuperaron la tasa de proliferación y crecieron igual que las células parentales en presencia de NA, en cambio, en la línea Detroit-562, este efecto no fue apreciable. Cuando tratamos con el inhibidor 2HNA, observamos una disminución del crecimiento celular, principalmente en los CRISPRs de ambas líneas (**Figura 39A**). Luego, realizamos un ensayo de clonabilidad, en el que observamos que los CRISPRs de la línea RPMI-2650 formaban un mayor número de clones en presencia de NA, recuperando así la capacidad de formación de clones de las células parentales. En el caso de la línea Detroit-562, los CRISPRs formaron un mayor número de clones, pero sin llegar a recuperar totalmente la capacidad de formación de clones parental. Cuando tratamos con el inhibidor 2HNA, los CRISPRs de ambas líneas formaron menos clones (**Figura 39B**). Además, analizamos el fenotipo de los clones formados. Los clones formados por los CRISPRs de la línea RPMI-2650 en presencia de NA tenían un mayor porcentaje de holoclones (enriquecidos con células con fenotipo de CSC) y un menor porcentaje de paraclones (formados por células más diferenciadas), adquiriendo el fenotipo de las células parentales en condiciones normales. Pero no observamos cambios significativos en las células de la línea Detroit-562. Cuando tratamos con el inhibidor 2HNA, observamos una disminución del porcentaje de holoclones y un aumento del porcentaje de paraclones en los clones formados por los CRISPRs de RPMI-2650 y el CRISPR D11 de Detroit-562. No observamos diferencias en el fenotipo de los clones formados por las células parentales de ambas líneas (**Figura 39C**).

Por otra parte, comprobamos los niveles de NAD total y NAD⁺ tras tratar las células con NA y con el inhibidor 2HNA. Observamos que los CRISPRs de ambas líneas celulares previamente tratados con NA aumentaban el contenido de NAD (total y NAD⁺) recuperando los niveles basales de las células parentales en condiciones normales. Pero no observamos una disminución de los niveles de NAD cuando tratamos las células con el inhibidor 2HNA, lo que sugiere que la actividad de NAPRT no es esencial para la síntesis de NAD⁺ en las células ya que su inhibición no es suficiente para afectar al contenido de NAD⁺ (**Figura 39D**).

Dado que el tratamiento exógeno de NA permite a los CRISPRs de NAMPT recuperar el contenido celular de NAD, nos preguntamos si otros precursores que participan en otras rutas de la biosíntesis de NAD⁺ permitirían también esta recuperación. Para comprobarlo, cuantificamos los niveles de NAD total y NAD⁺ en los CRISPRs de NAMPT previamente tratados con triptófano (Trp, precursor de la ruta *De novo*), nicotinamida ribósido (NR, precursor de la ruta de nucleósido), nicotinamida mononucleótida (NMN, producto de la enzima NAMPT e intermediario de la ruta de nucleósido), nicotinamida (NAM, sustrato de la enzima NAMPT) y NA, como control positivo.

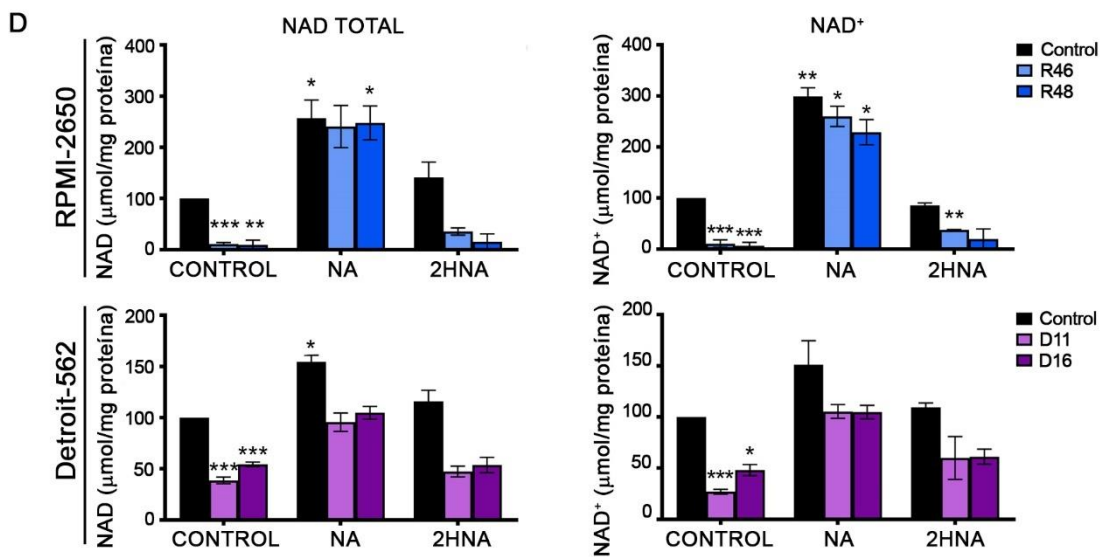
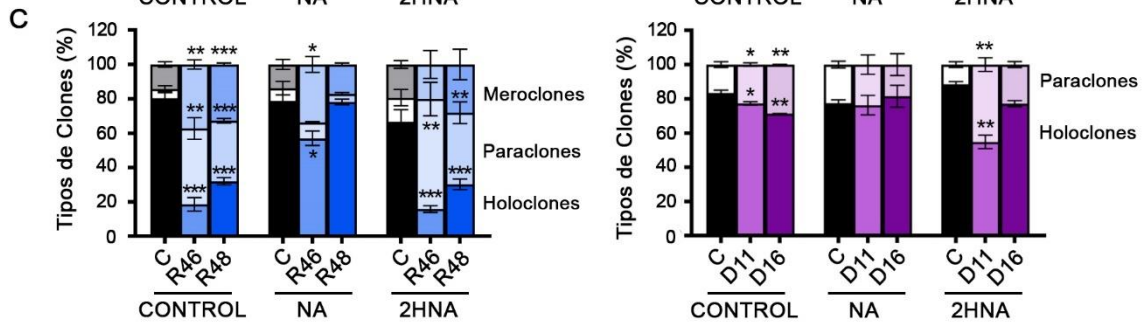
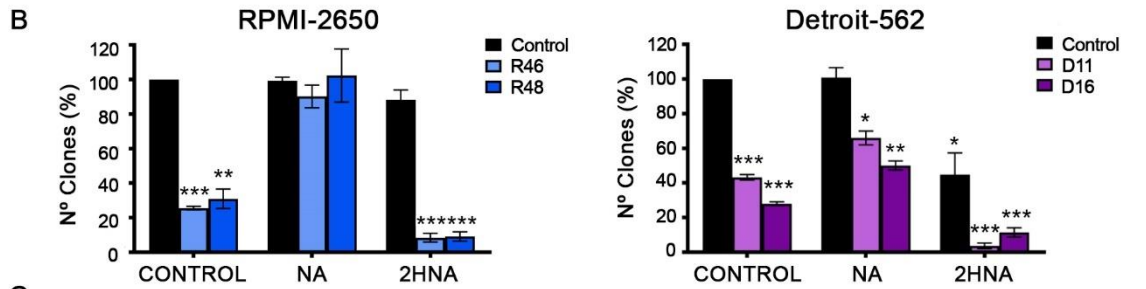
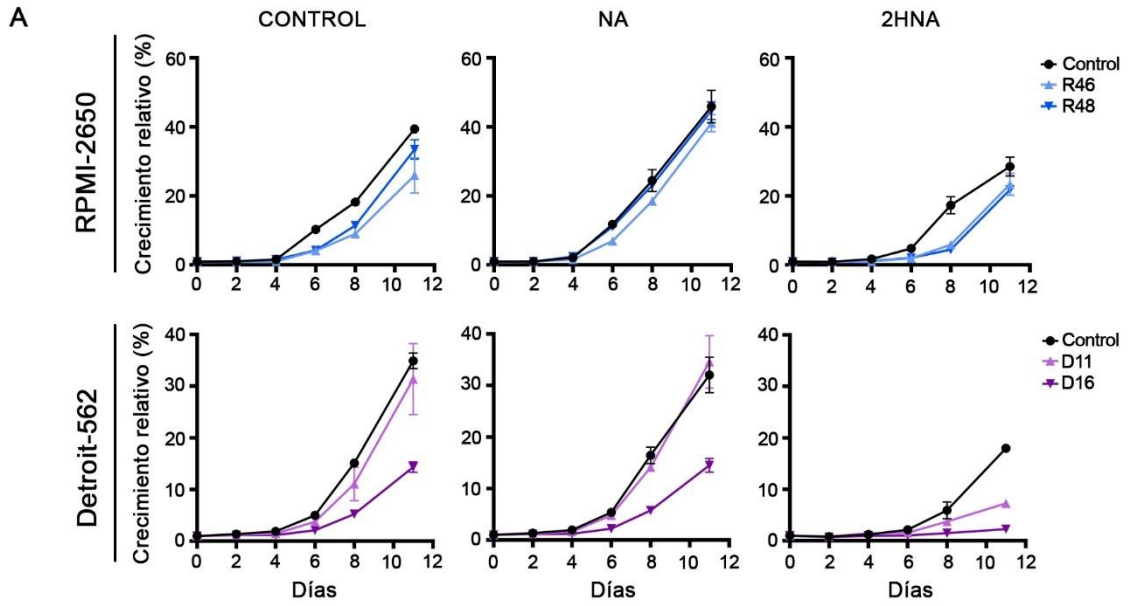


Figura 39. Efecto del ácido nicotínico en las propiedades tumorigénicas de los CRISPRs de NAMPT en las líneas celulares de CCyC. **A)** Ensayo de proliferación celular mediante una curva de crecimiento de los CRISPRs de NAMPT en condiciones normales (control), en presencia del ácido nicotínico (NA, 0,5mM) y del inhibidor del ácido nicotínico (2HNA, 1mM) en las líneas RPMI-2650 y Detroit-562. **B)** Ensayo de clonabilidad en condiciones normales, en presencia de NA y de 2HNA. El resultado se expresa en % de clones porque se ha normalizado el control a 100%. **C)** Se analizaron los diferentes tipos de clones formados en el ensayo de clonabilidad. Se muestra el porcentaje de cada fenotipo de clon. **D)** Cuantificación de los niveles de NAD total y NAD⁺ en condiciones normales (control), en presencia de NA (0,5mM) y del inhibidor 2HNA (1mM). Los resultados se expresan en niveles normalizados al control (100%). Se representa la media ± SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Como era de esperar, no observamos ningún aumento de NAD (total y NAD⁺) cuando tratamos las células con triptófano. Este dato refuerza la idea de que la ruta *De novo*, debido a su baja eficiencia, es la ruta menos utilizada por las células para la biosíntesis de NAD⁺. En cambio, cuando tratamos las células con NR y NMN observamos, en ambas líneas celulares, una recuperación de los niveles de NAD (total y NAD⁺), al menos al nivel de las células control sin tratamiento, al igual que pasaba con el tratamiento de NA. Sorprendentemente, también observamos un aumento de los niveles de NAD (total y NAD⁺) de los CRISPRs en presencia de NAM, a pesar de tener parcialmente bloqueada la ruta de rescate, la cual depende de la actividad de NAMPT (**Figura 40**).

NAM, el producto catabólico que liberan las enzimas consumidoras de NAD⁺, es convertido en NMN por la enzima NAMPT en la primera etapa de la ruta de rescate.^{1,41-45} Los modelos de CRISPRs que hemos desarrollado tienen bajos niveles de expresión de NAMPT, es decir, tienen parcialmente bloqueada la ruta de rescate. Aun así, hemos observado una recuperación completa del contenido de NAD celular tras tratar las células con NAM. Este dato nos hace sospechar que el NAM exógeno podría ser capaz de evadir la ruta de rescate, y utilizar una ruta alternativa, como por ejemplo la ruta *Preiss-Handler*. Para comprobarlo, cuantificamos los niveles de NAD total y NAD⁺ de las células previamente tratadas con NAM y con el inhibidor FK866 para bloquear completamente NAMPT y/o el inhibidor 2HNA para bloquear NAMPT, que cataliza la primera reacción de la ruta *Preiss-Handler*. Cuando tratamos las células parentales de ambas líneas con NAM exógeno y el inhibidor FK866, no observamos ninguna reducción del contenido de NAD (total y NAD⁺) generado por NAM. Este dato confirma que NAM es capaz de evadir la reacción catalizada por NAMPT en la ruta de rescate. Cuando tratamos las células con NAM y el inhibidor 2HNA, sí observamos una reducción de NAD a niveles basales, lo que sugiere que el NAM exógeno entra en la ruta *Preiss-Handler*, catalizada por NAMPT, para evadir su ruta principal. Finalmente, cuando tratamos las células con NAM y los dos inhibidores, FK866 y 2HNA, obtuvimos, como en el caso anterior, niveles basales de NAD. A pesar de que ambas rutas estén inhibidas, no observamos una depleción de NAD, posiblemente esto se deba a que la acumulación de NAM esté produciendo una retroalimentación negativa en el consumo de NAD como sustrato por enzimas, como, por ejemplo, SIRT1 (**Figura 41**).

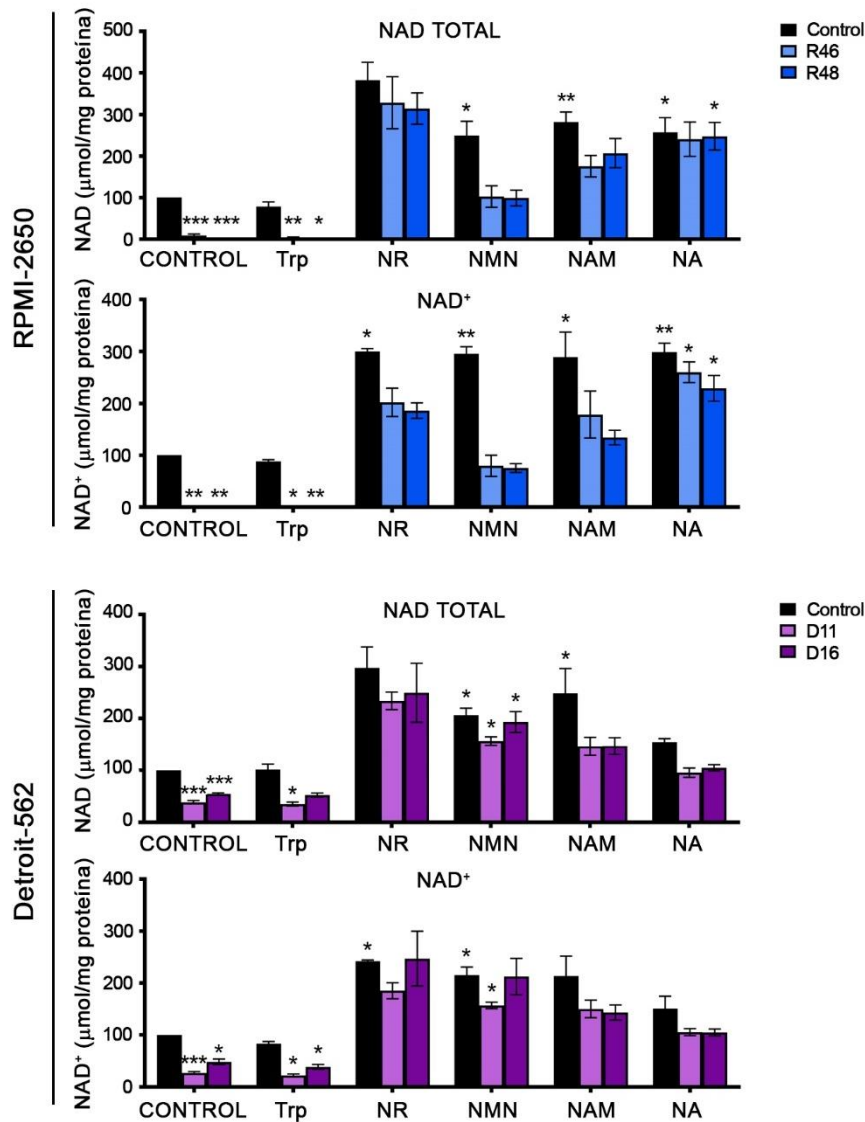


Figura 40. Efecto de los precursores de NAD⁺ en la recuperación del contenido celular de NAD de los CRISPRs de NAMPT en las líneas celulares de CCyC. Cuantificación de los niveles de NAD total y NAD⁺ de los CRISPRs de NAMPT de las líneas RPMI-2650 y Detroit-562 en condiciones normales (CONTROL) y tras el tratamiento de 24 horas con precursores de la biosíntesis de NAD: 0,1mM de triptófano (Trp), 0,5mM de nicotinamida ribósido (NR), 0,5mM de nicotinamida mononucleótida (NMN), 5mM de nicotinamida (NAM) y 0,5mM de ácido nicotínico (NA). Los resultados se expresan en niveles normalizados al control (100%). Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Dado que la ruta *Preiss-Handler* catalizada por la proteína NAPRT, parece ser una vía de escape de las células que tienen reducida la actividad de NAMPT, quisimos estudiar si la inhibición de NAPRT podría potenciar el efecto citotóxico de los inhibidores de NAMPT que habíamos estudiado en el anterior apartado. Para comprobarlo, comparamos los valores de IC50 de los inhibidores de NAMPT en monoterapia y en combinación con 2HNA en las células parentales. Observamos que el tratamiento de 2HNA a dosis constante (1mM) redujo el valor del IC50 del inhibidor FK866 en ambas líneas celulares. Este efecto sinérgico de la combinación de los dos inhibidores fue estadísticamente significativo en las células RPMI-2650. En el caso del tratamiento de 2HNA con los inhibidores GNE617 y GMX1778, observamos también una tendencia reductora,

aunque no significativa, en los IC₅₀ en las células RPMI-2650. Sin embargo, en las células Detroit-562 observamos una tendencia contraria, aunque igualmente no significativa (**Figura 42**).

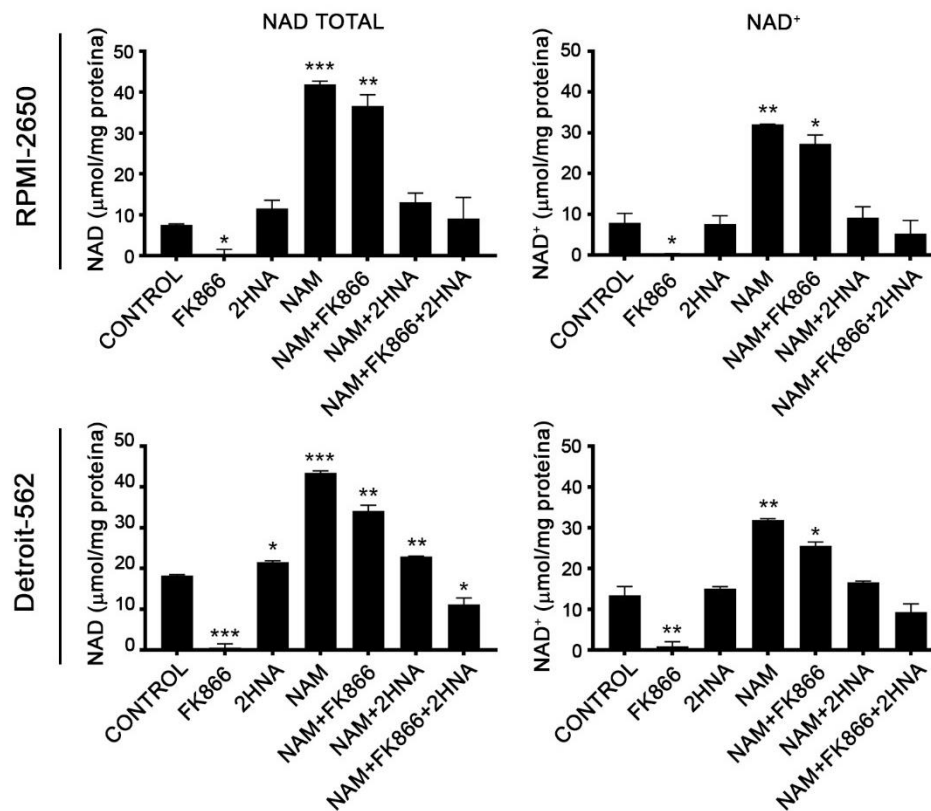


Figura 41. Evasión de nicotinamida de la ruta de escape limitada por NAMPT en las líneas celulares de CCyC. Cuantificación de los niveles de NAD total y NAD⁺ de las células parentales de RPMI-2650 y Detroit-562 en condiciones normales (CONTROL) y tras el tratamiento de 24 horas con 10nM de FK866 (inhibidor de NAMPT), 1mM de 2HNA (inhibidor de NAPRT) y 5mM de nicotinamida (NAM). El resultado se expresa en % de clones porque se ha normalizado el control a 100%. Se representa la media ± SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

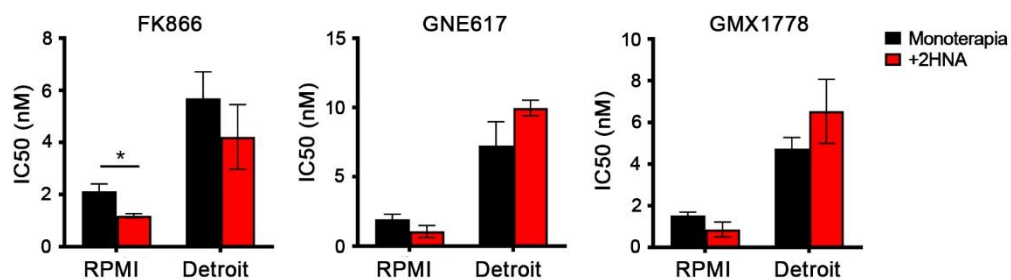


Figura 42. Efecto de citotoxicidad de los inhibidores de NAMPT en combinación con el inhibidor de NAPRT en las líneas celulares de CCyC. Se muestran los valores de IC₅₀ de los inhibidores FK866, GNE617 y GMX1778 en monoterapia y en combinación con 2HNA en las células parentales de las líneas RPMI-2650 y Detroit-562. Se representa la media ± SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Las células tumorales son capaces de reprogramar y modificar su metabolismo en función de los recursos y las condiciones del microambiente.^{1,28} Revisando la composición del medio de cultivo, identificamos los siguientes compuestos que pueden alterar el metabolismo de las células: D-glucosa (4,5 g/L), L-glutamina (0,584 g/L) y nicotinamida (NAM, 0,004 mg/L). Con el objetivo de evaluar la capacidad de adaptación de los CRISPRs de NAMPT en CCyC, realizamos una serie de ensayos en condiciones de limitación de estos nutrientes. En primer lugar, realizamos una curva de crecimiento en medio normal (que contiene alta glucosa 4,5 g/L, glutamina y NAM), en medio con baja glucosa (glucosa 1g/L, glutamina y NAM), en medio sin glucosa (glutamina y NAM), en medio sin glutamina (glucosa 4,5g/L y NAM) y en medio sin nicotinamida/NAM (glucosa 4,5g/L y glutamina). Observamos que los CRISPRs de NAMPT tendieron a crecer más rápido en medio con baja glucosa, mientras que las células parentales redujeron ligeramente su velocidad de crecimiento en ambas líneas celulares. Un cambio a metabolismo OXPHOS debido a la baja disponibilidad de glucosa para compensar el bajo rendimiento energético de la glucólisis podría explicar este comportamiento de los CRISPRs. Por otra parte, el crecimiento, tanto de los CRISPRs como de las células parentales, se redujo bastante en los medios sin glucosa, sin glutamina y sin NAM. En RPMI-2650, el crecimiento fue completamente inhibido en ausencia de glutamina, lo que sugiere que la capacidad proliferativa de estas células depende del metabolismo de la glutamina. En el caso de Detroit-562, el crecimiento fue inhibido en ausencia de glucosa y en ausencia de NAM, lo que indica que la capacidad proliferativa de estas células depende bastante de estos metabolitos (**Figura 43A**).

Luego, realizamos un ensayo de clonabilidad usando los medios anteriores. En la línea RPMI-2650, las células tendieron a formar menos clones en el medio con baja glucosa y en medio sin NAM, aunque estos cambios no fueron estadísticamente significativos. Las células formaron menos número de clones de manera significativa en ausencia de glucosa. Y las células sin glutamina no formaron ningún clon en ausencia de glutamina, lo que sugiere que la capacidad de formación de clones de estas células depende del metabolismo de la glutamina. En el caso de la línea Detroit-562, no observamos ningún cambio significativo en medio con baja glucosa. No obstante, observamos una reducción muy significativa en la formación de clones en ausencia de glucosa, de glutamina y de NAM. Estos datos indican que la capacidad de formación de clones de estas células depende de la disponibilidad de estos metabolitos (**Figura 43B**). Por otra parte, comprobamos como la disponibilidad de estos nutrientes afecta a los niveles de NAD total y NAD⁺. En la línea RPMI-2650, observamos un ligero aumento del contenido de NAD (total y NAD⁺), tanto en las células parentales como en los CRISPRs de NAMPT, en medio con baja glucosa y en ausencia de glucosa. Y observamos una reducción de los niveles de NAD en ausencia de glutamina. En el caso de la línea Detroit-562, no obtuvimos resultados claros y se necesitarían más estudios (**Figura 43C**). Todos estos datos sugieren que las líneas celulares RPMI-2650 y Detroit-562 tienen un perfil metabólico diferente.

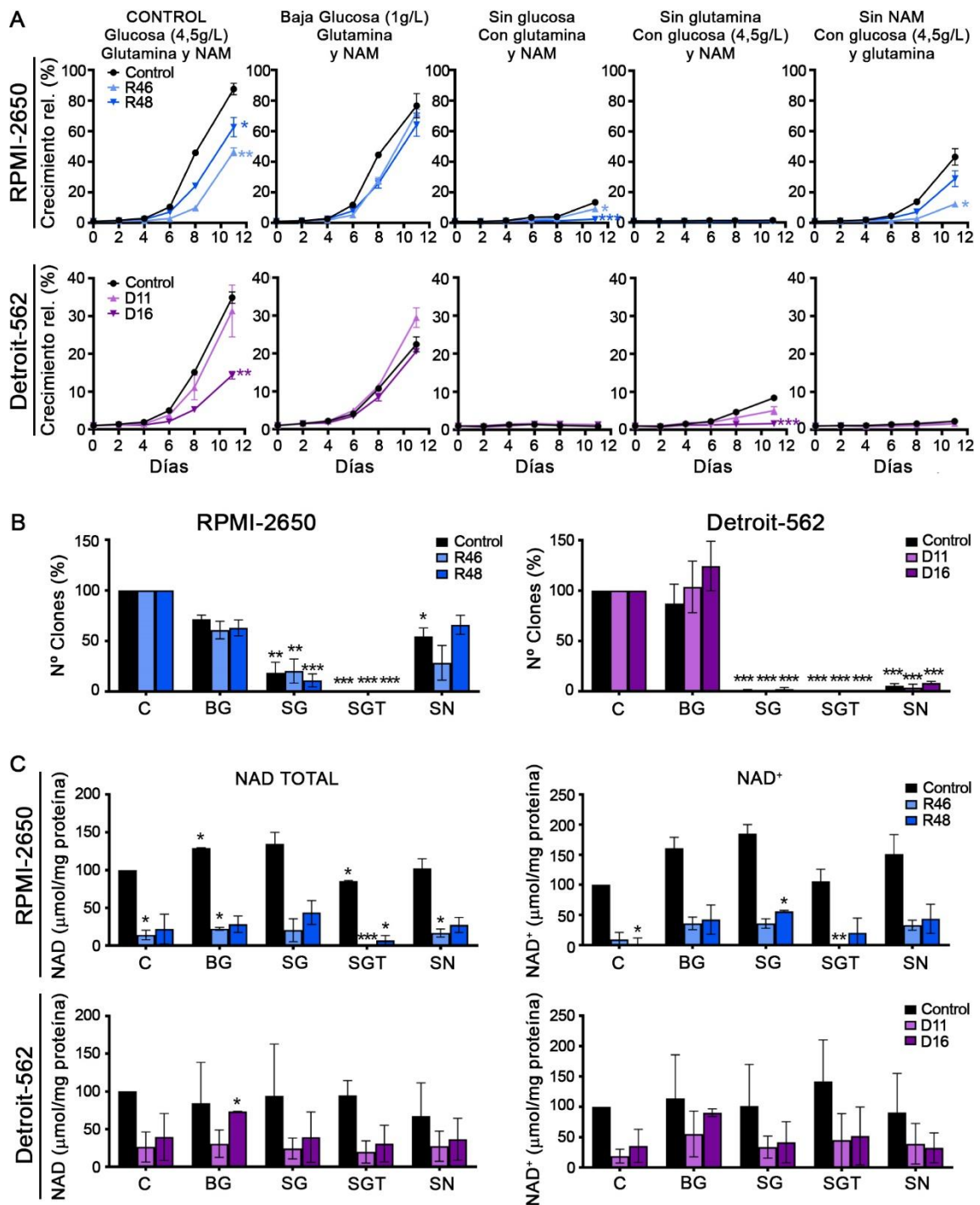


Figura 43. Efecto de la limitación de nutrientes metabólicos en las propiedades tumorigénicas de los CRISPRs de NAMPT en las líneas celulares de CyCC. A) Ensayo de proliferación celular mediante una curva de crecimiento de los CRISPRs de NAMPT en medio normal (control: que contiene glucosa 4,5g/L, glutamina y NAM), en medio con baja glucosa (que contiene glucosa 1g/L, glutamina y NAM), en medio sin glucosa (que contiene glutamina y NAM), en medio sin glutamina (que contiene glucosa 4,5g/L y NAM) y medio sin NAM (que contiene glucosa 4,5g/L y glutamina) en las líneas RPMI-2650 y Detroit-562. **B)** Ensayo de clonabilidad en medio normal (control, C), con baja glucosa (BG), sin glucosa (SG), sin glutamina (SGT) y sin NAM (SN). Los resultados se expresan en niveles normalizados a la condición control (100%). **C)** Cuantificación de los niveles de NAD total y NAD⁺ en los diferentes medios. Los resultados se expresan en niveles normalizados a las células control en condición control (100%). Se representa la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con el test t-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

DISCUSIÓN

Cáncer de cabeza y cuello (CCyC) es en realidad un conjunto de tumores que afectan a diferentes localizaciones anatómicas (cavidad oral, lengua, faringe, nasofaringe, etc.)¹³³⁻¹³⁵, lo que contribuye a la alta heterogeneidad que caracteriza a este tipo de cáncer.¹⁵⁰ La quimioterapia clásica aplicada a los pacientes incluye principalmente los fármacos derivados del platino (ej. cisplatino) y los taxanos (ej. docetaxel).^{131,133} La terapia alternativa consiste en el uso de inhibidores de EGFR, de mTOR y de IGF1R.^{135,143,146,147-149} Sin embargo, actualmente la tasa de recurrencia del tumor y la tasa de mortalidad de los pacientes siguen siendo elevadas,¹⁵⁰ principalmente en tumores CCyC VPH negativos que no están relacionados con la infección del virus.^{136,141} Por lo que resulta vital la búsqueda de identificadores pronóstico y el desarrollo de nuevos tratamientos dirigidos específicamente contra la subpoblación CSC o célula madre tumoral, la cual, es responsable de la iniciación, progreso y metástasis del tumor y de la resistencia a las terapias convencionales.^{1,117-120} Al igual que las células madre normales, las células CSC tienen la capacidad de autorrenovación y diferenciación a los distintos tipos de células cancerosas que componen el tumor.^{1,113-116} Además, las CSCs expresan antígenos específicos en su superficie que dependen en gran medida del tipo de cáncer y que nos ayudan a identificar a esta subpoblación.^{126,127} Sin embargo, existe una gran controversia respecto a los marcadores que identifican a la subpoblación CSC en CCyC debido a la heterogeneidad de estos tumores.¹⁵⁰ Por este motivo, decidimos buscar marcadores de CSC y validar sus propiedades tumorigénicas. Para ello, utilizamos la línea RPMI-2650, procedente de carcinoma de nariz, y la línea Detroit-562, procedente de carcinoma de faringe, como modelos celulares de CCyC. Ambas líneas han resultado tener un fenotipo bastante distinto, siendo un ejemplo de la heterogeneidad real de este tipo de tumor.

Marcadores CSCs en CCyC

Analizamos la expresión de los marcadores de superficie CD10, CD184, CD19, CD133, CD166 y CD44 en nuestras líneas celulares por citometría de flujo (**Tabla 8**). Rápidamente descartamos CD166 en la línea Detroit-562 y CD44 en ambas líneas celulares, ya que toda la población celular era positiva para estos marcadores y no todas las células tienen la capacidad de regenerar el cultivo. El uso de CD44 y CD166 como marcadores específicos de CSC está muy discutido en la literatura. En el caso de CD44, su especificidad depende en gran medida del tejido original del tumor.^{146,148} Por ejemplo, varios estudios en tumores de cavidad oral muestran que tanto el tejido sano como el tumoral expresan CD44, por lo que este marcador no es capaz de identificar a las células tumorales.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ Además, varias líneas tumorales de boca, hipofaringe y orofaringe muestran elevados porcentajes de CD44,¹⁵⁷ lo que coincide con los resultados en nuestras líneas. En el caso de CD166, hay pocos estudios que investiguen su papel como marcador de CSC en CCyC. Algunos estudios indican que CD166 se encuentra altamente expresado en CCyC, poniendo en duda su utilidad como marcador específico de CSC.^{198,199} El patrón de expresión de CD166 probablemente dependa del tejido original del tumor, al igual que ocurre con CD44. Toda la población celular de Detroit-562 era positiva para CD166, mientras que el porcentaje era entorno

al 60% en la línea RPMI-2650. Aunque dicho porcentaje es demasiado alto para ser células con fenotipo CSC, los resultados de las propiedades tumorigénicas de las células CD166 positivas fueron bastante interesantes en RPMI-2650. En los experimentos *in vitro*, las células CD166 positivas formaron un mayor número de clones y tumoresferas que son formaciones celulares enriquecidas en progenitores multipotentes capaces de regenerar el cultivo celular.^{169-172,176-178} En los experimentos *in vivo*, los tumores originados a partir de las células CD166 positivas mostraron un mayor crecimiento tumoral en xenotransplantes (**Figura 10**). Además, las células con niveles de expresión reducidos del oncogén NAMPT mostraron una disminución muy significativa del porcentaje de células CD166 positivas, indicando que CD166 y NAMPT podrían estar relacionados. En este trabajo hemos observado que la reducción de NAMPT disminuye la capacidad tumorigénica y las propiedades relacionadas con el fenotipo CSC en las células tumorales. Todo ello sugiere que CD166 podría ser un marcador tumorigénico y estar relacionado con el fenotipo CSC en la línea RPMI-2650.

CD133 es un marcador de CSC bien definido en muchos tipos de tumores, sin embargo, su uso en CCyC está muy discutido.^{151,152,159,160} Algunos estudios incluso no han detectado este marcador en preparaciones de muestras de pacientes.^{158,227} La subpoblación más pequeña detectada en nuestras líneas celulares fue precisamente la formada por las células positivas para CD133. El porcentaje de células CD133 positivas fue inferior al 0,05%, aunque este porcentaje aumentó en las tumoresferas generadas de las líneas. Sin embargo, no obtuvimos resultados claros al estudiar las propiedades tumorigénicas de la subpoblación CD133 positiva. Parece que CD133 no es un buen marcador específico de CSC en nuestros modelos celulares, lo que coincide con algunos estudios que descartan a este marcador debido a su baja expresión en tumores y a su escasa relación con los parámetros clínicos.^{152,158,227} Los resultados *in vitro* del marcador CD19 tampoco fueron muy claros. CD19 ha sido propuesto como un biomarcador pronóstico sólo en tumores de CCyC positivos para el virus VPH.^{190,191} Se necesitarían más estudios para esclarecer su utilidad como marcador de CSC en tumores VPH negativos.

Sin duda, los marcadores más prometedores fueron CD166 en la línea RPMI-2650, y CD10 y CD184 en la línea Detroit-562. En el caso del marcador CD10, las tumoresferas generadas de la línea Detroit-562 mostraron un mayor porcentaje de células CD10 positivas que el extracto total celular. Los tumores formados a partir de esta subpoblación CD10 positiva en los xenotransplantes *in vivo* crecieron con una mayor velocidad y agresividad (**Figura 6**). Estos resultados coinciden con los de un estudio en el que observaron un mayor crecimiento tumoral en tumores de lengua CD10 positivos.²²⁸ En otros subtipos de CCyC, como en carcinoma oral, CD10 ha sido propuesto como un indicador de mal pronóstico en los pacientes.¹⁷⁴ Además, se han encontrado altos niveles de CD10 en células resistentes a cisplatino, fluoracilo y radiación en varias líneas celulares de CCyC, incluida Detroit-562.¹⁷³ Las citoquinas de inflamación IL-6 e IL-8 parecen estar implicados en el mecanismo de resistencia de CD10 a estos fármacos.¹⁷⁵ CD10 también está implicado en varias vías de señalización, como la vía PI3K-Akt,^{175,229} la cual se

encuentra altamente activada en CCyC.^{137,143} Todo esto indica que CD10 podría ser un buen marcador CSC en algunos subtipos de CCyC. En el caso del marcador CD184, las tumoresferas de Detroit-562 también mostraban un mayor porcentaje de células CD184 positivas. Las tumoresferas tenían altos niveles transcripcionales de *CD184* en comparación con el extracto total celular. Y, al igual que pasaba con CD10, los tumores formados a partir de la subpoblación CD184 positiva en los xenotransplantes *in vivo* crecieron más rápido y con mayor agresividad que los tumores procedentes de la población negativa (**Figura 7**). CD184 ha sido descrito como un receptor de membrana que se expresa principalmente en las células con fenotipo CSC. Varios estudios proponen que la interacción de CD184 con su sustrato SDF-1 favorece la interacción de las células CSC con el microambiente tumoral en CCyC.^{181 182} Pero, no hemos encontrado estudios que evalúen, como hemos hecho nosotros, la capacidad tumorigénica de la subpoblación CD184 positiva.

En nuestro estudio, no hemos encontrado una única población CSC en nuestras líneas celulares, sino que hemos obtenido varias subpoblaciones independientes con capacidad tumorigénica relacionada con el fenotipo de célula madre tumoral. Esto es posible porque la población CSC es altamente heterogénea, habiendo diferentes subgrupos dentro del mismo tumor.^{117,120,122} Las subpoblaciones CD10, CD184, CD19, CD133 y CD166 positivas aisladas fueron capaces de regenerar las distintas poblaciones de los otros marcadores reconstituyendo así la heterogeneidad del cultivo. Sin embargo, las células negativas para un marcador aún eran positivas para el resto de los marcadores (**Figura 11**). La plasticidad celular observada en nuestras células podría explicar la existencia de varias subpoblaciones distintas de CSC dentro de los cultivos y la dificultad de identificar marcadores de una única subpoblación de CSC.

Por otro lado, encontramos varios genes diferenciales entre las subpoblaciones positivas y negativas comunes a los marcadores CD10, CD184 y CD19 mediante secuenciación NGS. Los genes resultantes de la secuenciación fueron IFIT3, MAP4K4, B4GALT4, ZMYND11, ECHDC1, EIF4A1, TP53BP1 y HAUS4. La mayoría de estos genes están implicados en procesos relacionados con el fenotipo CSC, tales como la migración celular, la metástasis, la supervivencia de los pacientes y la resistencia a la quimioterapia. Estos datos refuerzan el papel de estos marcadores como identificadores de las subpoblaciones CSC y sugieren que existe una relación entre ellos.

NAMPT, un marcador tumoral y de CSC en CCyC

Además de los marcadores anteriores, también proponemos a NAMPT como un posible marcador tumoral y de CSC en CCyC. NAMPT es la enzima limitante que cataliza la primera reacción de la ruta de rescate de la biosíntesis de NAD⁺ en la célula.^{1,41-45} Una de las características que definen a las células tumorales es la de su habilidad de reprogramar su metabolismo para permitir la alta tasa de crecimiento y producción de biomasa.²⁸ Las células tumorales deben incrementar la producción de NAD⁺ para satisfacer las altas demandas glucolíticas y no-glucolíticas del tumor. De hecho, se han encontrado mayores tasas de NAD⁺/NADH en las células

tumorales en comparación con las células no-tumorales.^{1,29} Por lo que no es de extrañar que, NAMPT, siendo una enzima crucial para la producción de NAD⁺ en la célula, haya sido descrito como un oncogén en diversos tipos de cáncer, incluyendo neoplasias hematológicas,^{63,64} cáncer de colon,⁴² próstata,⁶⁵ mama,⁶⁶ tiroides,⁶⁷ gástrico⁶⁸ y glioblastoma.^{43,44} Sin embargo, el papel tumorigénico de NAMPT en CCyC todavía no ha sido evaluado.

Encontramos altos niveles de expresión de *NAMPT* en las tumoresferas generadas de nuestras líneas celulares de CCyC. La sobreexpresión de NAMPT favoreció la formación de clones y aumentó la expresión de algunos genes implicados en la regulación de la pluripotencia de las células madre, como son *SOX2* y *NANOG*, en la línea RPMI-2650. Los tumores procedentes de las células con NAMPT sobreexpresado de la línea Detroit-562 mostraron un crecimiento más rápido y agresivo en xenotransplantes. Sin embargo, no obtuvimos resultados claros en otras propiedades tumorigénicas. Por este motivo, decidimos estudiar el efecto de la reducción de NAMPT. Para ello, generamos modelos *knock-down* utilizando el sistema CRISPR-Cas9 de la variante 1, NAMPT1, que es la única que tiene una actividad biológica reconocida.^{53,54} La secuencia diana del sgARN utilizado se localizaba en el exón 10, justo después de la secuencia que codifica los aminoácidos que conforman el sitio catalítico de la proteína (D219 en el exón 6, G384 y R392 en el exón 9).⁵⁸ La reducción de los niveles de NAMPT en los CRISPRs conllevó una reducción significativa de los niveles celulares de NAD. Esta reducción fue más eficiente en los CRISPRs de la línea RPMI-2650 que en los de Detroit-562, posiblemente esto se deba a que Detroit-562 tenía niveles basales de NAD más altos que la otra línea. **(Figura 14)**. De modo que, los CRISPRs R46 y R48 de RPMI-2650 mostraron tener una menor capacidad tumorigénica que los CRISPRs D11 y D16 de Detroit-562. No obstante, de manera general, la reducción de NAMPT redujo la capacidad de proliferación, la de formación de clones, el crecimiento en condiciones de competición con otras células y el crecimiento *in vivo* de los tumores generados en modelos de xenotransplantes. **(Figura 16-18)** Todos estos datos indican que NAMPT podría estar involucrado en el proceso de tumorigénesis en CCyC.

En varios tipos de cáncer, se ha descrito que NAMPT es capaz de enriquecer la población CSC del tumor, mediante los procesos de pluripotencia y de dediferenciación, mecanismo por el que las células adquieren las propiedades y el fenotipo de las células madre tumorales.^{1,42,43,45} En nuestras líneas celulares, la reducción de NAMPT conllevó a una disminución de las propiedades relacionadas con el fenotipo de célula madre, principalmente en RPMI-2650. Los CRISPRs de NAMPT de esta línea presentaron un menor porcentaje de holoclones y una menor capacidad de formación de tumoresferas. Estas células mostraron bajos niveles de expresión de algunos genes implicados en la regulación de la pluripotencia de las células madre, como son *SOX2* y *KLF4*. Sin embargo, los resultados *in vitro* no fueron tan claros en la línea Detroit-562. Por otra parte, cuando inoculamos las tumoresferas generadas a partir de los CRISPRs de NAMPT en ratones inmunodeprimidos, obtuvimos que la eficiencia de la formación tumoral fue de tan solo el 50%, que los tumores formados fueron de menor tamaño y que tardaron más tiempo en aparecer en

comparación con los tumores controles (**Figura 20-22, 25**). Aunque no observamos un aumento claro de las propiedades CSC con la sobreexpresión de NAMPT, sí observamos una disminución de estas propiedades cuando reducimos la expresión de NAMPT en los CRISPRs.

Una propiedad relacionada con las células CSC es la capacidad de migración e invasión. NAMPT está involucrado en el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT), proceso por el que las células epiteliales pierden su polaridad y su adherencia para transformarse en células mesenquimales con capacidades migratorias e invasivas. EMT favorece la invasión y la metástasis del tumor.^{1,42,43} Por ese motivo, evaluamos el papel de NAMPT en el proceso EMT en CCyC. Observamos que la sobreexpresión de NAMPT favorecía la migración de las células, mientras que la reducción de NAMPT reducía la capacidad de migración celular en la línea RPMI-2650. A nivel transcripcional, el aumento de la expresión de NAMPT incrementó los niveles de expresión de algunos genes implicados en el proceso EMT, tales como *TWIST1*, *VIM*, *FOXC2*, *CDH2* y *GSC* en RPMI-2650 y Detroit-562. Además, encontramos varios genes que correlacionaban positivamente con la sobreexpresión de NAMPT de nuestras células en la base de datos pública TCGA de pacientes con CCyC. Los genes resultantes fueron *CDH1*, *DESI1*, *MAP1B*, *TMEFF1*, *OCLN*, *TCF4*, *SMAD2*, *TFRC*, *AHNAK*, *PATP4A1*, *MSN*, *STEAP1*, *PGK1* y *F11R* (**Figura 26-28**). En los experimentos en modelos de xenotransplantes, aunque no observamos macrometástasis, bien es cierto que podría haber habido micrometástasis a nivel celular tal y como indican los resultados *in vitro*. Todos estos resultados sugieren que NAMPT podría estar involucrado en el proceso de migración y de EMT en CCyC.

NAMPT, además de enriquecer la población CSC del tumor, puede actuar como un marcador específico de estas células en varios tipos de cáncer. La reducción de los niveles de NAMPT conllevó a una reducción del porcentaje de las subpoblaciones CD10, CD184, CD19, CD133 y CD166 positivas en nuestras líneas celulares de CCyC. También produjo una disminución de los niveles de expresión de estos genes a nivel transcripcional (**Tabla 9, Figura 23**). NAMPT podría ser un marcador específico de CSC en CCyC, al igual que CD10, CD184 y CD166. Además, parece existir una relación entre el marcador NAMPT y los demás marcadores. Basándonos en todos los datos de este trabajo, proponemos un modelo en el que NAMPT actúa como marcador común de las distintas subpoblaciones CSC en CCyC. La **Figura 44** muestra la relación entre los distintos marcadores. Las CSCs son responsables de la resistencia a la radio y quimioterapia y a la tasa de recurrencia de los tumores en pacientes.¹¹⁷⁻¹¹⁹ En la base de datos TCGA, comprobamos que altos niveles de NAMPT correlacionaban con una peor supervivencia en los pacientes con CCyC (**Figura 14**). Por lo que, NAMPT podría ser también un indicador de mal pronóstico en CCyC, al igual que ocurre en cáncer de estómago, de colon y glioblastoma.^{1,42,43,68}

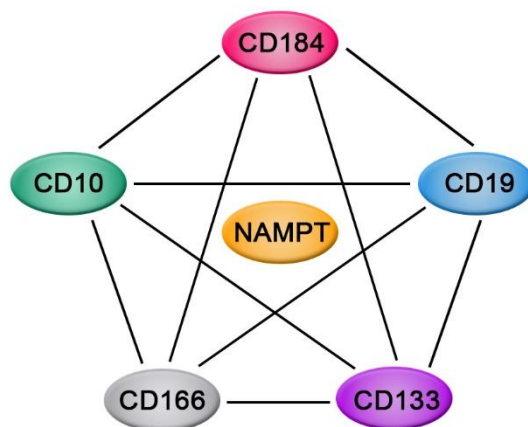


Figura 44. Relación entre los marcadores propuestos en CCyC. Existe una plasticidad celular entre las distintas subpoblaciones CD10, CD184, CD19, CD133 y CD166 positivas. Proponemos que NAMPT es un marcador común de estos marcadores en nuestras líneas celulares de CCyC.

Variantes de NAMPT

Aunque NAMPT1 es la variante principal, existen tres variantes más que se producen a través de empalmes alternativos o *splicing*: NAMPT2, NAMPT3 y NAMPT4. Estas variantes son más cortas que NAMPT1 y no codificarían los aminoácidos que componen el sitio catalítico donde se unen los sustratos NAM y PRPP. Por ese motivo, NAMPT1 es la única variante a la que se le ha reconocido una función biológica.^{54,55,58} No pudimos detectar las variantes NAMPT2, NAMPT3 y NAMPT4 a nivel proteico en nuestras líneas celulares de CCyC (**Figura 29**). Especulamos que estas variantes seguramente se transcriban a nivel de ARNm, pero no codifiquen para proteína, o bien se traten de proteínas truncadas debido a su temprana terminación. Respecto a la actividad biológica, comprobamos que la sobreexpresión de las variantes de NAMPT no producía ningún aumento en el contenido de NAD celular. Respecto a las propiedades tumorigénicas, la sobreexpresión de las variantes no produjo ningún cambio importante en la proliferación celular, en la capacidad de formación de clones ni en la formación de tumoresferas (**Figura 30-33**). Todos estos datos indican que las variantes NAMPT2, NAMPT3 y NAMPT4 no tienen ningún efecto significativo tumoral en nuestras líneas de CCyC. No hemos encontrado estudios que hayan caracterizado experimental ninguna variante de las 14 resultantes de *splicing* del gen *NAMPT* en la literatura. Algunos estudios han identificado ocho variantes de NAMPT en cerdo, siendo la variante 1 (NAMPT1) la predominante entre especies.^{55,230} Otros estudios han identificado algunos polimorfismos de un solo nucleótido o SNP en el gen *NAMPT* que podrían estar relacionados con enfermedades vasculares y del metabolismo de la glucosa y los lípidos.^{231,232}

NAMPT, una diana terapéutica en CCyC

Se han desarrollado varios inhibidores específicos de NAMPT en los últimos años. Algunos de ellos se encuentran en fase 1/2 en ensayos clínicos.^{1,32,45,63,76} FK866 es un inhibidor parcialmente

no-competitivo que produce una potente depleción de NAD^+ y, en consecuencia, una disminución del consumo de glucosa y producción de ATP.^{1,63} Sin embargo, se han documentado severos efectos secundarios del uso de FK866 en ensayos preclínicos en roedores y en la fase 2 de ensayos clínicos (clinicaltrials.gov; NCT00435084, NCT00431912, NCT00432107) en donde se encuentra el fármaco desde 2007. Los casos de trombocitopenia registrados en los ensayos clínicos sirvieron para establecer la toxicidad limitante de la dosis (DLT) de este fármaco.^{101,224-226} Utilizamos FK866 como control positivo para evaluar la actividad citotóxica de otros inhibidores de NAMPT *in vitro*. El tratamiento de los inhibidores GNE617 y GMX1778 produjeron una depleción del contenido de NAD celular similar a la producida por FK866 en nuestras líneas de CCyC (**Figura 34**). Las células que sobreexpresaban NAMPT eran más resistentes y requerían una mayor dosis de los inhibidores. En cambio, los CRISPRs que tenían niveles reducidos de NAMPT eran más sensibles y requerían una menor dosis de los fármacos (**Figura 35**). Estos datos coinciden con los de un estudio en el que encontraron una correlación entre bajos niveles de expresión de NAMPT y una mayor sensibilidad a FK866, GMX1778 y STF-31 (otro inhibidor de NAMPT).^{106,107}

Los inhibidores de NAMPT GNE617 y GMX1778 fueron evaluados en monoterapia y en combinación con cisplatino y docetaxel, dos quimioterapéuticos clásicos que se utilizan para tratar a los pacientes con CCyC.¹³⁵ En los ensayos *in vitro*, los inhibidores GNE617 y GMX1778 hicieron a las células RPMI-2650 ligeramente más resistentes y a las células Detroit-562 más sensibles a cisplatino, y sensibilizaron a las células de ambas líneas al efecto de docetaxel. En los ensayos *in vivo*, el tratamiento coadyuvante de los inhibidores de NAMPT potenció el efecto antitumoral de cisplatino y, especialmente, de docetaxel, que tuvo un efecto sinérgico significativo (**Figura 36 y 37**). En cuanto a la toxicidad registrada, el tratamiento con docetaxel produjo cierta toxicidad en los ratones. Dicha toxicidad se vio agravada por la combinación de GNE617. La toxicidad producida por la combinación se podría haber prevenido disminuyendo la dosis de ambos fármacos, o bien, con la coadministración de ácido nicotínico (NA).^{1,90,107,110} No obstante, los resultados indican que los inhibidores de NAMPT, aunque son demasiado tóxicos para ser usados de manera aislada, podrían ser candidatos para utilizarse como coadyuvantes a la quimioterapia actual en CCyC.

Recuperación de las propiedades tumorigénicas de los CRISPRs de NAMPT

Hemos observado que los CRISPRs de NAMPT, a pesar de tener reducidos los niveles de expresión de NAMPT y el contenido de NAD celular, mantenían algunas propiedades tumorigénicas. Por ejemplo, los CRISPRs de la línea RPMI-2650 crecían lento los primeros días del ensayo de proliferación, pero luego eran capaces de acelerar su crecimiento y de restaurar el cultivo celular. Todo ello indicaba que los CRISPRs de NAMPT estaban recuperando de algún modo el contenido de NAD celular utilizando alguna vía alternativa. Aunque las células dependen enormemente de la ruta de rescate para mantener un suministro adecuado de NAD^+ , las células

también pueden producir NAD^+ a partir de diferentes precursores procedentes de la dieta a través de la ruta *De novo*, la ruta *Preiss-Handler* y la ruta de nucleósido.^{1,8-11,39} Por este motivo, comprobamos los niveles de la enzima NAPRT, que cataliza la primera reacción de la ruta *Preiss-Handler*, en los CRISPRs en distintos puntos de la curva de crecimiento. Los CRISPRs R46 y R48 de la línea RPMI-2650 aumentaron considerablemente los niveles proteicos de NAPRT y, en consecuencia, los niveles de NAD al final de la curva. Mientras que los CRISPRs D11 y D16 de la línea Detroit-562 no modificaron los niveles de NAPRT, pero sí aumentaron los niveles residuales de NAMPT y también los niveles de NAD al final de la curva (**Figura 38**). Cabe destacar que el CRISPR D11 mantenía altos niveles de la proteína NAPRT a lo largo de la curva, lo que sumado al aumento final de NAMPT remanente explicaría por qué este CRISPR mostraba intactas varias de sus propiedades tumorigénicas. Y es que, aunque el CRISPR D11 formaba un menor número de clones y generaba tumoresferas más pequeñas, su capacidad de formación de clones, de tumoresferas, de holoclones, de competición, y su tasa de proliferación era bastante similar al de las células parentales.

Con el objetivo de comprobar si los CRISPRs de NAMPT utilizaban la ruta alternativa *Preiss-Handler*, activamos esta vía añadiendo exógenamente el sustrato de NAPRT, el ácido nicotínico (NA), y la inactivamos con el inhibidor de NAPRT, 2HNA. Los resultados confirmaron que los CRISPRs de RPMI-2650 podían recuperar el contenido de NAD mediante la ruta *Preiss-Handler* de NAPRT, y así recuperar las propiedades tumorigénicas de las células parentales. El tratamiento exógeno de NA no sólo permitió a los CRISPRs crecer más rápido y formar más clones, sino que también les permitió aumentar el porcentaje de holoclones, es decir, enriquecer las células con fenotipo CSC. En cambio, los CRISPRs de Detroit-562 no parecían depender de la ruta de NAPRT, sino que aumentaban su contenido de NAD a través de la ruta de rescate, potenciando la actividad remanente de NAMPT. No obstante, cuando tratamos los CRISPRs de Detroit-562 con el inhibidor 2HNA, observamos una reducción importante de las propiedades tumorigénicas, ya que las dos vías de NAD^+ se encuentran bloqueadas.

En cuanto a las células parentales que mantienen los niveles de NAMPT intactos, no observamos ningún efecto al tratar con 2HNA en la línea RPMI-2650, sin embargo, sí observamos un efecto negativo en las células parentales de Detroit-562 (**Figura 39**). La línea Detroit-562 presenta amplificaciones del gen *NAPRT* (cbioportal.org/), por lo que suponemos que la línea procede de un tumor NAPRT positivo, cuyo tejido original presentaba altos niveles de NAPRT.^{1,89,93,95} Los tumores NAPRT positivos se caracterizan por tener un suministro adecuado de NAD^+ y por presentar resistencia a los inhibidores de NAMPT y al tratamiento de agentes alquilantes.^{1,93,99} Esta conjetura podría ser cierta ya que las células Detroit-562 tenían niveles basales de NAD más altos que la otra línea y resultaron ser más resistentes *in vitro* a los inhibidores de NAMPT (FK866, GNE617 y GMX1778) y a cisplatino, el cual pertenece al grupo de los agentes alquilantes (**Figura 34-36**). Esta teoría explicaría la resistencia observada de las células Detroit-562 al efecto del inhibidor 2HNA y el comportamiento "rebelde" de los CRISPRs

de esta línea a pesar de tener reducidos los niveles de NAMPT. Siguiendo esta teoría, la vía catalizada por NAPRT ya se encontraba activada en los CRISPRs de Detroit-562, por ello, estas células debían potenciar la actividad remanente de NAMPT.

La inhibición de NAPRT con 2HNA no modificó los niveles de NAD en las células parentales, a diferencia de los inhibidores de NAMPT que sí produjeron una depleción importante de NAD (**Figura 34**). Estos datos confirman que las células dependen en gran medida de la ruta de rescate como principal fuente de NAD⁺ en los mamíferos. No obstante, el tratamiento coadyuvante de 2HNA sensibilizó a las células al efecto citotóxico de los inhibidores de NAMPT, especialmente a FK866 (**Figura 42**). Podría ser interesante estudiar esta combinación de tratamientos en modelos de xenotransplantes en CCyC. El uso de 2HNA como coadyuvante podría mejorar la eficacia de los inhibidores de NAMPT, principalmente en tumores NAPRT positivos. Además, el uso de 2HNA permitiría reducir la dosis de los inhibidores de NAMPT y disminuir su toxicidad.¹⁰¹ Se ha descrito que la inhibición de NAPRT sensibiliza a las células y tumores de ovario al efecto inhibitorio de los inhibidores de NAMPT.⁹⁹

Además de la ruta *Preiss-Handler*, existen otras vías alternativas por las que los CRISPRs de NAMPT podrían recuperar el contenido de NAD celular. Para comprobarlo, tratamos las células con diferentes precursores de NAD⁺ y evaluamos su efecto biológico. El tratamiento con triptófano (Trp) no produjo ningún cambio en los niveles de NAD en las células. Esto se debe a que solamente el 1,66% del Trp incorporado de la dieta se utiliza para la biosíntesis de NAD⁺ a través de la ruta *De novo*. El Trp es requerido para la síntesis de otras moléculas esenciales, como serotonina y melatonina.^{1,3} En cambio, el tratamiento con nicotinamida mononucleótida (NMN), el producto de la enzima NAMPT, permitió que los CRISPRs recuperasen el efecto perdido de NAMPT y recuperasen el contenido de NAD al nivel de las células control sin tratamiento, al igual que ocurría cuando tratábamos las células con NA. El tratamiento con nicotinamida ribósido (NR) permitió también la recuperación del contenido de NAD celular. La enzima NRK convierte a NR, el precursor de la ruta de nucleósido, en NMN, saltándose la reacción limitante de NAMPT.^{1,7} Aunque no nos lo esperábamos, el tratamiento con nicotinamida (NAM), el sustrato de la enzima NAMPT, también permitió la recuperación de los niveles de NAD a pesar de que los CRISPRs tienen reducida la actividad de NAMPT (**Figura 40**). Estos resultados indican que la administración exógena de NA, NR y NAM, pero no Trp, permiten a los CRISPRs de NAMPT recuperar el contenido de NAD a través de las diferentes rutas de la biosíntesis de NAD⁺. Esta recuperación del NAD celular compensa la pérdida de funcionalidad de NAMPT en estas células. La administración de NA permitió a los CRISPRs recuperar, además, la capacidad tumorigénica al nivel de las células parentales de la línea RPMI-2650. Aunque sólo nos hayamos centrado en NA y no hayamos comprobado los demás precursores, es probable que otros compuestos como NR y NMN puedan potenciar las propiedades tumorigénicas de los CRISPRs de NAMPT, a través del aumento de NAD en las células.

Evasión de nicotinamida de la ruta de escape de NAMPT

Las enzimas pertenecientes a las familias SIRT₁, PARPs y cADPRs utilizan NAD⁺ como sustrato, consumiendo el contenido de NAD⁺ celular. Estas enzimas escinden la molécula de NAD⁺ de manera irreversible en un grupo ADP-ribosa, que lo utilizan para incorporarlo a las proteínas sustrato, y NAM, que es reciclado por la ruta de rescate.^{1,7,24} NAMPT cataliza la primera reacción de esta ruta, convirtiendo NAM en NMN que, finalmente, regenerará la molécula de NAD⁺.^{1,41-45} Aunque los CRISPRs de NAMPT tenían parcialmente inhibida esta reacción, la administración exógena de NAM permitió la recuperación completa del suministro de NAD⁺ en estas células. Estos datos sugieren que NAM exógeno era capaz de evadir la reacción catalizada por NAMPT, utilizando una vía alternativa de la biosíntesis de NAD⁺. Cuando bloqueamos la ruta *Preiss-Handler* con el inhibidor 2HNA, conseguimos eliminar el aumento de NAD producido por NAM exógeno. Esto confirma que NAM se convertía en NA para entrar en esta ruta y generar NAD⁺. Cuando bloqueamos completamente las dos vías mediante los inhibidores FK866 y 2HNA, no se produjo la depleción del contenido de NAD⁺ esperado (**Figura 41**). Una posible explicación sería que la acumulación de NAM cause una retroalimentación negativa sobre las enzimas consumidoras de NAD⁺. De hecho, se ha descrito que altos niveles de NAM pueden inhibir a SIRT1, un miembro clave de la familia de sirtuinas.^{1,30,73} La actividad de SIRT1 depende en gran medida de la tasa NAD⁺/NADH de las células. Se han encontrado altos niveles de SIRT1 en algunos tumores en los que NAMPT activa la expresión de SIRT1 mediante el aumento de los niveles de NAD⁺ y la disminución de NAM.^{1,74} NAM también ha sido descrito como un inhibidor de las enzimas PARPs.²³³ La inhibición de estas enzimas por NAM puede ser evitada gracias a la acción de nicotinamida N-metiltransferasa (NNMT) que metila a NAM para su degradación y posterior excreción con la orina.^{234,235} La enzima NNMT se expresa casi exclusivamente en el hígado y en el tejido graso,²³⁴ por lo que no evitaría la entrada de NAM en la ruta *Preiss-Handler*. Por otra parte, la eliminación de NAM del medio de las células produjo una disminución importante de la tasa de proliferación celular y de la formación de clones tanto en los CRISPRs de NAMPT como en las células parentales (**Figura 43**). Estos datos confirman la importancia de NAM como sustrato de NAMPT. Por lo que, probablemente, sólo la acumulación de NAM exógeno utilizaría la vía alternativa *Preiss-Handler*.

En mamíferos, no se ha descrito la conversión de NAM a NA. En bacterias, en cambio, NAM es convertida a NA por nicotinamidasa (Pnc1), una enzima desaminasa que sólo se encuentra en estos organismos.^{236,237} Estudios en ratones, han mostrado que las bacterias que conforman la microbiota natural del intestino contribuye a la desaminación de NAM administrado oralmente produciendo NAD⁺ a través de la ruta *Preiss-Handler*. NAD⁺ y los metabolitos generados por la microbiota (NA, NAR, NAMN y NAAD) pasan al torrente sanguíneo.²³⁸ Especulamos que podría existir una reacción de desaminación de NAM equivalente en humanos. Esta vía alternativa de desaminación la describimos en la **Figura 45**.

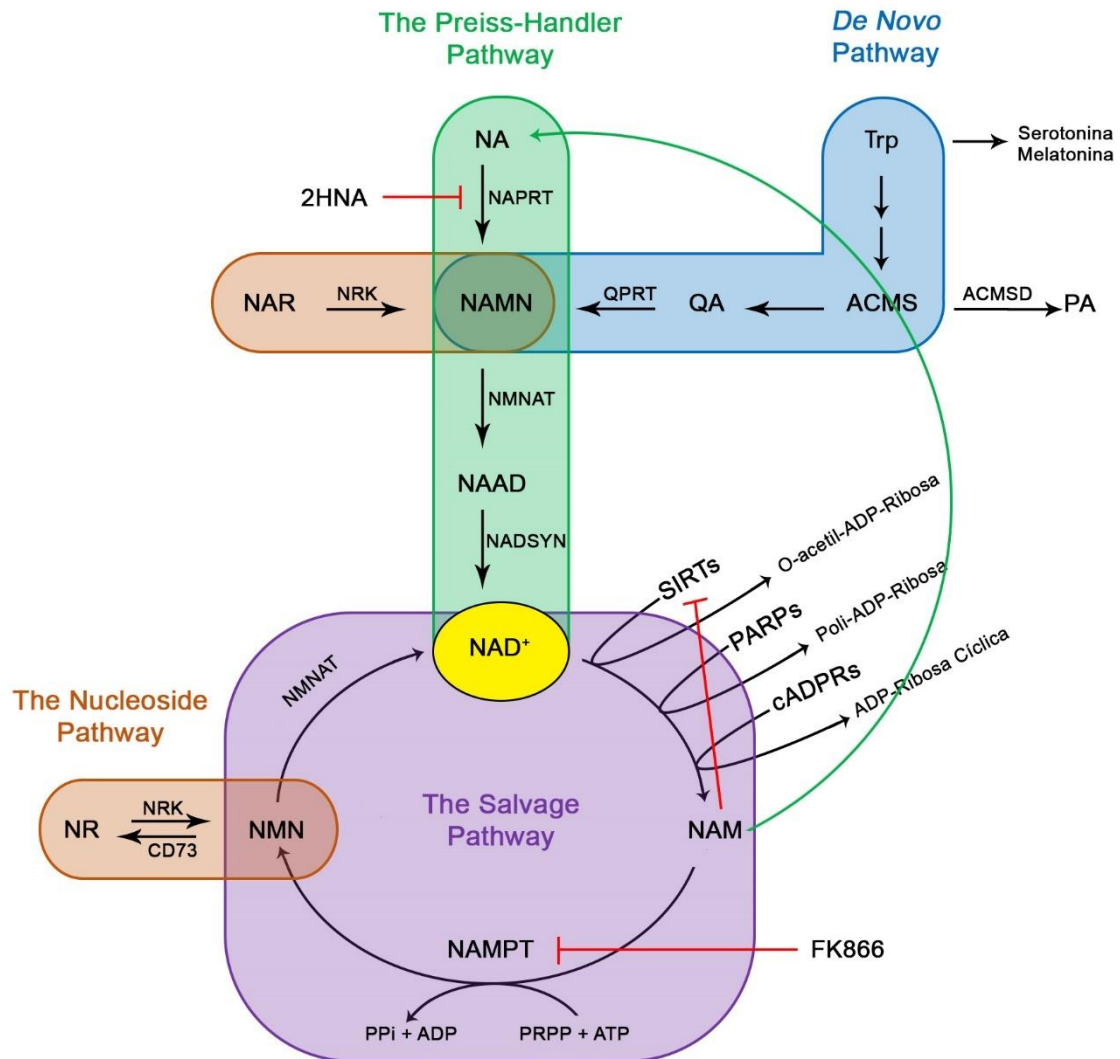


Figura 45. Modelo de la vía alternativa de desaminación de nicotinamida. La nicotinamida (NAM) administrada es capaz de aumentar la producción de NAD⁺, aunque esté bloqueada la enzima NAMPT. De modo que, NAM es capaz de evadir la ruta de rescate (*the salvage pathway*) y convertirse en NA para entrar en la ruta *Preiss-Handler* (*the Preiss-Handler pathway*) y generar, finalmente, NAD⁺ en la célula. La inhibición enzimática de NAPRT con 2HNA elimina este aumento de NAD⁺ producido por NAM exógeno. Sin embargo, la inhibición de ambas vías no ocasiona una depleción del contenido de NAD⁺. Posiblemente se debe a que la acumulación de NAM inhibe a las enzimas consumidoras de NAD, como las sirtuinas (SIRT6), produciendo una acumulación de NAD⁺ en las células.

Adaptación de los CRISPRs de NAMPT a la limitación de nutrientes

El análisis transcriptómico realizado confirmó que NAMPT está implicado principalmente en el metabolismo celular (**Figura 24**). Una de las características de las células tumorales es el de su capacidad para reprogramar y modificar su metabolismo en función de los recursos y las condiciones del microambiente.^{1,28} Por este motivo, indagamos en la capacidad de adaptación de los CRISPRs de NAMPT en condiciones de limitación de nutrientes en las líneas de CCyC. Nuestros modelos celulares de CCyC resultaron tener perfiles metabólicos un poco distintos. La línea RPMI-2650 mostró ser más dependiente al metabolismo de la glutamina, mientras que la línea Detroit-

562 fue más dependiente al metabolismo de la glucosa y de NAM. La ausencia de glucosa y la ausencia de glutamina en el medio inhibió completamente el crecimiento y la capacidad de formación de clones de las células parentales y de los CRISPRs de NAMPT. En cambio, una baja disponibilidad de glucosa hizo que las células de los CRISPRs de NAMPT de ambas líneas crecieran más rápido y las células parentales crecieran un poco más lento, igualando de este modo la tasa de proliferación de ambas condiciones (**Figura 43**). Una posible explicación de este comportamiento sería que la baja disponibilidad de glucosa sumado a los niveles reducidos de NAD no sea suficiente para mantener el acelerado metabolismo glucolítico. Especulamos que el estrés celular ocasionado por esta situación fuerce a las células de los CRISPRs a adaptar su metabolismo glucolítico a OXPHOS que, aunque sea más lento, tiene un rendimiento energético más alto.^{1,32,33} Esta adaptación metabólica podría permitir un aumento de la proliferación de estas células. Al comprobar los niveles celulares de NAD en condiciones de baja glucosa, observamos una ligera acumulación de los niveles de NAD, lo que podría indicar un cambio en el metabolismo celular. No obstante, se requieren más estudios para elucidar si nuestra especulación es cierta.

Resumen final

En resumen, nuestro trabajo demuestra que existen diferentes subpoblaciones dentro de la población CSC en CCyC. Los marcadores CD10, CD184 y CD166 pueden ser marcadores tumorales que identifican algunas de estas subpoblaciones CSC. Descartamos el uso de CD44 como marcador específico de CSC en este tumor, debido a que la población total expresa esta proteína. También descartamos a CD133 por su baja expresión y especificidad, al igual que CD19. Hemos observado una plasticidad celular entre las distintas subpoblaciones, lo que explicaría la elevada heterogeneidad de la población CSC y la dificultad de identificar marcadores específicos. NAMPT también puede ser un marcador tumoral y específico de las células CSC en CCyC. La reducción de los niveles de NAMPT en los CRISPRs produce una disminución en las propiedades tumorales, en la capacidad de migración y en el fenotipo CSC. Además, estas células presentaban menor porcentaje de las subpoblaciones celulares CD10, CD184, CD19, CD133 y CD166 positivas. Estos datos indican que NAMPT podría ser un marcador común a los otros marcadores en CCyC. NAMPT también podría ser un indicador de mal pronóstico en pacientes con CCyC según la base de datos TCGA. Los inhibidores de NAMPT FK866, GNE617 y GMX1778 producen una importante depleción de los niveles de NAD causando un efecto citotóxico en las células. El tratamiento coadyuvante de GNE617 y GMX1778 mejora la respuesta de las células y de los tumores a los quimioterapéuticos clásicos cisplatino y docetaxel tanto *in vitro* como *in vivo*. Por otra parte, hemos observado que los CRISPRs de NAMPT pueden recuperar los niveles basales de NAD a través de las vías alternativas de biosíntesis de NAD⁺, como son la ruta *Preiss-Handler* y la ruta de nucleósido. Además, la administración exógena de NA permite a los CRISPRs de NAMPT recuperar la capacidad de proliferación celular y la capacidad de formación de clones. Curiosamente, la acumulación de NAM administrado exógenamente es capaz de evadir la reacción catalizada por NAMPT en la ruta de rescate y entrar en la ruta alternativa *Preiss-Handler*

aumentando el contenido celular de NAD. En este trabajo, proponemos una reacción de desaminación equivalente a la que se da en bacterias, en donde NAM es convertido en NA para generar NAD^+ . Por último, una baja disponibilidad de glucosa en el medio parece aumentar la capacidad de proliferación y de formación de clones de las células de los CRISPRs de NAMPT.

CONCLUSIONES

1. No hemos encontrado una única población CSC, sino varias subpoblaciones independientes identificadas con los marcadores CD10, CD184, CD19, CD133 y CD166, y con plasticidad entre ellas para reconstituir la heterogeneidad del cultivo.
2. NAMPT puede ser un marcador común de las distintas subpoblaciones CSC. Además, NAMPT es un indicador de mal pronóstico en los pacientes de CCyC.
3. La reducción de los niveles de expresión de NAMPT disminuye las propiedades tumorigénicas y las propiedades relacionadas con el fenotipo de célula madre, incluyendo la capacidad de migración de las células. La reducción de NAMPT también disminuye el porcentaje de las subpoblaciones CD10, CD184, CD19, CD133 y CD166 dentro del cultivo.
4. La sobreexpresión de las variantes de NAMPT menos conocidas no ha mostrado ningún efecto significativo en las propiedades tumorigénicas de las células.
5. El tratamiento con los inhibidores de NAMPT GNE617 y GMX1778 es eficaz contra tumores en xenotransplantes *in vivo*. El tratamiento coadyuvante de GNE617 y GMX1778 potencia el efecto antitumoral de cisplatino y docetaxel, por lo que estos inhibidores podrían ser candidatos para utilizarse como coadyuvantes a la quimioterapia actual en CCyC.
6. Los CRISPRs de NAMPT recuperan su crecimiento tras unos días en el ensayo de proliferación. El mecanismo de esta resistencia es diferente en cada línea celular. Los CRISPRs de la línea RPMI-2650 activan la enzima NAPRT de la ruta *Preiss-Handler* y los CRISPRs de Detroit-562 potencian la actividad remanente de NAMPT.
7. La activación de NAPRT mediante la administración de su precursor ácido nicotínico (NA) permite a los CRISPRs de NAMPT recuperar las propiedades tumorigénicas basales. Mientras que la inhibición de NAPRT por 2HNA reduce aún más las propiedades tumorigénicas.
8. La administración exógena de los precursores ácido nicotínico (NA), nicotinamida ribósido (NR) y nicotinamida (NAM), pero no de triptófano (Trp), permite a los CRISPRs de NAMPT reabastecer el contenido de NAD⁺.
9. Nicotinamida (NAM) ha mostrado ser capaz de evadir la ruta de rescate, catalizada por NAMPT, utilizando la vía alternativa *Preiss-Handler*. La acumulación de NAM aumenta el contenido de NAD⁺ celular, aunque estén bloqueadas las dos rutas de la biosíntesis de NAD⁺.

CONCLUSIONS

1. We have not found a single CSC population, but several independent subpopulations identified with the markers CD10, CD184, CD19, CD133 and CD166. These subpopulations have shown plasticity between them to regenerate the culture heterogeneity.
2. NAMPT can be a common marker for the different CSC subpopulations. Furthermore, NAMPT is an indicator of poor prognosis in patients with HNSCC.
3. NAMPT downregulation decreases the tumorigenic and the CSC-like properties, including cell migration capacity. NAMPT downregulation also decreases the percentage of CD10, CD184, CD19, CD133 and CD166 subpopulation within the culture.
4. NAMPT variants overexpression has not shown any significant effect on tumorigenic properties in cells.
5. The treatment with NAMPT inhibitors (GNE617 and GMX1778) is effective against xenograft tumors *in vivo*. Adjuvant treatment of GNE617 and GMX1778 potentiates the antitumor effect of cisplatin and docetaxel, so these inhibitors could be candidates for use as adjuvants to current chemotherapy in HNSCC.
6. NAMPT CRISPRs cells recover their growth rate after few days in the proliferation assay. The mechanism of this resistance is different in each cell lines. The CRISPRs from RPMI-2650 cell line activate NAPRT enzyme of the Preiss-Handler pathway, while the CRISPRs from Detroit-562 cell line enhance the NAMPT remaining activity.
7. The NAPRT activation by the administration of its precursor nicotinic acid (NA), allows the NAMPT CRISPRs cell to recover the basal tumorigenic properties. While the NAPRT inhibition by 2HNA further reduces the tumorigenic properties.
8. Exogenous administration of nicotinic acid (NA), nicotinamide riboside (NR) and nicotinamide (NAM) precursors, but not tryptophan (Trp), allows the NAMPT CRISPRs cells to recover NAD⁺ pool.
9. Nicotinamide (NAM) can bypass the salvage pathway catalyzed by NAMPT and use the alternative Preiss-Handler pathway to generate NAD⁺. The NAM accumulation increases cellular NAD⁺ pool, even though both NAD⁺ biosynthesis pathways are blocked.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Navas, L. E. & Carnero, A. NAD(+) metabolism, stemness, the immune response, and cancer. *Signal Transduct Target Ther* **6**, 2, doi:10.1038/s41392-020-00354-w (2021).
- 2 Poljsak, B. NAD+ in Cancer Prevention and Treatment: Pros and Cons. *Journal of Clinical & Experimental Oncology* **5**, doi:10.4172/2324-9110.1000165 (2016).
- 3 Yang, Y. & Sauve, A. A. NAD(+) metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation for therapy. *Biochim Biophys Acta* **1864**, 1787-1800, doi:10.1016/j.bbapap.2016.06.014 (2016).
- 4 Nakamura, M., Bhatnagar, A. & Sadoshima, J. Overview of pyridine nucleotides review series. *Circ Res* **111**, 604-610, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247924 (2012).
- 5 Guillot, B., Lecomte, C., Cousson, A., Scherf, C. & Jelsch, C. High-resolution neutron structure of nicotinamide adenine dinucleotide. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 981-989, doi:10.1107/s0907444901007120 (2001).
- 6 Htet, Y. & Tennyson, A. G. NAD(+) as a Hydride Donor and Reductant. *J Am Chem Soc* **138**, 15833-15836, doi:10.1021/jacs.6b10451 (2016).
- 7 Fletcher, R. S. & Lavery, G. G. The emergence of the nicotinamide riboside kinases in the regulation of NAD+ metabolism. *Journal of Molecular Endocrinology* **61**, R107-R121, doi:10.1530/jme-18-0085 (2018).
- 8 Kulkarni, C. A. & Brookes, P. S. Cellular Compartmentation and the Redox/Nonredox Functions of NAD(). *Antioxid Redox Signal* **31**, 623-642, doi:10.1089/ars.2018.7722 (2019).
- 9 Opitz, C. A. & Heiland, I. Dynamics of NAD-metabolism: everything but constant. *Biochem Soc Trans* **43**, 1127-1132, doi:10.1042/BST20150133 (2015).
- 10 Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M. & Sassone-Corsi, P. Circadian control of the NAD+ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* **324**, 654-657, doi:10.1126/science.1170803 (2009).
- 11 Masri, S. Sirtuin-dependent clock control: new advances in metabolism, aging and cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **18**, 521-527, doi:10.1097/MCO.0000000000000219 (2015).
- 12 Ramsey, K. M. *et al.* Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD+ biosynthesis. *Science* **324**, 651-654, doi:10.1126/science.1171641 (2009).
- 13 Carracedo, A., Cantley, L. C. & Pandolfi, P. P. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer* **13**, 227-232, doi:10.1038/nrc3483 (2013).
- 14 Dan Dunn, J., Alvarez, L. A., Zhang, X. & Soldati, T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol* **6**, 472-485, doi:10.1016/j.redox.2015.09.005 (2015).
- 15 Lee, B. W. L., Ghode, P. & Ong, D. S. T. Redox regulation of cell state and fate. *Redox Biol*, doi:10.1016/j.redox.2018.11.014 (2018).
- 16 Chiarugi, A., Dolle, C., Felici, R. & Ziegler, M. The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology. *Nat Rev Cancer* **12**, 741-752, doi:10.1038/nrc3340 (2012).
- 17 Braid, N. *et al.* Role of Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Related Precursors as Therapeutic Targets for Age-Related Degenerative Diseases: Rationale, Biochemistry, Pharmacokinetics, and Outcomes. *Antioxid Redox Signal* **30**, 251-294, doi:10.1089/ars.2017.7269 (2019).
- 18 Perillo, B. *et al.* ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med* **52**, 192-203, doi:10.1038/s12276-020-0384-2 (2020).
- 19 Cui, Q. *et al.* Modulating ROS to overcome multidrug resistance in cancer. *Drug Resist Updat* **41**, 1-25, doi:10.1016/j.drug.2018.11.001 (2018).
- 20 Panieri, E. & Santoro, M. M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis* **7**, e2253, doi:10.1038/cddis.2016.105 (2016).
- 21 Rajman, L., Chwalek, K. & Sinclair, D. A. Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. *Cell Metab* **27**, 529-547, doi:10.1016/j.cmet.2018.02.011 (2018).
- 22 Kim, M. Y., Zhang, T. & Kraus, W. L. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD+ into a nuclear signal. *Genes Dev* **19**, 1951-1967, doi:10.1101/gad.1331805 (2005).
- 23 Langelier, M. F., Zandarashvili, L., Aguiar, P. M., Black, B. E. & Pascal, J. M. NAD(+) analog reveals PARP-1 substrate-blocking mechanism and allosteric communication from catalytic center to DNA-binding domains. *Nat Commun* **9**, 844, doi:10.1038/s41467-018-03234-8 (2018).

- 24 Houtkooper, R. H., Canto, C., Wanders, R. J. & Auwerx, J. The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr Rev* **31**, 194-223, doi:10.1210/er.2009-0026 (2010).
- 25 Canto, C., Menzies, K. J. & Auwerx, J. NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab* **22**, 31-53, doi:10.1016/j.cmet.2015.05.023 (2015).
- 26 Gomes, A. P. *et al.* Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell* **155**, 1624-1638, doi:10.1016/j.cell.2013.11.037 (2013).
- 27 Moreschi, I., Bruzzone, S., Melone, L., De Flora, A. & Zocchi, E. NAADP⁺ synthesis from cADPRP and nicotinic acid by ADP-ribosyl cyclases. *Biochem Biophys Res Commun* **345**, 573-580, doi:10.1016/j.bbrc.2006.04.096 (2006).
- 28 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 29 Moreira, J. D. *et al.* The Redox Status of Cancer Cells Supports Mechanisms behind the Warburg Effect. *Metabolites* **6**, doi:10.3390/metabo6040033 (2016).
- 30 Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* **41**, 211-218, doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001 (2016).
- 31 Cantor, J. R. & Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov* **2**, 881-898, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0345 (2012).
- 32 Yaku, K., Okabe, K., Hikosaka, K. & Nakagawa, T. NAD Metabolism in Cancer Therapeutics. *Front Oncol* **8**, 622, doi:10.3389/fonc.2018.00622 (2018).
- 33 DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* **7**, 11-20, doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002 (2008).
- 34 Mates, J. M., Di Paola, F. J., Campos-Sandoval, J. A., Mazurek, S. & Marquez, J. Therapeutic targeting of glutaminolysis as an essential strategy to combat cancer. *Semin Cell Dev Biol*, doi:10.1016/j.semcdb.2019.05.012 (2019).
- 35 Bott, A. J., Maimouni, S. & Zong, W. X. The Pleiotropic Effects of Glutamine Metabolism in Cancer. *Cancers (Basel)* **11**, doi:10.3390/cancers11060770 (2019).
- 36 Patra, K. C. & Hay, N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci* **39**, 347-354, doi:10.1016/j.tibs.2014.06.005 (2014).
- 37 Amelio, I., Cutruzzola, F., Antonov, A., Agostini, M. & Melino, G. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci* **39**, 191-198, doi:10.1016/j.tibs.2014.02.004 (2014).
- 38 Mattaini, K. R., Sullivan, M. R. & Vander Heiden, M. G. The importance of serine metabolism in cancer. *J Cell Biol* **214**, 249-257, doi:10.1083/jcb.201604085 (2016).
- 39 Cambronne, X. A. *et al.* Biosensor reveals multiple sources for mitochondrial NAD(+). *Science* **352**, 1474-1477, doi:10.1126/science.aad5168 (2016).
- 40 Hara, N. *et al.* Molecular identification of human glutamine- and ammonia-dependent NAD synthetases. Carbon-nitrogen hydrolase domain confers glutamine dependency. *J Biol Chem* **278**, 10914-10921, doi:10.1074/jbc.M209203200 (2003).
- 41 Lucena-Cacace, A. & Carnero, A. Nicotinamide phosphoribosyltransferase: Biology, role in cancer, and novel drug target. *Cancer Translational Medicine* **4**, 109-116, doi:10.4103/ctm.ctm_20_18 (2018).
- 42 Lucena-Cacace, A., Otero-Albiol, D., Jimenez-Garcia, M. P., Munoz-Galvan, S. & Carnero, A. NAMPT Is a Potent Oncogene in Colon Cancer Progression that Modulates Cancer Stem Cell Properties and Resistance to Therapy through Sirt1 and PARP. *Clin Cancer Res* **24**, 1202-1215, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2575 (2018).
- 43 Lucena-Cacace, A., Otero-Albiol, D., Jimenez-Garcia, M. P., Peinado-Serrano, J. & Carnero, A. NAMPT overexpression induces cancer stemness and defines a novel tumor signature for glioma prognosis. *Oncotarget* **8**, 99514-99530, doi:10.18632/oncotarget.20577 (2017).
- 44 Lucena-Cacace, A., Jiménez-García, M. & Verdugo-Sivianes, E. Nicotinamide adenine dinucleotide+ metabolism biomarkers in malignant gliomas. *Cancer Translational Medicine* **2**, 189, doi:10.4103/2395-3977.196912 (2016).
- 45 Lucena-Cacace, A., Umeda, M., Navas, L. E. & Carnero, A. NAMPT as a Dedifferentiation-Inducer Gene: NAD(+) as Core Axis for Glioma Cancer Stem-Like Cells Maintenance. *Front Oncol* **9**, 292, doi:10.3389/fonc.2019.00292 (2019).

- 46 Grozio, A. *et al.* Slc12a8 is a nicotinamide mononucleotide transporter. *Nature Metabolism* **1**, 47-57, doi:10.1038/s42255-018-0009-4 (2019).
- 47 Wu, L. E. & Sinclair, D. A. The elusive NMN transporter is found. *Nature Metabolism* **1**, 8-9, doi:10.1038/s42255-018-0015-6 (2019).
- 48 Grolla, A. A., Travelli, C., Genazzani, A. A. & Sethi, J. K. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase, a new cancer metabokine. *Br J Pharmacol* **173**, 2182-2194, doi:10.1111/bph.13505 (2016).
- 49 Sun, Z., Lei, H. & Zhang, Z. Pre-B cell colony enhancing factor (PBEF), a cytokine with multiple physiological functions. *Cytokine Growth Factor Rev* **24**, 433-442, doi:10.1016/j.cytogfr.2013.05.006 (2013).
- 50 Ognjanovic, S. *et al.* Genomic organization of the gene coding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *J Mol Endocrinol* **26**, 107-117, doi:10.1677/jme.0.0260107 (2001).
- 51 Samal, B. *et al.* Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* **14**, 1431-1437, doi:10.1128/mcb.14.2.1431 (1994).
- 52 Fukuhara, A. *et al.* Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* **307**, 426-430, doi:10.1126/science.1097243 (2005).
- 53 Dakroub, A. *et al.* Visfatin: A Possible Role in Cardiovasculo-Metabolic Disorders. *Cells* **9**, doi:10.3390/cells9112444 (2020).
- 54 Zhang, L. Q., Heruth, D. P. & Ye, S. Q. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Human Diseases. *J Bioanal Biomed* **3**, 13-25, doi:10.4172/1948-593X.1000038 (2011).
- 55 Chen, H. *et al.* Gene organization, alternate splicing and expression pattern of porcine visfatin gene. *Domest Anim Endocrinol* **32**, 235-245, doi:10.1016/j.domaniend.2006.03.004 (2007).
- 56 Takahashi, R. *et al.* Structure and reaction mechanism of human nicotinamide phosphoribosyltransferase. *J Biochem* **147**, 95-107, doi:10.1093/jb/mvp152 (2010).
- 57 Dulyaninova, N. G., Podlepa, E. M., Touloukhouva, L. V. & Bykhovskiy, V. Y. Salvage pathway for NAD biosynthesis in *Brevibacterium ammoniagenes*: regulatory properties of triphosphate-dependent nicotinate phosphoribosyltransferase. *Biochim Biophys Acta* **1478**, 211-220, doi:10.1016/s0167-4838(00)00045-5 (2000).
- 58 Kim, M. K. *et al.* Crystal structure of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor 1/nicotinamide phosphoribosyltransferase, free and in complex with the anti-cancer agent FK-866. *J Mol Biol* **362**, 66-77, doi:10.1016/j.jmb.2006.06.082 (2006).
- 59 Wang, T. *et al.* Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD⁺ biosynthetic enzyme. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 661-662, doi:10.1038/nsmb1114 (2006).
- 60 Khan, J. A., Tao, X. & Tong, L. Molecular basis for the inhibition of human NMPRTase, a novel target for anticancer agents. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 582-588, doi:10.1038/nsmb1105 (2006).
- 61 Burgos, E. S., Ho, M. C., Almo, S. C. & Schramm, V. L. A phosphoenzyme mimic, overlapping catalytic sites and reaction coordinate motion for human NAMPT. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13748-13753, doi:10.1073/pnas.0903898106 (2009).
- 62 Burgos, E. S. & Schramm, V. L. Weak coupling of ATP hydrolysis to the chemical equilibrium of human nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Biochemistry* **47**, 11086-11096, doi:10.1021/bi801198m (2008).
- 63 Bi, T. Q. & Che, X. M. Nampt/PBEF/visfatin and cancer. *Cancer Biol Ther* **10**, 119-125, doi:10.4161/cbt.10.2.12581 (2010).
- 64 Olesen, U. H., Hastrup, N. & Sehested, M. Expression patterns of nicotinamide phosphoribosyltransferase and nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human malignant lymphomas. *APMIS* **119**, 296-303, doi:10.1111/j.1600-0463.2011.02733.x (2011).
- 65 Wang, B. *et al.* NAMPT overexpression in prostate cancer and its contribution to tumor cell survival and stress response. *Oncogene* **30**, 907-921, doi:10.1038/onc.2010.468 (2011).
- 66 Zhang, H. *et al.* Epigenetic Regulation of NAMPT by NAMPT-AS Drives Metastatic Progression in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res* **79**, 3347-3359, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3418 (2019).

- 67 Sawicka-Gutaj, N. *et al.* Nicotinamide phosphorybosiltransferase overexpression in thyroid malignancies and its correlation with tumor stage and with survivin/survivin DEx3 expression. *Tumour Biol* **36**, 7859-7863, doi:10.1007/s13277-015-3506-z (2015).
- 68 Bi, T. Q. *et al.* Overexpression of Nampt in gastric cancer and chemopotentiating effects of the Nampt inhibitor FK866 in combination with fluorouracil. *Oncol Rep* **26**, 1251-1257, doi:10.3892/or.2011.1378 (2011).
- 69 Kim, J. Y. *et al.* Visfatin through STAT3 activation enhances IL-6 expression that promotes endothelial angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 1759-1767, doi:10.1016/j.bbamcr.2009.09.006 (2009).
- 70 Kim, S. R. *et al.* Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 886-895, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.01.004 (2008).
- 71 Li, Y. *et al.* Extracellular Nampt promotes macrophage survival via a nonenzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *J Biol Chem* **283**, 34833-34843, doi:10.1074/jbc.M805866200 (2008).
- 72 Aman, Y., Qiu, Y., Tao, J. & Fang, E. F. Therapeutic potential of boosting NAD⁺ in aging and age-related diseases. *Translational Medicine of Aging* **2**, 30-37, doi:10.1016/j.tma.2018.08.003 (2018).
- 73 Hwang, E. S. & Song, S. B. Nicotinamide is an inhibitor of SIRT1 in vitro, but can be a stimulator in cells. *Cell Mol Life Sci* **74**, 3347-3362, doi:10.1007/s00018-017-2527-8 (2017).
- 74 Menssen, A. *et al.* The c-MYC oncoprotein, the NAMPT enzyme, the SIRT1-inhibitor DBC1, and the SIRT1 deacetylase form a positive feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E187-196, doi:10.1073/pnas.1105304109 (2012).
- 75 Behrouzfar, K., Alaei, M., Nourbakhsh, M., Gholinejad, Z. & Golestani, A. Extracellular NAMPT/visfatin causes p53 deacetylation via NAD production and SIRT1 activation in breast cancer cells. *Cell Biochem Funct* **35**, 327-333, doi:10.1002/cbf.3279 (2017).
- 76 Kennedy, B. E. *et al.* NAD(+) salvage pathway in cancer metabolism and therapy. *Pharmacol Res* **114**, 274-283, doi:10.1016/j.phrs.2016.10.027 (2016).
- 77 Wang, L. *et al.* PARP1 in Carcinomas and PARP1 Inhibitors as Antineoplastic Drugs. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18102111 (2017).
- 78 Dorsam, B. *et al.* PARP-1 protects against colorectal tumor induction, but promotes inflammation-driven colorectal tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E4061-E4070, doi:10.1073/pnas.1712345115 (2018).
- 79 Schiewer, M. J. *et al.* Dual roles of PARP-1 promote cancer growth and progression. *Cancer Discov* **2**, 1134-1149, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0120 (2012).
- 80 Schiewer, M. J. *et al.* PARP-1 regulates DNA repair factor availability. *EMBO Mol Med* **10**, doi:10.15252/emmm.201708816 (2018).
- 81 Chini, E. N. CD38 as a regulator of cellular NAD: a novel potential pharmacological target for metabolic conditions. *Curr Pharm Des* **15**, 57-63, doi:10.2174/138161209787185788 (2009).
- 82 Camacho-Pereira, J. *et al.* CD38 Dictates Age-Related NAD Decline and Mitochondrial Dysfunction through an SIRT3-Dependent Mechanism. *Cell Metab* **23**, 1127-1139, doi:10.1016/j.cmet.2016.05.006 (2016).
- 83 Zhao, Y. J., Lam, C. M. & Lee, H. C. The membrane-bound enzyme CD38 exists in two opposing orientations. *Sci Signal* **5**, ra67, doi:10.1126/scisignal.2002700 (2012).
- 84 Malavasi, F. *et al.* CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood* **118**, 3470-3478, doi:10.1182/blood-2011-06-275610 (2011).
- 85 Chini, C. C. *et al.* Targeting of NAD metabolism in pancreatic cancer cells: potential novel therapy for pancreatic tumors. *Clin Cancer Res* **20**, 120-130, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0150 (2014).
- 86 Grozio, A. *et al.* CD73 protein as a source of extracellular precursors for sustained NAD⁺ biosynthesis in FK866-treated tumor cells. *J Biol Chem* **288**, 25938-25949, doi:10.1074/jbc.M113.470435 (2013).
- 87 Sadej, R. & Skladanowski, A. C. Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells. *Acta Biochim Pol* **59**, 647-652 (2012).

- 88 Cerna, D. *et al.* Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) activity by small molecule GMX1778 regulates reactive oxygen species (ROS)-mediated cytotoxicity in a p53- and nicotinic acid phosphoribosyltransferase1 (NAPRT1)-dependent manner. *J Biol Chem* **287**, 22408-22417, doi:10.1074/jbc.M112.357301 (2012).
- 89 Audrito, V., Messina, V. G. & Deaglio, S. NAMPT and NAPRT: Two Metabolic Enzymes With Key Roles in Inflammation. *Front Oncol* **10**, 358, doi:10.3389/fonc.2020.00358 (2020).
- 90 Watson, M. *et al.* The small molecule GMX1778 is a potent inhibitor of NAD⁺ biosynthesis: strategy for enhanced therapy in nicotinic acid phosphoribosyltransferase 1-deficient tumors. *Mol Cell Biol* **29**, 5872-5888, doi:10.1128/MCB.00112-09 (2009).
- 91 Peterse, E. F. P. *et al.* NAD Synthesis Pathway Interference Is a Viable Therapeutic Strategy for Chondrosarcoma. *Mol Cancer Res* **15**, 1714-1721, doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0293 (2017).
- 92 Lee, J. *et al.* Selective Cytotoxicity of the NAMPT Inhibitor FK866 Toward Gastric Cancer Cells With Markers of the Epithelial-Mesenchymal Transition, Due to Loss of NAPRT. *Gastroenterology* **155**, 799-814 e713, doi:10.1053/j.gastro.2018.05.024 (2018).
- 93 Li, X. Q. *et al.* NAMPT and NAPRT, Key Enzymes in NAD Salvage Synthesis Pathway, Are of Negative Prognostic Value in Colorectal Cancer. *Front Oncol* **9**, 736, doi:10.3389/fonc.2019.00736 (2019).
- 94 Duarte-Pereira, S. *et al.* Extensive regulation of nicotinate phosphoribosyltransferase (NAPRT) expression in human tissues and tumors. *Oncotarget* **7**, 1973-1983, doi:10.18632/oncotarget.6538 (2016).
- 95 Chowdhry, S. *et al.* NAD metabolic dependency in cancer is shaped by gene amplification and enhancer remodelling. *Nature* **569**, 570-575, doi:10.1038/s41586-019-1150-2 (2019).
- 96 Tateishi, K. *et al.* Extreme Vulnerability of IDH1 Mutant Cancers to NAD⁺ Depletion. *Cancer Cell* **28**, 773-784, doi:10.1016/j.ccell.2015.11.006 (2015).
- 97 Pramono, A. A., Rather, G. M., Herman, H., Lestari, K. & Bertino, J. R. NAD⁻ and NADPH-Contributing Enzymes as Therapeutic Targets in Cancer: An Overview. *Biomolecules* **10**, doi:10.3390/biom10030358 (2020).
- 98 Fons, N. R. *et al.* PPM1D mutations silence NAPRT gene expression and confer NAMPT inhibitor sensitivity in glioma. *Nat Commun* **10**, 3790, doi:10.1038/s41467-019-11732-6 (2019).
- 99 Piacente, F. *et al.* Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase Regulates Cancer Cell Metabolism, Susceptibility to NAMPT Inhibitors, and DNA Repair. *Cancer Res* **77**, 3857-3869, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-3079 (2017).
- 100 Hara, N. *et al.* Elevation of cellular NAD levels by nicotinic acid and involvement of nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human cells. *J Biol Chem* **282**, 24574-24582, doi:10.1074/jbc.M610357200 (2007).
- 101 Ghanem, M. S., Monacelli, F. & Nencioni, A. Advances in NAD-Lowering Agents for Cancer Treatment. *Nutrients* **13**, doi:10.3390/nu13051665 (2021).
- 102 Gaut, Z. N. & Solomon, H. M. Uptake and metabolism of nicotinic acid by human blood platelets. Effects of structure analogs and metabolic inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **201**, 316-322, doi:10.1016/0304-4165(70)90306-5 (1970).
- 103 von Heideman, A., Berglund, A., Larsson, R. & Nygren, P. Safety and efficacy of NAD depleting cancer drugs: results of a phase I clinical trial of CHS 828 and overview of published data. *Cancer Chemother Pharmacol* **65**, 1165-1172, doi:10.1007/s00280-009-1125-3 (2010).
- 104 O'Brien, T. *et al.* Supplementation of nicotinic acid with NAMPT inhibitors results in loss of in vivo efficacy in NAPRT1-deficient tumor models. *Neoplasia* **15**, 1314-1329, doi:10.1593/neo.131718 (2013).
- 105 Xiao, Y. *et al.* Dependence of tumor cell lines and patient-derived tumors on the NAD salvage pathway renders them sensitive to NAMPT inhibition with GNE-618. *Neoplasia* **15**, 1151-1160, doi:10.1593/neo.131304 (2013).
- 106 Adams, D. J. *et al.* NAMPT is the cellular target of STF-31-like small-molecule probes. *ACS Chem Biol* **9**, 2247-2254, doi:10.1021/cb500347p (2014).
- 107 Kraus, D. *et al.* Targeting glucose transport and the NAD pathway in tumor cells with STF-31: a re-evaluation. *Cell Oncol (Dordr)* **41**, 485-494, doi:10.1007/s13402-018-0385-5 (2018).

- 108 Misner, D. L. *et al.* Cardiotoxicity Associated with Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibitors in Rodents and in Rat and Human-Derived Cells Lines. *Cardiovasc Toxicol* **17**, 307-318, doi:10.1007/s12012-016-9387-6 (2017).
- 109 Zabka, T. S. *et al.* Retinal toxicity, in vivo and in vitro, associated with inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Toxicol Sci* **144**, 163-172, doi:10.1093/toxsci/kfu268 (2015).
- 110 Zhao, G. *et al.* Discovery of a Highly Selective NAMPT Inhibitor That Demonstrates Robust Efficacy and Improved Retinal Toxicity with Nicotinic Acid Coadministration. *Mol Cancer Ther* **16**, 2677-2688, doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0674 (2017).
- 111 Abu Aboud, O. *et al.* Dual and Specific Inhibition of NAMPT and PAK4 By KPT-9274 Decreases Kidney Cancer Growth. *Mol Cancer Ther* **15**, 2119-2129, doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0197 (2016).
- 112 Aboukameel, A. *et al.* Novel p21-Activated Kinase 4 (PAK4) Allosteric Modulators Overcome Drug Resistance and Stemness in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* **16**, 76-87, doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0205 (2017).
- 113 Rane, C. *et al.* A novel orally bioavailable compound KPT-9274 inhibits PAK4, and blocks triple negative breast cancer tumor growth. *Sci Rep* **7**, 42555, doi:10.1038/srep42555 (2017).
- 114 Radu, M., Semenova, G., Kosoff, R. & Chernoff, J. PAK signalling during the development and progression of cancer. *Nat Rev Cancer* **14**, 13-25, doi:10.1038/nrc3645 (2014).
- 115 Korotchkina, L. *et al.* OT-82, a novel anticancer drug candidate that targets the strong dependence of hematological malignancies on NAD biosynthesis. *Leukemia* **34**, 1828-1839, doi:10.1038/s41375-019-0692-5 (2020).
- 116 Somers, K. *et al.* Effective targeting of NAMPT in patient-derived xenograft models of high-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **34**, 1524-1539, doi:10.1038/s41375-019-0683-6 (2020).
- 117 Carnero, A. & Leonart, M. The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution. *Bioessays* **38 Suppl 1**, S65-74, doi:10.1002/bies.201670911 (2016).
- 118 Peiris-Pages, M., Martinez-Outschoorn, U. E., Pestell, R. G., Sotgia, F. & Lisanti, M. P. Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Res* **18**, 55, doi:10.1186/s13058-016-0712-6 (2016).
- 119 Bao, B., Ahmad, A., Azmi, A. S., Ali, S. & Sarkar, F. H. Overview of cancer stem cells (CSCs) and mechanisms of their regulation: implications for cancer therapy. *Curr Protoc Pharmacol* **Chapter 14**, Unit 14 25, doi:10.1002/0471141755.ph1425s61 (2013).
- 120 Espinosa-Sanchez, A., Suarez-Martinez, E., Sanchez-Diaz, L. & Carnero, A. Therapeutic Targeting of Signaling Pathways Related to Cancer Stemness. *Front Oncol* **10**, 1533, doi:10.3389/fonc.2020.01533 (2020).
- 121 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024 (2006).
- 122 Fessler, E., Dijkgraaf, F. E., De Sousa, E. M. F. & Medema, J. P. Cancer stem cell dynamics in tumor progression and metastasis: is the microenvironment to blame? *Cancer Lett* **341**, 97-104, doi:10.1016/j.canlet.2012.10.015 (2013).
- 123 Snyder, V., Reed-Newman, T. C., Arnold, L., Thomas, S. M. & Anant, S. Cancer Stem Cell Metabolism and Potential Therapeutic Targets. *Front Oncol* **8**, 203, doi:10.3389/fonc.2018.00203 (2018).
- 124 Teslaa, T. & Teitell, M. A. Pluripotent stem cell energy metabolism: an update. *EMBO J* **34**, 138-153, doi:10.15252/embj.201490446 (2015).
- 125 Sancho, P., Barneda, D. & Heeschen, C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br J Cancer* **114**, 1305-1312, doi:10.1038/bjc.2016.152 (2016).
- 126 Deshmukh, A., Deshpande, K., Arfuso, F., Newsholme, P. & Dharmarajan, A. Cancer stem cell metabolism: a potential target for cancer therapy. *Mol Cancer* **15**, 69, doi:10.1186/s12943-016-0555-x (2016).
- 127 Karsten, U. & Goletz, S. What makes cancer stem cell markers different? *Springerplus* **2**, 301, doi:10.1186/2193-1801-2-301 (2013).
- 128 Son, M. J. *et al.* Nicotinamide overcomes pluripotency deficits and reprogramming barriers. *Stem Cells* **31**, 1121-1135, doi:10.1002/stem.1368 (2013).

- 129 Yuan, Y. *et al.* Autofluorescence of NADH is a new biomarker for sorting and characterizing cancer stem cells in human glioma. *Stem Cell Res Ther* **10**, 330, doi:10.1186/s13287-019-1467-7 (2019).
- 130 Bonuccelli, G., De Francesco, E. M., de Boer, R., Tanowitz, H. B. & Lisanti, M. P. NADH autofluorescence, a new metabolic biomarker for cancer stem cells: Identification of Vitamin C and CAPE as natural products targeting "stemness". *Oncotarget* **8**, 20667-20678, doi:10.18632/oncotarget.15400 (2017).
- 131 Herrera-Arozamena, C., Marti-Mari, O., Estrada, M., de la Fuente Revenga, M. & Rodriguez-Franco, M. I. Recent Advances in Neurogenic Small Molecules as Innovative Treatments for Neurodegenerative Diseases. *Molecules* **21**, doi:10.3390/molecules21091165 (2016).
- 132 Sung H, F. J., Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. . *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.* , <<http://globocan.iarc.fr/>> (2020).
- 133 Cohen, N., Fedewa, S. & Chen, A. Y. Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* **30**, 381-395, doi:10.1016/j.coms.2018.06.001 (2018).
- 134 Gao, G. & Smith, D. I. Human Papillomavirus and the Development of Different Cancers. *Cytogenet Genome Res* **150**, 185-193, doi:10.1159/000458166 (2016).
- 135 Marur, S. & Forastiere, A. A. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* **83**, 489-501, doi:10.4065/83.4.489 (2008).
- 136 Rettig, E. M. & D'Souza, G. Epidemiology of head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am* **24**, 379-396, doi:10.1016/j.soc.2015.03.001 (2015).
- 137 Puram, S. V. & Rocco, J. W. Molecular Aspects of Head and Neck Cancer Therapy. *Hematol Oncol Clin North Am* **29**, 971-992, doi:10.1016/j.hoc.2015.07.003 (2015).
- 138 Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129-1136, doi:10.1016/0092-8674(90)90409-8 (1990).
- 139 Giarre, M. *et al.* Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *J Virol* **75**, 4705-4712, doi:10.1128/JVI.75.10.4705-4712.2001 (2001).
- 140 Klussmann, J. P. *et al.* Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* **162**, 747-753, doi:10.1016/S0002-9440(10)63871-0 (2003).
- 141 Ang, K. K. *et al.* Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* **363**, 24-35, doi:10.1056/NEJMoa0912217 (2010).
- 142 Auperin, A. Epidemiology of head and neck cancers: an update. *Curr Opin Oncol* **32**, 178-186, doi:10.1097/CCO.0000000000000629 (2020).
- 143 Stadler, M. E., Patel, M. R., Couch, M. E. & Hayes, D. N. Molecular biology of head and neck cancer: risks and pathways. *Hematol Oncol Clin North Am* **22**, 1099-1124, vii, doi:10.1016/j.hoc.2008.08.007 (2008).
- 144 Guo, T. & Califano, J. A. Molecular biology and immunology of head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am* **24**, 397-407, doi:10.1016/j.soc.2015.03.002 (2015).
- 145 Leemans, C. R., Snijders, P. J. F. & Brakenhoff, R. H. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* **18**, 269-282, doi:10.1038/nrc.2018.11 (2018).
- 146 Kalyankrishna, S. & Grandis, J. R. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* **24**, 2666-2672, doi:10.1200/JCO.2005.04.8306 (2006).
- 147 Jameson, M. J. *et al.* Activation of the insulin-like growth factor-1 receptor induces resistance to epidermal growth factor receptor antagonism in head and neck squamous carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* **10**, 2124-2134, doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0294 (2011).
- 148 Day, T. A. *et al.* Inhibition of mTOR Signaling and Clinical Activity of Rapamycin in Head and Neck Cancer in a Window of Opportunity Trial. *Clin Cancer Res* **25**, 1156-1164, doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-2024 (2019).
- 149 Amornphimoltham, P. *et al.* Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* **65**, 9953-9961, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0921 (2005).
- 150 Graziano, A. *et al.* The stem cell hypothesis in head and neck cancer. *J Cell Biochem* **103**, 408-412, doi:10.1002/jcb.21436 (2008).

- 151 Chen, D. & Wang, C. Y. Targeting cancer stem cells in squamous cell carcinoma. *Precis Clin Med* **2**, 152-165, doi:10.1093/pcmedi/pbz016 (2019).
- 152 de Moraes, F. P. *et al.* Expression of stem cell markers in oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* **123**, 113-122, doi:10.1016/j.oooo.2016.09.009 (2017).
- 153 Prince, M. E. *et al.* Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 973-978, doi:10.1073/pnas.0610117104 (2007).
- 154 Sayed, S. I. *et al.* Implications of understanding cancer stem cell (CSC) biology in head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncol* **47**, 237-243, doi:10.1016/j.oraloncology.2011.02.009 (2011).
- 155 Kokko, L. L. *et al.* Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous-cell carcinoma. *Oral Oncol* **47**, 510-516, doi:10.1016/j.oraloncology.2011.03.026 (2011).
- 156 Mack, B. & Gires, O. CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *PLoS One* **3**, e3360, doi:10.1371/journal.pone.0003360 (2008).
- 157 van Hal, N. L., van Dongen, G. A., Stigter-van Walsum, M., Snow, G. B. & Brakenhoff, R. H. Characterization of CD44v6 isoforms in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* **82**, 837-845, doi:10.1002/(sici)1097-0215(19990909)82:6<837::aid-ijc12>3.0.co;2-h (1999).
- 158 Margaritescu, C., Pirici, D., Simionescu, C. & Stepan, A. The utility of CD44, CD117 and CD133 in identification of cancer stem cells (CSC) in oral squamous cell carcinomas (OSCC). *Rom J Morphol Embryol* **52**, 985-993 (2011).
- 159 Zhang, Q. *et al.* A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett* **289**, 151-160, doi:10.1016/j.canlet.2009.08.010 (2010).
- 160 Harper, L. J., Piper, K., Common, J., Fortune, F. & Mackenzie, I. C. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* **36**, 594-603, doi:10.1111/j.1600-0714.2007.00617.x (2007).
- 161 Modur, V. *et al.* CD24 Expression May Play a Role as a Predictive Indicator and a Modulator of Cisplatin Treatment Response in Head and Neck Squamous Cellular Carcinoma. *PLoS One* **11**, e0156651, doi:10.1371/journal.pone.0156651 (2016).
- 162 Zimmerer, R. M. *et al.* CD24+ tumor-initiating cells from oral squamous cell carcinoma induce initial angiogenesis in vivo. *Microvasc Res* **112**, 101-108, doi:10.1016/j.mvr.2017.03.006 (2017).
- 163 Han, J., Fujisawa, T., Husain, S. R. & Puri, R. K. Identification and characterization of cancer stem cells in human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* **14**, 173, doi:10.1186/1471-2407-14-173 (2014).
- 164 Ghuwalewala, S. *et al.* CD44(high)CD24(low) molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Stem Cell Res* **16**, 405-417, doi:10.1016/j.scr.2016.02.028 (2016).
- 165 Hildebrand, L. C. *et al.* Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* **43**, 499-506, doi:10.1111/jop.12169 (2014).
- 166 Clay, M. R. *et al.* Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck* **32**, 1195-1201, doi:10.1002/hed.21315 (2010).
- 167 Chen, Y. C. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **385**, 307-313, doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.048 (2009).
- 168 Zhu, C. T. & Rand, D. M. A hydrazine coupled cycling assay validates the decrease in redox ratio under starvation in *Drosophila*. *PLoS One* **7**, e47584, doi:10.1371/journal.pone.0047584 (2012).
- 169 Beaver, C. M., Ahmed, A. & Masters, J. R. Clonogenicity: holoclones and meroclones contain stem cells. *PLoS One* **9**, e89834, doi:10.1371/journal.pone.0089834 (2014).
- 170 Barrandon, Y. & Green, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2302-2306, doi:10.1073/pnas.84.8.2302 (1987).

- 171 Locke, M., Heywood, M., Fawell, S. & Mackenzie, I. C. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res* **65**, 8944-8950, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0931 (2005).
- 172 Li, H., Chen, X., Calhoun-Davis, T., Claypool, K. & Tang, D. G. PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. *Cancer Res* **68**, 1820-1825, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5878 (2008).
- 173 Fukusumi, T. *et al.* CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* **111**, 506-514, doi:10.1038/bjc.2014.289 (2014).
- 174 Piattelli, A. *et al.* CD10 expression in stromal cells of oral cavity squamous cell carcinoma: a clinic and pathologic correlation. *Oral Dis* **12**, 301-304, doi:10.1111/j.1601-0825.2005.01196.x (2006).
- 175 Li, Q. *et al.* High level of CD10 expression is associated with poor overall survival in patients with head and neck cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* **50**, 857-864, doi:10.1016/j.ijom.2020.07.037 (2021).
- 176 Lee, C. H., Yu, C. C., Wang, B. Y. & Chang, W. W. Tumorsphere as an effective in vitro platform for screening anti-cancer stem cell drugs. *Oncotarget* **7**, 1215-1226, doi:10.18632/oncotarget.6261 (2016).
- 177 Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W. M., Clarke, M. F. & Wicha, M. S. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* **36 Suppl 1**, 59-72, doi:10.1046/j.1365-2184.36.s.1.6.x (2003).
- 178 Dontu, G. *et al.* In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* **17**, 1253-1270, doi:10.1101/gad.1061803 (2003).
- 179 Faber, A. *et al.* Interaction of a CD44+ head and neck squamous cell carcinoma cell line with a stromal cell-derived factor-1-expressing supportive niche: An in vitro model. *Oncol Lett* **7**, 82-86, doi:10.3892/ol.2013.1673 (2014).
- 180 Lammert, A. *et al.* [The tumor stem cell niche of head and neck - point of intersection with therapeutic potential?]. *Laryngorhinootologie* **100**, 23-29, doi:10.1055/a-1260-3054 (2021).
- 181 Faber, A., Hoermann, K., Stern-Straeter, J., Schultz, D. J. & Goessler, U. R. Functional effects of SDF-1alpha on a CD44(+) CXCR4(+) squamous cell carcinoma cell line as a model for interactions in the cancer stem cell niche. *Oncol Rep* **29**, 579-584, doi:10.3892/or.2012.2171 (2013).
- 182 Li, X. *et al.* CXCL12/CXCR4 pathway orchestrates CSC-like properties by CAF recruited tumor associated macrophage in OSCC. *Exp Cell Res* **378**, 131-138, doi:10.1016/j.yexcr.2019.03.013 (2019).
- 183 Goncalves, B. O. P. *et al.* Central nervous system (CNS) tumor cell heterogeneity contributes to differential platinum-based response in an in vitro 2D and 3D cell culture approach. *Exp Mol Pathol* **116**, 104520, doi:10.1016/j.yexmp.2020.104520 (2020).
- 184 Scheuermann, R. H. & Racila, E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. *Leuk Lymphoma* **18**, 385-397, doi:10.3109/10428199509059636 (1995).
- 185 Boucher, K. *et al.* Stemness of B-cell progenitors in multiple myeloma bone marrow. *Clin Cancer Res* **18**, 6155-6168, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0531 (2012).
- 186 Chung, E. Y. *et al.* CD19 is a major B cell receptor-independent activator of MYC-driven B-lymphomagenesis. *J Clin Invest* **122**, 2257-2266, doi:10.1172/JCI45851 (2012).
- 187 Poe, J. C., Minard-Colin, V., Kountikov, E. I., Haas, K. M. & Tedder, T. F. A c-Myc and surface CD19 signaling amplification loop promotes B cell lymphoma development and progression in mice. *J Immunol* **189**, 2318-2325, doi:10.4049/jimmunol.1201000 (2012).
- 188 Zhang, S. *et al.* Characteristics of B lymphocyte infiltration in HPV(+) head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* **112**, 1402-1416, doi:10.1111/cas.14834 (2021).
- 189 Zeng, H. *et al.* HPV infection related immune infiltration gene associated therapeutic strategy and clinical outcome in HNSCC. *BMC Cancer* **20**, 796, doi:10.1186/s12885-020-07298-y (2020).
- 190 Kim, S. S. *et al.* B Cells Improve Overall Survival in HPV-Associated Squamous Cell Carcinomas and Are Activated by Radiation and PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res* **26**, 3345-3359, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-3211 (2020).

- 191 Wang, L. *et al.* A novel seven-gene panel predicts the sensitivity and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma treated with platinum-based radio(chemo)therapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, doi:10.1007/s00405-021-06717-5 (2021).
- 192 Yan, M. *et al.* Plasma membrane proteomics of tumor spheres identify CD166 as a novel marker for cancer stem-like cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cell Proteomics* **12**, 3271-3284, doi:10.1074/mcp.M112.025460 (2013).
- 193 Mezzanzanica, D. *et al.* Subcellular localization of activated leukocyte cell adhesion molecule is a molecular predictor of survival in ovarian carcinoma patients. *Clin Cancer Res* **14**, 1726-1733, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0428 (2008).
- 194 Swart, G. W., Lunter, P. C., Kilsdonk, J. W. & Kempen, L. C. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166): signaling at the divide of melanoma cell clustering and cell migration? *Cancer Metastasis Rev* **24**, 223-236, doi:10.1007/s10555-005-1573-0 (2005).
- 195 Tachezy, M. *et al.* ALCAM (CD166) expression as novel prognostic biomarker for pancreatic neuroendocrine tumor patients. *J Surg Res* **170**, 226-232, doi:10.1016/j.jss.2011.06.002 (2011).
- 196 Minner, S. *et al.* Low activated leukocyte cell adhesion molecule expression is associated with advanced tumor stage and early prostate-specific antigen relapse in prostate cancer. *Hum Pathol* **42**, 1946-1952, doi:10.1016/j.humpath.2011.02.017 (2011).
- 197 Ihnen, M. *et al.* Protein expression analysis of ALCAM and CEACAM6 in breast cancer metastases reveals significantly increased ALCAM expression in metastases of the skin. *J Clin Pathol* **64**, 146-152, doi:10.1136/jcp.2010.082602 (2011).
- 198 Clauditz, T. S. *et al.* Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Pathol Res Pract* **210**, 649-655, doi:10.1016/j.prp.2014.06.012 (2014).
- 199 Nicolau-Neto, P. *et al.* Transcriptome Analysis Identifies ALCAM Overexpression as a Prognosis Biomarker in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)* **12**, doi:10.3390/cancers12020470 (2020).
- 200 Pidugu, V. K. *et al.* IFIT1 and IFIT3 promote oral squamous cell carcinoma metastasis and contribute to the anti-tumor effect of gefitinib via enhancing p-EGFR recycling. *Oncogene* **38**, 3232-3247, doi:10.1038/s41388-018-0662-9 (2019).
- 201 Nushtaeva, A. A. *et al.* Characterization of primary normal and malignant breast cancer cell and their response to chemotherapy and immunostimulatory agents. *BMC Cancer* **18**, 728, doi:10.1186/s12885-018-4635-8 (2018).
- 202 Chen, S. *et al.* SOX2 regulates apoptosis through MAP4K4-survivin signaling pathway in human lung cancer cells. *Carcinogenesis* **35**, 613-623, doi:10.1093/carcin/bgt371 (2014).
- 203 Gao, X., Gao, C., Liu, G. & Hu, J. MAP4K4: an emerging therapeutic target in cancer. *Cell Biosci* **6**, 56, doi:10.1186/s13578-016-0121-7 (2016).
- 204 Dai, Z., Wang, K. & Gao, Y. The critical role of B4GALT4 in promoting microtubule spindle assembly in HCC through the regulation of PLK1 and RHAMM expression. *J Cell Physiol*, doi:10.1002/jcp.30531 (2021).
- 205 Wen, H. *et al.* ZMYND11 links histone H3.3K36me3 to transcription elongation and tumour suppression. *Nature* **508**, 263-268, doi:10.1038/nature13045 (2014).
- 206 Zhang, Z., Xu, L., Hu, Z., Yang, B. & Xu, J. MicroRNA-196b promotes cell growth and metastasis of ovarian cancer by targeting ZMYND11. *Minerva Med*, doi:10.23736/S0026-4806.20.06654-9 (2020).
- 207 Asai, S. *et al.* Silencing of ECHDC1 inhibits growth of gemcitabine-resistant bladder cancer cells. *Oncol Lett* **15**, 522-527, doi:10.3892/ol.2017.7269 (2018).
- 208 Gao, C. *et al.* High intratumoral expression of eIF4A1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and predicts unfavorable prognosis in gastric cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **52**, 310-319, doi:10.1093/abbs/gmz168 (2020).
- 209 Zhao, M. *et al.* Aberrant Expression Of PDCD4/eIF4A1 Signal Predicts Postoperative Recurrence For Early-Stage Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Manag Res* **11**, 9553-9562, doi:10.2147/CMAR.S223273 (2019).
- 210 Raman, D. & Tiwari, A. K. Role of eIF4A1 in triple-negative breast cancer stem-like cell-mediated drug resistance. *Cancer Rep (Hoboken)*, e1299, doi:10.1002/cnr2.1299 (2020).
- 211 Bouwman, P. *et al.* 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 688-695, doi:10.1038/nsmb.1831 (2010).

- 212 De Gregoriis, G. *et al.* DNA repair genes PAXIP1 and TP53BP1 expression is associated
with breast cancer prognosis. *Cancer Biol Ther* **18**, 439-449,
doi:10.1080/15384047.2017.1323590 (2017).
- 213 Ding, Y. *et al.* ZNF131 suppresses centrosome fragmentation in glioblastoma stem-like
cells through regulation of HAUS5. *Oncotarget* **8**, 48545-48562,
doi:10.18632/oncotarget.18153 (2017).
- 214 Mo, J. *et al.* DDX3X: structure, physiologic functions and cancer. *Mol Cancer* **20**, 38,
doi:10.1186/s12943-021-01325-7 (2021).
- 215 Snijders Blok, L. *et al.* Mutations in DDX3X Are a Common Cause of Unexplained
Intellectual Disability with Gender-Specific Effects on Wnt Signaling. *Am J Hum Genet* **97**,
343-352, doi:10.1016/j.ajhg.2015.07.004 (2015).
- 216 Kim, H. M., Han, J. W. & Chan, J. Y. Nuclear Factor Erythroid-2 Like 1 (NFE2L1): Structure,
function and regulation. *Gene* **584**, 17-25, doi:10.1016/j.gene.2016.03.002 (2016).
- 217 Zhang, Y. & Manning, B. D. mTORC1 signaling activates NRF1 to increase cellular
proteasome levels. *Cell Cycle* **14**, 2011-2017, doi:10.1080/15384101.2015.1044188 (2015).
- 218 Haberle, J. *et al.* Congenital glutamine deficiency with glutamine synthetase mutations. *N
Engl J Med* **353**, 1926-1933, doi:10.1056/NEJMoa050456 (2005).
- 219 Mani, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of
stem cells. *Cell* **133**, 704-715, doi:10.1016/j.cell.2008.03.027 (2008).
- 220 Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions
in development and disease. *Cell* **139**, 871-890, doi:10.1016/j.cell.2009.11.007 (2009).
- 221 Singh, A. & Settleman, J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of
evil in the war on cancer. *Oncogene* **29**, 4741-4751, doi:10.1038/onc.2010.215 (2010).
- 222 Al Saleh, S., Sharaf, L. H. & Luqmani, Y. A. Signalling pathways involved in endocrine
resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition
(Review). *Int J Oncol* **38**, 1197-1217, doi:10.3892/ijo.2011.942 (2011).
- 223 Xue, T. C. *et al.* Goosecoid promotes the metastasis of hepatocellular carcinoma by
modulating the epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* **9**, e109695,
doi:10.1371/journal.pone.0109695 (2014).
- 224 Olesen, U. H., Thougard, A. V., Jensen, P. B. & Sehested, M. A preclinical study on the
rescue of normal tissue by nicotinic acid in high-dose treatment with APO866, a specific
nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitor. *Mol Cancer Ther* **9**, 1609-1617,
doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-1130 (2010).
- 225 Tarrant, J. M. *et al.* Preclinical models of nicotinamide phosphoribosyltransferase
inhibitor-mediated hematotoxicity and mitigation by co-treatment with nicotinic acid.
Toxicol Mech Methods **25**, 201-211, doi:10.3109/15376516.2015.1014080 (2015).
- 226 Holen, K., Saltz, L. B., Hollywood, E., Burk, K. & Hanauske, A. R. The pharmacokinetics,
toxicities, and biologic effects of FK866, a nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis
inhibitor. *Invest New Drugs* **26**, 45-51, doi:10.1007/s10637-007-9083-2 (2008).
- 227 Rizzo, D. *et al.* Stem cell markers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas in
relation to the site of origin and HPV infection: clinical implications. *Acta
Otorhinolaryngol Ital* **40**, 90-98, doi:10.14639/0392-100X-2419 (2020).
- 228 Roh, V. *et al.* Cellular Barcoding Identifies Clonal Substitution as a Hallmark of Local
Recurrence in a Surgical Model of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cell Rep* **25**,
2208-2222 e2207, doi:10.1016/j.celrep.2018.10.090 (2018).
- 229 Maguer-Satta, V., Besancon, R. & Bachelard-Cascales, E. Concise review: neutral
endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological
mechanisms, and cancer. *Stem Cells* **29**, 389-396, doi:10.1002/stem.592 (2011).
- 230 Palin, M. F. *et al.* Visfatin expression is not associated with adipose tissue abundance in
the porcine model. *Domest Anim Endocrinol* **35**, 58-73,
doi:10.1016/j.domaniend.2008.01.008 (2008).
- 231 Duarte-Pereira, S. *et al.* NAMPT and NAPRT1: novel polymorphisms and distribution of
variants between normal tissues and tumor samples. *Sci Rep* **4**, 6311,
doi:10.1038/srep06311 (2014).
- 232 Saddi-Rosa, P., Oliveira, C. S., Giuffrida, F. M. & Reis, A. F. Visfatin, glucose metabolism
and vascular disease: a review of evidence. *Diabetol Metab Syndr* **2**, 21, doi:10.1186/1758-
5996-2-21 (2010).

- 233 Rankin, P. W., Jacobson, E. L., Benjamin, R. C., Moss, J. & Jacobson, M. K. Quantitative studies of inhibitors of ADP-ribosylation in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **264**, 4312-4317 (1989).
- 234 Bockwoldt, M. *et al.* Identification of evolutionary and kinetic drivers of NAD-dependent signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 15957-15966, doi:10.1073/pnas.1902346116 (2019).
- 235 Gao, Y., Martin, N. I. & van Haren, M. J. Nicotinamide N-methyl transferase (NNMT): An emerging therapeutic target. *Drug Discov Today* **26**, 2699-2706, doi:10.1016/j.drudis.2021.05.011 (2021).
- 236 Bitterman, K. J., Anderson, R. M., Cohen, H. Y., Latorre-Esteves, M. & Sinclair, D. A. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* **277**, 45099-45107, doi:10.1074/jbc.M205670200 (2002).
- 237 Ghislain, M., Talla, E. & Francois, J. M. Identification and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* nicotinamidase gene, PNC1. *Yeast* **19**, 215-224, doi:10.1002/yea.810 (2002).
- 238 Shats, I. *et al.* Bacteria Boost Mammalian Host NAD Metabolism by Engaging the Deamidated Biosynthesis Pathway. *Cell Metab* **31**, 564-579 e567, doi:10.1016/j.cmet.2020.02.001 (2020).

**ANEXO: CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS DURANTE LA
ETAPA DE DOCTORADO**

ESTANCIA:

Estancia breve durante la etapa de doctorado, en el centro *School of Medical Sciences* de la Universidad UNSW Sydney, Australia. 1/11/2019 – 1/02/2020

- Financiado por la beca CIBERONC A LA MOVILIDAD II (Convocatoria 2019)
- Investigador principal: PhD, Lindsay Wu (Jefe del grupo de *Laboratory for Aging Research*)

PUBLICACIONES

1. **Navas LE;** Carnero A. 2021. *NAD+ metabolism, stemness, the immune response, and cancer*. Signal Transduct Target Therapy. doi: 10.1038/s41392-020-00354-w
2. Lucena-Cacace A; Umeda M; **Navas LE;** Carnero A. 2019. NAMPT as a Dedifferentiation-Inducer Gene: *NAD+ as Core Axis for Glioma Cancer Stem-Like Cells Maintenance*. Frontiers in Oncology. doi: 10.3389/fonc.2019.00292
3. Muñoz-Galván S; Felipe-Abrio B; García-Carrasco M; Domínguez-Piñol J; Suarez-Martinez E; Verdugo-Sivianes EM; Espinosa-Sánchez A; **Navas LE;** Otero-Albiol D; Marin JJ; Jiménez-García MP; García-Heredia JM; Quiroga AG; Estevez-García P; Carnero A. 2019. *New markers for human ovarian cancer that link platinum resistance to the cancer stem cell phenotype and define new therapeutic combinations and diagnostic tools*. J Exp Clin Cancer Res. doi: 10.1186/s13046-019-1245-5
4. Verdugo-Sivianes EM; **Navas LE;** Molina-Pinelo S; Ferrer I; Quintanal-Villalonga A; Peinado J; García-Heredia JM; Felipe-Abrio B; Muñoz-Galván S; Marín JJ; Montuenga L; Paz-Ares L; Carnero A. 2017. *Coordinated downregulation of Spinophilin and the catalytic subunits of PP1, PPP1CA/B/C, contributes to a worse prognosis in lung cancer*. Oncotarget. doi: 10.18632/oncotarget.22111
5. Perez M; **Navas L;** Carnero A. 2016. *Patient-derived xenografts as models for personalized medicine research in cancer*. Cancer Translational Medicine. doi:10.4103/2395-3977.196913

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

1. IV Young Researchers Meeting of CIBERONC_ BBN.

Barcelona (España) 13/12/2021-14/12/2021

Póster 1: Sanchez-Díaz L; **Navas LE**; Suarez-Martinez E; Felipe-Abrio B; Fernández-Rozadilla C; Verdugo-Sivianes EM; Chavez-Conde M; Chiara MD; Garcia-Mayea Y; Celis-Romero M; Ortega-Campos SM; Blanco-Alcaina E; Leonart ME; Muñoz-Galvan S; Carracedo A; Rodrigo JM; Carnero A. *Biomarkers profile related to stemness and therapy resistance in head and neck squamous cell carcinoma tumors.*

Póster 2: Espinosa-Sánchez A; Verdugo-Sivianes EM; Muñoz-Galvan S; **Navas LE**; Suarez-Martinez E; Sanchez-Díaz L; García-Heredía JM; Clemente-García C; Vazquez-Gutierrez I; Blanco-Alcaina E; Ortega-Campos S; Celis-Romero M; Carnero A. *The relevance of PAPPA, a new partner of the tumor suppressor SPN.*

2. III National Congress for Young Researchers in Biomedicine.

Valencia (España) 24/04/2019-26/04/2019

Póster: Verdugo-Sivianes EM; **Navas LE**; Molina-Pinelo S; Ferrer I; Quintanal-Villalonga A; Peinado J; García-Heredía JM; Felipe-Abrio B; Muñoz-Galván S; Marín JJ; Montuenga L; Paz-Ares L; Carnero A. *Coordinated downregulation of Spinophilin and the catalytic subunits of PP1, PPP1CA/B/C, contributes to a worse prognosis in lung cancer.*

3. 25th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (EACR25).

Amsterdam (Países Bajos) 30/06/2018-03/07/2018

Póster 1: Otero-Albiol D; Muñoz-Galván; Suarez-Martínez E; Verdugo-Sivianes EM; Jimenez-García MP; **Navas LE**; Perez M; García-Heredía JM; Peinado J; Carnero A. *Hypoxia-induced PLD2 promotes tumorigenesis and stem cell-like properties in tumor cells.*

Póster 2: Verdugo-Sivianes EM; Felipe-Abrio B; Otero-Albiol D; Jiménez-García MP; **Navas LE**; Peinado J; Muñoz-Galván S; Perez M; García Heredia JM; Carnero A. *Prognosis relevance of PP1 in breast cancer.*

4. Jornadas Internacionales de Investigación e Innovación en Ciencias de la Salud.

Sevilla (España) 27/10/2016-28/10/2016

Póster: **Navas LE**; Marín JJ. *Determinación de la relación transcripcional del complejo de Espinofilina en tumores humanos.*

CONTRIBUCIONES EN DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

- 1. Proyecto 11 de Febrero.** En Colegio RR calasancias, Sevilla (España) 11/02/2019
Título de la charla: "¿Qué significa ser científic@?" Por **Navas LE.**
- 2. I Jornadas Técnico-Científicas: La mujer y la niña en la Ciencia.** En IES Torre de los Herberos, Sevilla (España) 26/02/2019
Título de la charla: "Tú también puedes ser científica" Por **Navas LE.**