



Universidad de Oviedo

Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado “Biomedicina y Oncología

Molecular”

**“Estrategia de medicina de precisión en
sarcomas basada en el uso de cultivos primarios
derivados de paciente”**

TESIS DOCTORAL

Verónica Rey Vázquez

10/11/2022



Universidad de Oviedo

Tesis Doctoral

**“Estrategia de medicina de precisión en
sarcomas basada en el uso de cultivos primarios
derivados de paciente”**

**Verónica Rey
Vázquez**

Doctoranda

**René Rodríguez
González**

Director

**César Antonio
Álvarez Marcos**

Tutor



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: ESTRATEGIA DE MEDICINA DE PRECISIÓN EN SARCOMAS BASADA EN EL USO DE CULTIVOS PRIMARIOS DERIVADOS DE PACIENTES	Inglés: PRECISION MEDICINE STRATEGIES USING PATIENT-DERIVED SARCOMA PRIMARY CELL LINES
2.- Autor	
Nombre: VERÓNICA REY VÁZQUEZ	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR	
Órgano responsable: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS (IUOPA)	

RESUMEN (en español)

Los sarcomas constituyen un grupo heterogéneo de tumores donde los tratamientos actuales suelen ser inespecíficos, poco eficientes y no previenen la aparición de metástasis, por esta razón la propuesta de nuevas terapias es fundamental para mejorar la calidad de vida de estos pacientes. Hoy en día, sabemos que el origen de los sarcomas puede producirse a partir de células madre mesenquimales (MSCs) que han adquirido una serie de mutaciones y que actúan como célula de origen. Precisamente dentro de los eventos iniciales de sarcomagénesis destaca la aparición de subpoblaciones de células madre tumorales (CSC, *Cancer Stem Cells*) que surgen durante la evolución tumoral a partir de la célula de origen y a las que se les atribuye la capacidad de colonizar nuevos nichos, metastatizar y resistir los tratamientos quimioterápicos generalistas, por lo que serían responsables directas de las recidivas y la aparición de resistencias a los tratamientos actuales. Por tanto, la utilización de modelos en los que se pueda recapitular el proceso sarcomagénico a partir de la célula de origen es una

trabajo, empleamos un modelo de sarcoma pleomórfico indiferenciado generado a partir de un panel de MSCs humanas secuencialmente mutadas hasta alcanzar la capacidad de generar tumores en ratones inmunodeficientes, así como diferentes modelos celulares derivados de sarcomas de pacientes. Hemos descubierto que el factor de transcripción SOX2 juega un papel predominante en la adquisición de propiedades CSC en el proceso sarcomagénico. Mecánicamente, la pérdida o depleción de SOX2 evita la adquisición de propiedades tumorogénicas *in vivo*, y elimina propiedades CSC *in vitro*, como la capacidad de crecimiento formando esferas clonales en suspensión, mientras que las células con alta expresión de SOX2 son precisamente las más agresivas *in vivo*. Con todo ello, SOX2 constituye un marcador de incalculable valor que nos ha permitido rastrear las CSC durante los procesos tempranos de sarcomagénesis, y que, por tanto, podría jugar un papel relevante en el desarrollo de la enfermedad. En línea con estos resultados, el análogo de la mitramicina EC-8042 fue capaz de reducir el crecimiento tumoral eliminando de forma significativa las subpoblaciones CSC con expresión de SOX2, demostrando así su potencial terapéutico.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que los programas de medicina personalizada o de precisión son imprescindibles en la lucha contra el cáncer. El objetivo de la medicina personalizada es aplicar técnicas de NGS (*Next-Generation Sequencing*) a las muestras derivadas de pacientes para describir alteraciones genómicas y/o transcriptómicas inherentes a cada caso y así proponer terapias eficaces para cada paciente. La terapia personalizada es,



por tanto, una opción muy interesante para encontrar alteraciones en tumores tan heterogéneos como los sarcomas. Con esto en mente, en este trabajo hemos establecido y caracterizado nuevas PDCs (*Patient-Derived Cell Lines*) de varios tipos de sarcomas. Estos modelos derivados de paciente han sido utilizados para estudiar el potencial invasivo, las propiedades CSC y los procesos de deriva genómica que ocurren por su adaptación al entorno *in vitro* e *in vivo*. El empleo de técnicas NGS en estos modelos cercanos al paciente, nos ha permitido encontrar varias mutaciones con valor terapéutico, como TP53, SETD2 y, de forma relevante, una mutación en el gen metabólico Isocitrato Deshidrogenasa 2 (IDH2) en un caso de condrosarcoma dediferenciado. En este trabajo encontramos que enasidenib, un fármaco que se dirige de forma selectiva a células con IDH2 mutado, fue capaz de inhibir su actividad enzimática al reducir la acumulación del oncometabolito D-2-HG y demostró ser efectivo eliminando propiedades CSC *in vitro* y retrasando la formación de tumores *in vivo*. Hemos propuesto, por tanto, nuevas pruebas de concepto que servirán para el desarrollo de terapias dirigidas a propiedades CSC y a mutaciones específicas y, sobre todo, hemos establecido modelos cercanos al paciente para mejorar la medicina de precisión en sarcomas.

RESUMEN (en inglés)

Sarcomas comprise a heterogeneous group of tumors in which current treatments are usually non-specific, inefficient and do not prevent the appearance of metastases and relapses. Therefore, there is a need for a better understanding of the disease and the development of new therapies. For this group of malignancies, it has been described that mesenchymal stem cells (MSCs) that have acquired sequential mutations may constitute the cell-of-origin in sarcomas. Moreover, within the initial stages of sarcomagenesis an appearance of cancer stem cell subpopulations (CSCs) has been reported, which arise during tumor development from the cell of origin and are usually linked to drug resistance, being therefore most likely responsible for the recurrence of the disease and therapeutic failure. Thus, it is necessary to have reliable models to study the evolution of CSCs and to test effective therapies. In this work, we used an undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS) model generated from MSCs sequentially mutated to the point of being able to generate tumors in immunodeficient mice, as well as different sarcoma patient-derived models. We found that SOX2 is a pro-tumorigenic factor with prognostic potential in sarcoma. Besides, we observed that SOX2 depletion dramatically reduced the ability to form tumorspheres and to initiate tumor growth. Conversely, SOX2 overexpression resulted in increased tumorigenicity *in vivo*. Overall, SOX2 is a bona fide marker tracking CSCs during sarcomagenesis and most likely plays a relevant role in the development of sarcoma. According with these results, the mithramycin analogue EC-8042 was the most efficient chemotherapeutic drug in reducing SOX2 positive cells *in vitro* and *in vivo*.

For the cancer genomics era, there is a need for clinically annotated close-to-patient cell lines suitable to investigate altered signalling pathways and which may serve as high-throughput drug-screening platforms. Personalized medicine is an interesting option to find genomic alterations in sarcomas. In this work, we have established and characterized new sarcoma patient-derived cell lines (PDCs) on which we studied their invasion ability, CSCs properties and the genomic drift during *in vitro* and *in vivo* growth. Additionally, next generation sequencing (NGS) in these close-to-patients models has allowed us to find druggable mutations, such as TP53, SETD2 and, particularly, Isocitrate Dehydrogenase 2 (IDH2) mutation in a dedifferentiated chondrosarcoma model. This precise mutation led us to use Enasidenib, an IDH2 mutated specific inhibitor, that was able to inhibit its enzymatic activity by reducing the oncometabolite D-2-HG accumulation and, more interestingly, was capable to target CSCs-enriched cultures of mutant IDH2 cells. Furthermore, oral administration of enasidenib in xenografted mice resulted in complete abrogation of tumor growth *in vivo*.



Universidad de Oviedo

Summarizing, we have proposed new proofs of concept that will help to the development of targeted therapies against CSCs subpopulations and patient-specific gene alterations, highlighting the establishment of close-to-patient models to improve precision medicine in sarcomas.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR**

LISTADO DE ABREVIATURAS

α-KG	alfa-cetoglutarato
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ALDH	aldehído deshidrogenasa
AML	leucemia mieloide aguda
ASC	célula madre del tejido adiposo
bFGF	factor de crecimiento básico para fibroblastos
BM-MSC	células madre mesenquimales derivadas de médula ósea
BSA	seroalbúmina bovina
BS	sarcoma óseo
CFU	unidad formadora de colonia
CSC	célula madre tumoral
CNV	variación en el número de copias
CN-LOH	copia neutra-pérdida de heterocigosidad
CDS	condrosarcoma
CT	tomografía computarizada
DAB	diaminobencidina
DEAB	dietil-amino-benzaldheído
DDR	reparación del daño en el ADN
DEG	genes diferencialmente expresados
DMP	sitios diferencialmente metilados
EGF	factor de crecimiento epitelial

ESC	célula madre embrionaria
FAP	precursor fibro-adipogénico
FBS	suero fetal bovino
FDA	administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
FOSS	software libre y de código abierto
GFP	proteína verde fluorescente
GSEA	análisis de enriquecimiento de grupos de genes
H&E	hematoxilina-eosina
HDAC	histona deacetilasa
HPF	campo de alta potencia
IDH	isocitrato deshidrogenasa
i.b.	intraóseo
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenoso
LDA	ensayo de dilución límite
LGPL	licencia pública general reducida
MIC	célula iniciadora de metástasis
MAF	frecuencia de alelo menor
MAT	transición de mesenquimal a ameboide
MET	transición epitelio-mesénquima
MO	ostecondroma múltiple
MSC	célula madre mesenquimal
OXPHOS	sistema de fosforilación oxidativa
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RIPA	tampón de ensayo de inmunoprecipitación
ROS	especie reactiva de oxígeno

RTK	receptor tirosín-quinasa
RTV	volumen tumoral relativo
SBE	extensión de una sola base
s.c.	subcutáneo
shARN	secuencia de ARN de horquilla corta
siARN	secuencia de ARN de silenciamiento
SNP	polimorfismo de nucleótido único
SNV	variante de nucleótido único
STS	sarcoma de tejido blando
SP	población secundaria
STR	repetición corta en tándem
TCA	ciclo del ácido tricarboxílico
TGI	inhibición del crecimiento tumoral
TIF	frecuencia iniciadora de tumor
TMA	matriz de tejidos
UPS	sarcoma pleomórfico indiferenciado
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
WES	secuenciación de exoma completo

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen/abstract	1
Resumen.....	3
Abstract.....	5
Antecedentes	7
1. El cáncer y su origen.....	9
1.1. Desarrollo del fenotipo tumoral: célula de origen.....	9
1.2. Células madre tumorales.....	11
1.2.1. Fenotipo pluripotente.....	13
1.2.2. Invasión celular y metástasis.....	18
1.2.3. Aislamiento de subpoblaciones de células madre tumorales.....	20
1.3. Tratamiento del cáncer.....	23
1.3.1. Terapias estandarizadas en clínica.....	23
1.3.2. Terapias dirigidas: hacia la medicina personalizada.....	24
1.3.3. Resistencia a las terapias antitumorales.....	27
2. Sarcomas.....	30
2.1. Células madre mesenquimales en sarcomas.....	30
2.2. Células madre tumorales en sarcomas.....	31
2.2.1. Aislamiento de subpoblaciones de CSCs en sarcomas.....	33
2.3. Metástasis e invasión en sarcomas.....	34
2.4. Clasificación de los sarcomas.....	35
2.4.1. Condrosarcomas.....	37
2.4.1.1. Condrogénesis.....	37
2.4.1.2. Formación de neoplasias cartilagosas.....	38
2.4.1.3. Clasificación de los condrosarcomas.....	39
2.4.1.4. Alteraciones genéticas y epigenéticas en los condrosarcomas.....	41
2.4.1.5. Tratamiento sistémico convencional en los condrosarcomas.....	45
2.4.1.6. Terapias dirigidas en el tratamiento de los condrosarcomas.....	47
2.4.2. Sarcoma pleomórfico indiferenciado.....	51
2.4.2.1. Generación del modelo de UPS.....	52
Hipótesis y objetivos	57
Procedimientos experimentales	59
1. Métodos de biología molecular.....	61
1.1. Análisis de ADN.....	61
1.1.1. Secuenciación Sanger.....	61
1.1.2. Secuenciación de segunda generación.....	62
1.1.3. Secuenciación de exoma completo.....	62

1.1.4. Análisis del número de copias.....	64
1.1.5. Array de metilación.....	64
1.1.6. Análisis diferenciación de la metilación.....	64
1.2. Análisis de ARN.....	65
1.2.1. Retrotranscripción.....	65
1.2.2. PCR a tiempo real (RT-qPCR).....	65
1.3. Análisis de proteínas.....	67
1.3.1. Extracción de proteínas.....	67
1.3.2. Electroforesis y transferencia a membrana de nitrocelulosa.....	67
1.3.3. Detección y revelado.....	68
2. Cultivo celular.....	69
2.1. Líneas celulares empleadas en este trabajo.....	69
2.2. Mantenimiento de los cultivos celulares.....	71
2.3. Congelación y descongelación de líneas celulares.....	71
2.4. Cultivo de esferas clonales.....	72
2.5. Ensayos de diferenciación.....	73
2.6. Modificación de líneas celulares.....	73
2.6.1. Plásmidos.....	73
2.6.2. Amplificación del plásmido.....	73
2.6.3. Conservación del cultivo bacteriano.....	74
2.6.4. Extracción del ADN amplificado.....	75
2.6.5. Producción de particular lentivirales.....	75
2.6.6. Transducción con partículas lentivirales.....	75
2.6.7. Transfección transitoria.....	76
3. Ensayos en cultivos celulares.....	77
3.1. Crecimiento celular independiente de anclaje.....	77
3.2. Ensayos de toxicidad en esferas clonales.....	78
3.3. Ensayos de invasión de esferas en matrices de colágeno.....	78
3.4. Ensayos de viabilidad celular.....	79
3.4.1. WST-1.....	79
3.4.2. Capacidad de formación de colonias.....	80
3.5. Citometría de flujo y separación celular.....	81
3.6. Medición de los niveles de D-2-HG.....	82
3.7. Daño a nivel genómico: inmunofluorescencia.....	82
3.8. Fármacos e inhibidores utilizados en los cultivos celulares.....	83
4. Ensayos de crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	84
4.1. Establecimiento de xenógrafos tumorales.....	84
4.2. Tratamiento de xenógrafos tumorales.....	86
4.3. Tomografía computarizada.....	87
5. Análisis histopatológico.....	88

5.1. Procesamiento de las muestras.....	88
5.1.1. Inclusión en parafina.....	88
5.1.2. Microdissección.....	88
5.1.3. Desparafinado y rehidratación.....	89
5.1.4. Tinción.....	89
5.2. Matriz de tejidos de pacientes.....	90
5.3. Inmunodetección.....	91
Resultados	93
<u>Capítulo I:</u> Identificación de subpoblaciones de CSCs en sarcomas mediante el análisis de la expresión y la actividad transcripcional de SOX2 y evaluación de la eficacia de fármacos antitumorales dirigidos a estas subpoblaciones.....	95
1. SOX2 en sarcomas de pacientes se asocia a un mal pronóstico y supervivencia.....	97
2. SOX2 es necesario para mantener el potencial tumorigénico en sarcomas.....	99
3. Detección y aislamiento de subpoblaciones de CSCs con expresión de SOX2.....	103
4. SORE6 como herramienta para monitorizar la respuesta de CSCs a tratamientos...106	
<u>Capítulo II:</u> Caracterización de líneas primarias derivadas de condrosarcomas y análisis de su utilidad como herramienta para estudiar la deriva genética durante su crecimiento <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	113
1. Establecimiento y caracterización de las líneas primarias de condrosarcoma.....	115
2. Caracterización genética de las líneas de condrosarcoma.....	120
3. Secuenciación de exoma completo de las líneas de condrosarcoma.....	121
4. Análisis de subpoblaciones de CSCs en las líneas de condrosarcoma.....	127
5. Capacidad de invasión de las líneas de condrosarcoma.....	128
<u>Capítulo III:</u> Efecto de inhibidores específicos de las mutaciones encontradas en los modelos de sarcoma derivados de pacientes.....	131
1. Identificación de mutaciones diana en sarcomas de pacientes.....	133
2. Mutaciones en IDH como diana terapéutica en condrosarcoma.....	135
3. Efecto de enasidenib en la metilación del ADN y la expresión génica.....	139
4. Efecto de enasidenib <i>in vivo</i>	142
Discusión	145
Conclusiones/conclusions	157
Conclusiones.....	159
Conclusions.....	160
Artículos incluidos en esta Tesis Doctoral	161
Otros artículos derivados del periodo de Tesis Doctoral	165
Referencias	169

RESUMEN / ABSTRACT

Los sarcomas constituyen un grupo heterogéneo de tumores donde los tratamientos actuales son poco eficientes debido principalmente a la presencia de subpoblaciones de células madre tumorales (CSC) que surgen durante la evolución tumoral a partir de la célula de origen y a las que se les atribuye la capacidad de colonizar nuevos nichos, metastatizar y resistir los tratamientos quimioterápicos convencionales, por lo que serían responsables directas de las recidivas y la aparición de resistencias a los tratamientos actuales. Por tanto, la utilización de modelos en los que se pueda recapitular el proceso sarcomagénico a partir de la célula de origen es una poderosa herramienta para proponer nuevas terapias más eficaces contra las CSC. En este trabajo, empleamos un modelo de sarcoma pleomórfico indiferenciado generado a partir de un panel de MSCs humanas secuencialmente mutadas, así como diferentes modelos celulares derivados de sarcomas de pacientes. Hemos descubierto que el factor de transcripción SOX2 juega un papel predominante en la adquisición de propiedades CSC en el proceso sarcomagénico, constituyendo un marcador de incalculable valor que nos ha permitido rastrear las CSC durante los procesos tempranos de sarcomagénesis, y que, por tanto, podría jugar un papel relevante en el desarrollo de la enfermedad. En línea con estos resultados, el análogo de la mitramicina EC-8042 fue capaz de reducir el crecimiento tumoral eliminando de forma significativa las subpoblaciones CSC con expresión de SOX2, demostrando así su potencial terapéutico.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que los programas de medicina personalizada o de precisión son imprescindibles en la lucha contra el cáncer. El objetivo de la medicina personalizada es aplicar técnicas de *NGS* a las muestras derivadas de pacientes para describir alteraciones genómicas y/o transcriptómicas inherentes a cada caso y así proponer terapias eficaces para cada paciente. Con esto en mente, en este trabajo hemos establecido y caracterizado nuevas PDCs (*Patient-Derived Cell Lines*) de varios tipos de sarcomas. Estos modelos derivados de paciente han sido utilizados para estudiar el potencial invasivo, las propiedades CSC y los procesos de deriva genómica que ocurren por su adaptación al entorno *in vitro* e *in vivo*. El empleo de técnicas *NGS* en estos modelos cercanos al paciente, nos ha permitido encontrar varias mutaciones con valor terapéutico, como TP53, SETD2 y, de forma relevante, una mutación en el gen metabólico Isocitrato Deshidrogenasa 2 (IDH2) en un caso de condrosarcoma desdiferenciado. En este

Resumen

trabajo encontramos que enasidenib, un fármaco que se dirige de forma selectiva a células con IDH2 mutado, fue capaz de inhibir su actividad enzimática al reducir la acumulación del oncometabolito D-2-HG y demostró ser efectivo eliminando propiedades CSC *in vitro* y retrasando la formación de tumores *in vivo*. Hemos propuesto, por tanto, nuevas pruebas de concepto que servirán para el desarrollo de terapias dirigidas a propiedades CSC y a mutaciones específicas y, sobre todo, hemos establecido modelos cercanos al paciente para mejorar la medicina de precisión en sarcomas.

Abstract

Sarcomas comprise a heterogeneous group of tumors in which current treatments are usually non-specific, inefficient and do not prevent the appearance of metastases and relapses. Therefore, there is a need for a better understanding of the disease and the development of new therapies. For this group of malignancies, it has been described that mesenchymal stem cells (MSCs) that have acquired sequential mutations may constitute the cell-of-origin in sarcomas. Moreover, within the initial stages of sarcomagenesis an appearance of cancer stem cell subpopulations (CSCs) has been reported, which arise during tumor development from the cell of origin and are usually linked to drug resistance, being therefore most likely responsible for the recurrence of the disease and therapeutic failure. Thus, it is necessary to have reliable models to study the evolution of CSCs and to test effective therapies. In this work, we used an undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS) model generated from MSCs sequentially mutated to the point of being able to generate tumors in immunodeficient mice, as well as different sarcoma patient-derived models. We found that SOX2 is a pro-tumorigenic factor with prognostic potential in sarcoma. Besides, we observed that SOX2 depletion dramatically reduced the ability to form tumorspheres and to initiate tumor growth. Conversely, SOX2 overexpression resulted in increased tumorigenicity in vivo. Overall, SOX2 is a bona fide marker tracking CSCs during sarcomagenesis and most likely plays a relevant role in the development of sarcoma. According with these results, the mithramycin analogue EC-8042 was the most efficient chemotherapeutic drug in reducing SOX2 positive cells in vitro and in vivo.

For the cancer genomics era, there is a need for clinically annotated close-to-patient cell lines suitable to investigate altered signalling pathways and which may serve as high-throughput drug-screening platforms. Personalized medicine is an interesting option to find genomic alterations in sarcomas. In this work, we have established and characterized new sarcoma patient-derived cell lines (PDCs) on which we studied their invasion ability, CSCs properties and the genomic drift during in vitro and in vivo growth. Additionally, next generation sequencing (NGS) in these close-to-patients models has allowed us to find druggable mutations, such as TP53, SETD2 and, particularly, Isocitrate Dehydrogenase 2 (IDH2) mutation in a dedifferentiated chondrosarcoma model. This precise mutation led us to use Enasidenib, an IDH2 mutated specific inhibitor, that was able to inhibit its enzymatic

Abstract

activity by reducing the oncometabolite D-2-HG accumulation and, more interestingly, was capable to target CSCs-enriched cultures of mutant IDH2 cells. Furthermore, oral administration of enasidenib in xenografted mice resulted in complete abrogation of tumor growth *in vivo*.

Summarizing, we have proposed new proofs of concept that will help to the development of targeted therapies against CSCs subpopulations and patient-specific gene alterations, highlighting the establishment of close-to-patient models to improve precision medicine in sarcomas.

ANTECEDENTES

1. El cáncer y su origen

El cáncer puede definirse como el conjunto de afecciones caracterizadas por una proliferación celular descontrolada, generada por causas tanto genéticas como epigenéticas. Estas alteraciones pueden ser congénitas o adquiridas y afectan, principalmente, a genes implicados en el crecimiento y en la proliferar celular, en el control de la apoptosis, en la reparación del ADN y en la diferenciación celular, otorgando a las células tumorales un fenotipo complejo.

La masa celular que se origina debido a este crecimiento y proliferación descontrolado de células se conoce como tumor y no tiene por qué presentar siempre un pronóstico maligno. Existen los denominados, tumores benignos, que son comunes en la población y que muchas veces persisten en el organismo sin ser detectados. Sin embargo, si el tumor es maligno, puede provocar las denominadas metástasis, es decir, el establecimiento del tumor en tejidos diferentes al de origen y que son producidas por una diseminación e invasión de las células tumorales en los nuevos tejidos [1].

Una de las principales dificultades que existen en los tumores, es la gran heterogeneidad celular que presentan. Esta heterogeneidad es evidente entre tumores de diferentes pacientes (heterogeneidad intertumoral) y dentro de un mismo tumor (heterogeneidad intratumoral) [2]. La primera, se deriva de la existencia de distintos subtipos y variantes morfológicas, genéticas, de comportamiento y de respuesta, dentro de un mismo tipo tumoral. Mientras que la heterogeneidad intratumoral se basa en la existencia, dentro de un mismo tumor, de poblaciones celulares que muestran diferentes variaciones genéticas y epigenéticas, resultando en la formación de zonas, dentro del tumor, con fenotipos, genotipos y funcionalidades distintas [3].

1.1. Desarrollo del fenotipo tumoral: célula de origen

La célula de origen del tumor se define como aquella célula que adquiere las primeras mutaciones durante un proceso de transformación progresivo y que da origen al tumor [4]. Existen distintos factores de riesgo que contribuyen a acumular alteraciones en las células. Estos factores pueden ser de tipo genético, hereditario o ambiental [5]. Otro factor

fundamental en el desarrollo del cáncer es el envejecimiento, de manera que la probabilidad de desarrollar cáncer aumenta en relación directa con la edad [6]. En el año 2011 se publicaron *“The hallmarks of cancer: The next generation”* por Hanahan y Weinberg, donde propusieron los diez rasgos distintivos que una célula adquiere durante el proceso de transformación tumoral, como son: aumento de señales proliferativas, evasión de señales inhibitorias del crecimiento, inestabilidad genómica, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, invasión y metástasis, reprogramación del metabolismo energético celular, aumento de señales proinflamatorias y resistencia al sistema inmune (**Figura 1**) [7]. Mediante la acumulación de estas características, las células normales no sólo adquieren la capacidad de iniciar tumores, sino que son capaces de generar un microambiente favorable para el proceso tumorigénico.



Figura 1. Acontecimientos clave en el proceso oncogénico. En la figura se muestran las diez características primordiales que ocurren durante el proceso oncogénico. Adaptado de Hanahan D. y Weinberg R.A. [7].

Cualquier célula es susceptible de ser iniciadora de un tumor mediante la adquisición, a través de mutaciones, de las capacidades asociadas al proceso neoplásico [4]. La identidad de la célula de origen definirá, en gran medida, la naturaleza del cáncer, así como sus requerimientos para proliferar y diseminarse, siendo, en muchos casos, tan determinante

como las propias alteraciones mutacionales sufridas [8]. Es por ello, que los diferentes subtipos tumorales que se pueden dar en un tejido están, en gran medida, determinados por las características morfológicas, el perfil molecular y la expresión de marcadores específicos en la célula de origen [4]. Esto también se aplica al grado de diferenciación de la célula de origen, que influirá de modo determinante en el grado del tumor. Así, fenotipos menos diferenciados generarán con mayor probabilidad un proceso neoplásico más agresivo [9].

La alta longevidad y capacidad de autorrenovación, que permite una mayor acumulación de alteraciones, convierte a las células madre de los distintos tejidos en candidatas muy adecuadas para convertirse en células de origen del tumor [10].

1.2. Células madre tumorales

Se define como Célula Madre Tumoral (CSC, por sus siglas en inglés, *Cancer Stem Cell*) a aquella célula con propiedades similares a la célula madre normal, que tiene capacidad de auto-perpetuarse y que se ocupa de la propagación y mantenimiento del tumor [4]. La supervivencia de las células madre está garantizada de dos maneras, mediante la división celular asimétrica, en la que una célula madre da lugar a dos células hijas (una célula madre y una célula diferenciada) y mediante la renovación celular simétrica, en la que una única célula madre genera dos células madre o dos células diferenciadas [11]. La gran diferencia con las células madre es que, mientras que éstas normalmente se encuentran de manera quiescente en la edad adulta, en un estado inactivo en fase G1/G0 y protegidas del daño celular y de las mutaciones [12, 13], las células madre tumorales tienen continuamente esta capacidad de regeneración activa.

Si bien es cierto que no se conoce con claridad el mecanismo fundamental por el cual las CSCs intervienen en el origen y la progresión del cáncer, existen varias propuestas sobre ello, como que las CSCs derivadas de células somáticas sanas recuperan su condición de célula madre debido a la adquisición de mutaciones genéticas y cambios epigenéticos [14]. La hipótesis de que sea una CSC la célula de origen del tumor postula que los tumores, al igual que los tejidos normales, se hallan organizados de una forma jerárquica y que en el ápice de esa organización existe una pequeña subpoblación celular con capacidad de auto-

renovarse y de generar heterogeneidad intratumoral a través de procesos de diferenciación. Además, estas CSCs poseen el potencial necesario para dirigir la expansión de las subpoblaciones de células malignas y generar nuevos tumores, metástasis y recaídas que recapitulan las características del tumor original [15].

Para explicar este hecho, se han propuesto dos modelos. En el modelo jerárquico, la iniciación del tumor comienza con células madre que escapan al control y regulación normales del crecimiento, transformándose en CSCs que dan lugar a una población de células que forman la base biológica de los tumores. Este modelo explicaría por qué sólo una eliminación completa de las CSCs puede prevenir la recaída de los cánceres. Lo que no puede explicar es la interacción entre las CSCs y otras células cancerígenas diferenciadas. Por otro lado, en el modelo estocástico se sugiere que, en condiciones adecuadas, todas las células tumorales (diferenciadas o no) pueden dirigir el crecimiento tumoral. Este modelo, al igual que el anterior, tiene limitaciones, ya que no es capaz de explicar la relación entre la heterogeneidad tumoral y la capacidad de iniciación de tumores. De hecho, en base a estas limitaciones, se ha incorporado el concepto de plasticidad celular (**Figura 2**), en el que se fusionan ambos modelos. Se basa en que, en función de las señales genéticas y epigenéticas, así como de las señales del microambiente tumoral, las células tumorales tienen la capacidad de cambiar entre el estado de célula madre y el de célula diferenciada [16].

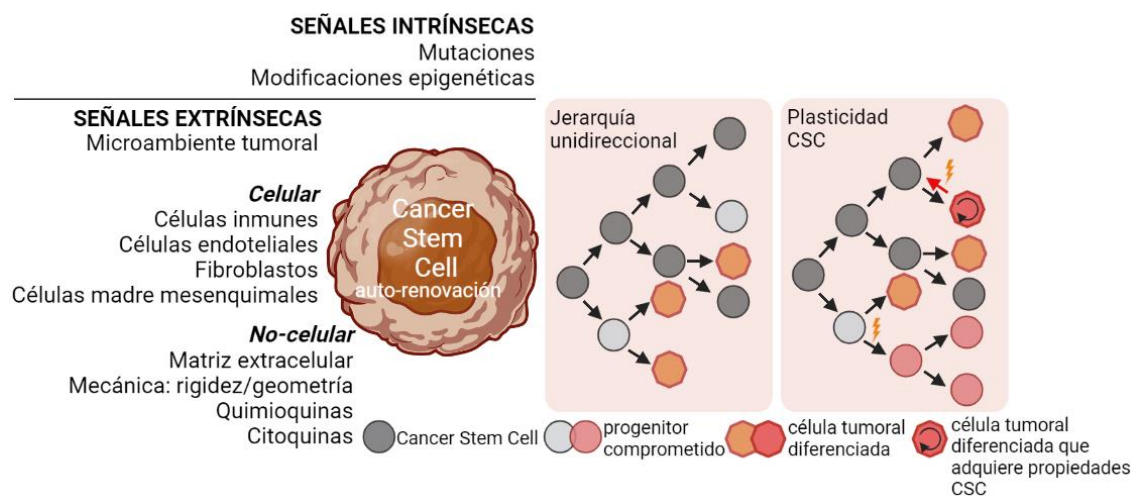


Figura 2. Modelo de plasticidad celular. El modelo original de CSC (jerarquía unidireccional) asume que sólo las CSC son capaces de generar el grueso del tumor mediante la división simétrica (para autorrenovarse) o asimétrica (para generar células diferenciadas). En este caso, la jerarquía es

estrictamente unidireccional y excluye el concepto de reversibilidad del destino celular de las células progenitoras. Por el contrario, la acumulación de pruebas demuestra que la jerarquía es más fluida de lo que se pensaba en un principio. En el modelo de plasticidad de las CSCs, las células cancerosas poseen la capacidad dinámica de conversión bidireccional de un estado no-CSC a un estado CSC y viceversa. En este modelo, la plasticidad de las CSCs y de las células madre está determinada tanto por señales intrínsecas como extrínsecas que actúan de manera simultánea o independiente. En consecuencia, las no-CSCs pueden servir de reservorio para crear poblaciones de CSCs a lo largo de la tumorigénesis (esto se indica en la figura con un rayo y puede ser el resultado de una señal microambiental o de un cambio epigenético). Creada con Bio-render.

Como decíamos, además de la capacidad de auto-renovación y de diferenciación capaz de generar una progenie celular heterogénea de células especializadas, las CSCs comparten con las células madre normales una serie de propiedades: elevado potencial replicativo, capacidad de migración hacia nuevas regiones tisulares donde continuar con la proliferación celular (invasión y metástasis), así como encargarse del mantenimiento de la homeostasis tisular (supervivencia tumoral y resistencia) [17, 18]. Todas estas características, podrían ser las responsables de la resistencia de estas subpoblaciones a la acción de los fármacos quimioterapéuticos y a la radioterapia [19].

1.2.1. Fenotipo pluripotente: factores de transcripción, vías de señalización y microambiente tumoral

Las CSCs pueden originarse a partir de varios tipos celulares, como son células madre normales, células progenitoras, células maduras y la fusión entre células madre y células mutadas [20]. Este hecho, hace que las CSCs transformadas a partir de células sanas necesiten de una serie de mutaciones, de cambios epigenéticos, de alteraciones en la señalización celular y de una continua regulación del microambiente para mantenerse.

Factores de transcripción: dos de las características comunes de las CSCs con las células madre son su capacidad de autorrenovación y su potencial de diferenciarse en uno o más tipos de células especializadas [4]. Las células somáticas pueden reprogramarse hacia células madre pluripotentes mediante la sobreexpresión ectópica de factores de transcripción tales como OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 y MYC [21]. Por lo tanto, estos factores de transcripción desempeñan un papel muy importante en la regulación del crecimiento de las CSCs:

- **OCT4:** reconocido como uno de los factores de transcripción más importantes [22], encargado de controlar la pluripotencia, la autorrenovación y el mantenimiento de las células madre [23]. Muchos estudios asocian altos niveles de OCT4 con una mayor malignidad tumoral y resistencia a fármacos en muchos tipos de tumores como gliomas [24], cáncer de mama [25] o cáncer de pulmón [26].
- **SOX2:** desempeña un importante papel en el desarrollo temprano y en el mantenimiento del fenotipo indiferenciado de las células madre embrionarias. También es uno de los factores de transcripción clave de las CSCs. Se ha demostrado que una elevada expresión de SOX2 en cáncer de mama puede ayudar a caracterizar los fenotipos poco diferenciados [27] y que una disminución de su expresión inhibe la proliferación celular y la tumorigenicidad en glioblastoma [28].
- **NANOG:** descubierto por primera vez en células madre embrionarias. Tiene funciones de autorrenovación y regulación de la transcripción multipotente [29]. Aunque de manera normal se encuentra silenciado en las células somáticas, se ha observado una expresión anormal en distintos tipos de tumores, como cáncer de mama [30], de cabeza y cuello [31], de pulmón [32] y gástrico [33]. Además, en un estudio de pacientes con cáncer de páncreas, la alta expresión de NANOG (y OCT-4) se correlacionó negativamente con la supervivencia de estos [34]. Por lo tanto, desempeña un papel importante en la regulación de la autorrenovación y la proliferación de las CSCs.
- **MYC:** comprende a varios miembros que son factores de transcripción esenciales en las proteínas de unión al ADN. Coordina varios procesos biológicos en las células madre, como son el metabolismo celular, la autorrenovación, la diferenciación y el crecimiento [35, 36]. Aunque se trata de uno de los oncogenes más comúnmente activados en la patogénesis del cáncer, la sobreexpresión de MYC por sí sola es incapaz de inducir la transformación de células normales a tumorales, por lo que necesita de la acción de otros factores para el desarrollo de su potencial oncogénico [37].
- **KLF4:** puede desempeñar un papel pro o anti oncogénico, dependiendo del tipo de tumor. En varios tipos de leucemia, se ha visto que tiene un papel antitumoral [38,

39], sin embargo, una elevada expresión se relaciona con fenotipos más agresivos en cáncer de mama [38].

Vías de señalización: es importante que las vías de señalización molecular que se encargan de mantener la homeostasis de las células madre se encuentren constantemente reguladas. El problema ocurre cuando muchas de estas vías se activan o inhiben de manera anómala, hecho que contribuye al mantenimiento de las propiedades de autorrenovación, proliferación, supervivencia y diferenciación de las CSCs. En general, estas vías de señalización no son unidireccionales, sino que están formadas por entrelazados en los que participan una serie de mediadores que se alimentan unos a otros. Entre ellas, cabe destacar las siguientes:

- **JAK/STAT:** en su activación intervienen varios ligandos, tales como las interleucinas, los interferones, las hormonas y los factores de crecimiento, que se unen a los correspondientes receptores [40]. La unión del ligando al receptor provoca la fosforilación y activación de las proteínas JAK [40, 41]. Una vez éstas se han activado, promueven la fosforilación del dominio citoplasmático del receptor y el reclutamiento de proteínas de la familia STAT. Una vez formado el complejo, las STAT se fosforilan y dimerizan, translocándose al núcleo para iniciar la transcripción de genes diana. Existen una serie de proteínas citoplasmáticas que actúan como reguladores negativos de la vía, como las proteínas SOCS, que inhiben la unión de las STAT a las JAK en la membrana, o las fosfatasas, que promueven la defosforilación de las STAT [41]. Se ha demostrado que esta vía de señalización en las células madre está implicada en el mantenimiento de la autorrenovación de las células madre embrionarias, hematopoyéticas y neurales [41, 42]. Esta vía puede activarse de manera aberrante en las CSCs, hecho que ha sido descrito en tumores de mama [43], próstata [44], sangre [45] y glioblastoma [46]. También se ha descrito el papel de esta ruta en la metástasis mediada por las CSCs [47].
- **Hedgehog (HH):** los principales efectores de la vía incluyen tres ligandos, un receptor, una proteína transmembrana y tres factores de transcripción, que modulan la activación o represión de la ruta [48]. Esta vía es clave para el desarrollo de órganos durante la embriogénesis. Se encuentra inactiva en la mayoría de los

tejidos excepto en el sistema nervioso central adulto, la piel, el pelo y los dientes. La actividad de Hedgehog regula las poblaciones de células madre y/o progenitores [48, 49]. La implicación de la ruta en la función de las CSCs se ha reportado en varios tipos de cáncer, como el mieloma [50], glioma [51] y leucemia mieloide crónica [52].

- **WNT:** se trata de una vía de señalización muy compleja y evolutivamente conservada. Se considera que abarca dos vías de señalización, la canónica (regulada por β -catenina) y la no canónica (independiente de la β -catenina) [53]. La señalización a través de ambas vías es esencial para el desarrollo embrionario y la homeostasis. En general, la canónica regula la proliferación, supervivencia y destino final de las células. Mientras que la no canónica regula la división celular asimétrica, la polaridad celular y la migración. Ambas no son excluyentes, sino que interactúan entre sí [53]. Se ha descrito que ocurren mutaciones en genes que codifican para los mediadores de esta ruta en distintos tipos de tumores, como cáncer de mama, gástrico, colorrectal o leucemia [54]. Además, esta ruta está implicada en la metástasis mediada por CSCs y en el mantenimiento del fenotipo de CSC [55].
- **NOTCH:** tanto los ligandos como los receptores implicados en esta ruta son proteínas transmembrana. La interacción ligando-receptor activa la vía, produciendo un corte proteolítico del dominio citoplasmático del receptor que hace que se libere el dominio intracelular de NOTCH (NICD) en el citoplasma, trasladándose al núcleo, donde activa la transcripción de genes diana de la vía [56, 57]. Al igual que en las anteriores vías de señalización, está muy conservada y es fundamental en la regulación de la diferenciación de las células madre y células progenitoras durante el desarrollo del sistema nervioso y hematopoyético embrionario, la vasculatura, el corazón, los ojos, el páncreas, el intestino y otros órganos [56, 58]. En las células tumorales, esta vía regula muchas de las propiedades celulares en varios tipos de tumores, tales como la leucemia, el glioblastoma, el de mama, colon, páncreas y pulmón [59]. En cuanto al papel de la señalización de NOTCH en las CSCs, puede actuar como un promotor o un supresor tumoral en diferentes tejidos, dependiendo del contexto [59].

- **PI3K/AKT/mTOR:** en respuesta a la interacción ligando-receptor tirosin-quinasa (AKT), la PI3K intracelular fosforila el fosfatidilinositol de la membrana, momento en el que éste se convierte en un sitio de unión para la proteína quinasa B [60]. Tras la unión, la quinasa es fosforilada y activada por mediación de otras quinasas, incluyendo la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) y la protein-quinasa ADN-dependiente, produciendo la activación o represión de mediadores de la ruta. Un regulador negativo del proceso es la fosfatasa PTEN. Esta vía de señalización está muy conservada y participa en la regulación de varios procesos celulares, como la progresión en el ciclo celular, regulando la proliferación y supervivencia [60]. Su papel en CSCs aún está poco estudiado [37], se ha observado que induce proliferación celular y metástasis en cáncer de ovario [61], próstata [62] y páncreas [63] y que resulta clave en el metabolismo asociado a CSCs en pulmón [64].
- **TGF/SMAD:** esta ruta está relacionada con varios procesos celulares, principalmente en aquellos implicados en el desarrollo, como son la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y el mantenimiento de la homeostasis [37]. En ella está implicado el complejo de transcripción formado por proteínas SMAD y sus principales ligandos (TGF- β , activina, Nodal, BMP, GDF y AMH) [65]. Se encuentra sobreactivada en varias neoplasias, como el cáncer de pulmón, donde la señalización de TGF- β se relaciona con el mantenimiento del fenotipo CSC [66], o en cáncer hepático, donde regula su capacidad de autorrenovación fomentada por ciclinas [67].
- **Mecanismos epigenéticos:** las modificaciones epigenéticas cumplen un papel clave en el mantenimiento del fenotipo de células madre y su alteración puede influir significativamente en la transformación a CSCs. Algunos ejemplos de reguladores importantes son las histonas deacetilasas (HDACs, por sus siglas en inglés, *Histone Deacetylases*) que incluyen a las proteínas de respuesta a estrés (SIRT) y que están involucradas en múltiples procesos y rutas de señalización. Esta familia de enzimas interviene en múltiples procesos celulares, estando estrechamente ligadas al mantenimiento de la pluripotencia en CSCs y la supervivencia celular [68]. Otro ejemplo de modulador epigenético que regula de forma positiva el fenotipo CSC es

la ADN metiltransferasa DNMT3A. Este factor promueve la metilación *de novo* y su actividad está relacionada con la inactivación de genes implicados en la diferenciación celular y la activación de otros genes relacionados con pluripotencia como HOXB [69].

Microambiente tumoral: el microambiente o nicho tumoral desempeña un papel importante en el mantenimiento del estado de las células madre, ya sea en circunstancias normales o tumorales, puesto que las vías de señalización clave implicadas en el proceso se activan mediante interacciones intercelulares, es decir, los distintos ligandos secretados por una célula activan a los receptores correspondientes en otra célula vecina [41, 48, 56, 70]. Estas interacciones no sólo se producen entre células, sino también con la matriz extracelular y la vasculatura que contribuyen a la dinámica del microambiente [71, 72]. Se han reportado varios estudios en los que estas interacciones célula-célula [73] o célula-matriz extracelular [74] están implicadas en la modulación de las funciones de las CSCs.

1.2.2. Invasión celular y metástasis

El proceso de metástasis se inicia cuando las células tumorales comienzan la invasión hacia el tejido que rodea el lugar del tumor primario, entrando en el torrente sanguíneo directamente o al sistema linfático. No todas las células de un tumor son capaces de escapar del lugar primario y metastatizar, sino que sólo una pequeña subpoblación con fenotipo CSC es capaz de hacerlo, las conocidas como células iniciadoras de metástasis (MICs, por sus siglas en inglés, *Metastasis-Initiating Cells*) [75, 76]. Es importante recalcar, que a pesar de que esta capacidad está estrechamente vinculada con el fenotipo CSC, no todas las CSCs dentro de un tumor presentan la capacidad de producir una metástasis. Y que, además, puede darse la opción de que células tumorales circulantes en el organismo que han sido liberadas por el tumor, adquieran este fenotipo durante la migración [77].

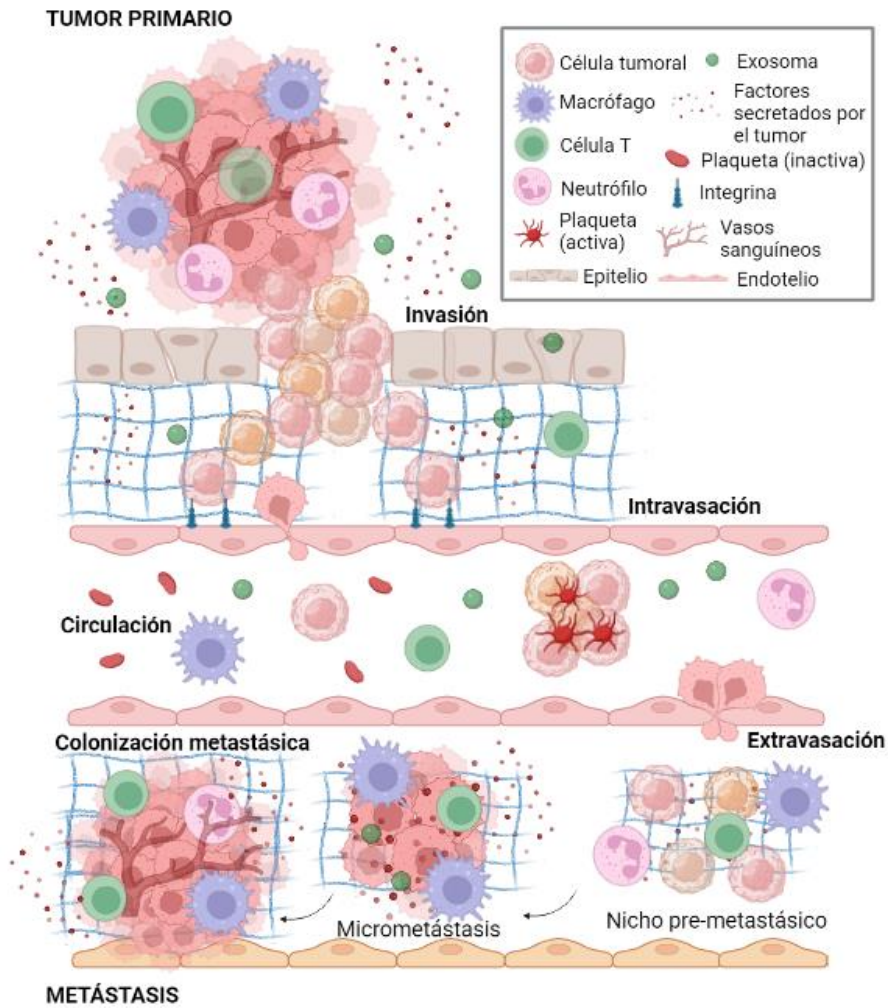


Figura 3. Cascada metastásica. Se muestran, de manera esquemática, las cinco etapas implicadas en la cascada metastásica: inicio de la invasión, intravasación, migración circulatoria, extravasación y colonización. Creada con Bio-render.

El desarrollo de la metástasis se produce por diferentes alteraciones ocurridas en las células, como son inestabilidad genómica asociada al fenotipo tumoral, así como la influencia del microambiente tumoral [78, 79]. Muchos son los genes relacionados con la capacidad invasiva de las células metastásicas, entre los que cabe destacar p53, CDKN2A, PTEN, PI3K y RB1, puesto que son los más recurrentemente mutados en patologías metastásicas [80]. Al igual que ocurre en las células del tumor primario, donde las alteraciones mutacionales sufridas van a conducir a una selección evolutiva en la que sobrevivirán las mejor adaptadas, la supervivencia celular en los nódulos secundarios dependerá de la adaptación de las células tumorales al entorno [78]. Esto explicaría el hecho de las diferencias encontradas entre el tumor primario y los secundarios.

En la **Figura 3** se esquematizan las cinco etapas claves implicadas en la cascada metastásica.

1.2.3. Aislamiento de subpoblaciones de células madre tumorales

Pese a que las subpoblaciones de CSCs representan un porcentaje muy bajo del volumen tumoral, reúnen las características necesarias para mantener el crecimiento del tumor e, incluso, generar nuevos tumores. Por ello, el estudio y caracterización de las CSCs es muy importante, ya que nos va a permitir conocer la evolución del tumor y poder desarrollar terapias específicas frente a ellas. Existen una serie de biomarcadores y/o la adquisición de características fenotípicas relacionadas con fenotipos pluripotenciales, que sirven para desarrollar diferentes técnicas de identificación y aislamiento de CSCs en muestras tumorales:

Biomarcadores: en los últimos años se han identificado varios marcadores relacionados con pluripotencia y proliferación celular, capaces de distinguir subpoblaciones tumorales enriquecidas en CSCs en distintos tipos de tumores. La principal limitación en el uso de biomarcadores para detectar estas subpoblaciones es que sus patrones de expresión varían entre subtipos tumorales histológicamente similares, por lo que no es posible estandarizar el porcentaje de expresión de un marcador molecular entre tumores. La identificación y caracterización de la combinación de marcadores que identifiquen de forma más precisa las subpoblaciones de CSCs en cada tipo de tumor, supondría un gran avance para el estudio de dichas subpoblaciones [81] .

Los marcadores tumorales más comúnmente empleados se localizan en la membrana celular, puesto que su marcaje resulta más sencillo (**Tabla 1**). Pero también existen biomarcadores localizados intracelularmente y que son empleados para la separación de subpoblaciones de CSCs. En este caso, las células han de ser modificadas mediante la introducción de construcciones que posean un elemento de respuesta vinculado a la expresión o a la actividad de dichos marcadores y así sea posible señalarlos.

Ensayos funcionales: existen varias técnicas que nos permiten detectar y aislar subpoblaciones de CSCs en base a su comportamiento.

Antecedentes

Tabla 1. Marcadores de superficie asociados al fenotipo de CSCs. Recopilación de las referencias [18, 37, 82-85].

TIPO DE CÁNCER	MARCADOR DE SUPERFICIE
MAMA	CD29, CD49f, CD44, CD24, CD133, CD90
OVARIO	CD44, CD177, CD24, CD133, EpCAM
COLON	CD44, CD24, CD26, CD29, CD133, CD166, EpCAM, ABCB5, Lgr5
CEREBRO	CD90, CD133, CD15, CD49f, CD44, CD36, EGFR, A2B5, L1CAM
ESTÓMAGO	CD44, CD44V8-10, CD133, CD24, CD54, CD90, CD49f, CD71, EpCAM
COLORRECTAL	CD200, EpCAM, CD133, CD166, CD206, CD44, CD49f
CABEZA Y CUELLO	CD44, CD271, CD166, CD133, CD24
CÉRVIX	ABCG2, CD133, CD49f
ESÓFAGO	CD44, CD133, CD90
MELANOMA	CD20, CD271, ABCB5, CD133
SARCOMA DE TEJIDO BLANDO	CD44, CD133, FGFR3, CXCR4, ABCG2, CD271, CD344
SARCOMA PRIMARIO DE HUESO	CD133, CD24, CD271, ABCG2, C-kit, CXCR4, Stro-1, SSEA-4, CD49f, CD57, Lgr5
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	CD34, CD90, CD71, CD19, CD20, CD44, CD10, CD45RA, CD123
HÍGADO	CD44, CD90, CD133, CD13, EpCAM, CD24, CD206
PULMÓN	CD44, CD133, CD166, CD133, ABCG2, CD90, CD117, CD87
CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES	CD133, CXCR4, CD44, CD105
PÁNCREAS	ABCG2, CD24, CD44, CD133, CXCR4, EpCAM
PRÓSTATA	EpCAM, CD117, $\alpha 2\beta 1$, CD133, CD44, CXCR4

La enzima aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) actúa como modulador de la proliferación y diferenciación de las células madre [86]. Estas enzimas oxidan los aldehídos que resultan tóxicos para las células y los convierten en ácidos carboxílicos, por lo que resultan esenciales para el mantenimiento de la capacidad de auto-renovación en células madre normales y tumorales [87]. Entre los métodos más extendidos para detectar la actividad de esta enzima, se encuentra el ensayo ALDEFLUOR [88, 89]. El ensayo se basa en el uso de un sustrato permeable a la membrana celular que, al ser metabolizado por las enzimas ALDH, emite fluorescencia a 488 nm, lo que hace posible que sea detectado y aislado mediante citometría de flujo acoplada a un separador celular.

Otro método utilizado comúnmente es el llamado "Side Population" (SP, por sus siglas en inglés), basado en la expulsión de compuestos fluorescentes como Hoechst 33342 o la Rodamina 123 por parte de las subpoblaciones con alto contenido en transportadores ABC [90]. Estos transportadores, altamente expresados en células madre, son los encargados de expulsar una amplia gama de agentes exógenos tóxicos de la célula, por lo que están estrechamente relacionados con la resistencia a fármacos [91]. El ensayo consiste en detectar y seleccionar por citometría de flujo acoplada a un separador celular, aquellas

subpoblaciones que, tras ser expuestas a los compuestos fluorescentes, han logrado expulsarlos y, por lo tanto, no muestran fluorescencia.

Un método que permite cuantificar, aislar y/o enriquecer en CSCs los cultivos celulares, es el cultivo *in vitro* de tumorosferas. De acuerdo con su capacidad de auto-renovación, las CSCs son capaces de formar esferas clonales a partir de una única célula cuando se cultivan en suspensión, en ausencia de suero y en presencia de una serie de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés, *Epithelial Growth Factor*) y el factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF, por sus siglas en inglés, *basic Fibroblast Growth Factor*). En varios estudios, en los cuales se han llevado a cabo ensayos de formación de tumorosferas, se ha observado que estas subpoblaciones tienen una mayor expresión de genes asociados con pluripotencia, mayor resistencia a fármacos y mayor potencial tumorigénico [92-94].

Capacidad tumorigénica *in vivo*: existe la llamada “regla de oro” de las CSCs, que permite determinar si un grupo de células puede considerarse o no como células madre tumorales. Según esta regla, una población de CSCs ha de ser capaz de formar tumores que reproduzcan las características del tumor de origen cuando son inoculadas en ratones inmunodeficientes de forma más eficaz que el resto de subpoblaciones [83]. Teniendo en cuenta esta característica, las técnicas empleadas se basan en la realización de varias rondas de trasplantes seriados en ratones inmunodeprimidos a partir de los cuales se establecen líneas celulares para inocular en un nuevo ratón. Cabe destacar que mediante este método no se obtienen CSCs completamente aisladas debido a la existencia de una división asimétrica de estas, pero sí que se obtienen cultivos celulares cada vez más enriquecidos. Además, mediante la inoculación de varias diluciones celulares (ensayo de dilución límite, LDA, por sus siglas en inglés, *Limiting Dilution Assay*) es posible cuantificar y caracterizar el aumento de las subpoblaciones CSCs y, por consiguiente, su capacidad de desarrollar un tumor a menores concentraciones celulares [95]. Existe, además, la posibilidad de realizar un seguimiento *in vivo* de las subpoblaciones de CSCs mediante el marcaje con fluorescencia o bioluminiscencia (Luciferasa) [96].

1.3. Tratamiento del cáncer

A la hora de establecer un tratamiento en un paciente que presenta una neoplasia es importante tener en cuenta que cada procedimiento tiene sus particularidades, siendo necesario el estudio de las características específicas del tumor y el estado fisiológico en el que se encuentra el paciente. De esta manera, se podrá aplicar la terapia de la manera más personalizada posible.

1.3.1. Terapias estandarizadas en clínica

Cirugía: se trata de la eliminación quirúrgica, ya sea de manera parcial o total, de los tumores sólidos. En algunos casos, si el tumor se ha expandido de manera considerable, puede requerir de la eliminación completa del órgano afectado. En aquellos casos en los que la cirugía no permita eliminar completamente la masa tumoral, pueden quedar restos del mismo que den lugar a recidivas o metástasis. En estos casos de metástasis, la eliminación del tumor mediante cirugía no suele ser posible [97].

Una vez extraído el tejido tumoral, se procede con su estudio anatomopatológico, para conocer sus características histológicas y el grado de diferenciación en el que se encuentra, así se podrá proceder con el tratamiento adyuvante a la cirugía, principalmente radioterapia o quimioterapia.

Quimioterapia (QT): emplea uno o más agentes químicos contra las poblaciones de células tumorales. El principal inconveniente es que no es eficiente contra las subpoblaciones del tumor que permanecen quiescentes en el mismo, estado que adoptan las CSCs como mecanismo de supervivencia a este tratamiento [98]. Además, la quimioterapia puede dañar también las células sanas, en especial, aquellas con alto nivel de proliferación.

Radioterapia (RT): emplea altas dosis de radiación, normalmente ionizante, ya sea de manera interna o externa, con el fin de destruir el tejido tumoral. Así, se consigue generar daño en el ADN celular. Al igual que ocurre con la quimioterapia, el empleo de radiación también puede dañar las células del tejido sano. Pero el principal inconveniente, es que en muchas ocasiones produce la activación de la transición epitelio-mesénquima (MET, por

sus siglas en inglés, *Mesenchymal-Epithelial Transition*) [99, 100] y el favorecimiento de la metástasis mediante la alteración de rutas de señalización y la inhibición de p53 [100, 101].

Inmunoterapia: eliminación del tumor a través de la promoción de la respuesta inmune del propio paciente contra la población tumoral. En los últimos años, se han desarrollado diferentes vacunas dirigidas a generar una memoria inmunológica frente a dianas tumorales específicas o inhibidores de los puntos de control inmunológicos y/o agonistas para la activación de rutas estimuladoras [102]. Otras terapias se basan en el empleo de anticuerpos monoclonales que bloqueen dianas oncogénicas o en el marcaje inmunológico de células tumorales, de modo que sean fácilmente reconocibles por parte del sistema inmune [103]. El principal inconveniente se encuentra en que la capacidad inmunosupresora de las CSCs hace que parte de los pacientes no responda o que generen resistencia a estas terapias [104].

Terapia hormonal: basada en el empleo de hormonas en aquellos casos en los que la proliferación del tumor dependa directamente de la señalización hormonal. Tiene diversos efectos secundarios directamente relacionados con la edad y sexo del paciente [103].

Terapias frente al microambiente tumoral: este tipo de terapias se dirigen frente a poblaciones celulares no tumorales, rutas de señalización o promotores de la angiogénesis que pueden favorecer a la evolución de la neoplasia [105]. Se emplean en combinación con otras terapias establecidas frente al tumor [103].

1.3.2. Terapias dirigidas: hacia la medicina personalizada

Se trata de una de las estrategias de tratamiento más estudiada en los últimos años, basada en el empleo de fármacos frente a rutas específicas relevantes para el desarrollo y mantenimiento de la neoplasia. Para poder desarrollar terapias dirigidas, es necesaria una rápida detección de las rutas alteradas en el tumor del paciente.

En los últimos años la medicina ha avanzado hacia una mayor personalización en el tratamiento. Esta estrategia de personalización se hace especialmente relevante en el caso de la oncología, donde el avance en el conocimiento de los tumores ha puesto de manifiesto un alto grado de heterogeneidad tanto inter como intratumoral. La necesidad

de avanzar hacia un trato más personalizado de cada paciente se refleja, por ejemplo, en el manejo clínico de uno de los grandes problemas de los tratamientos oncológicos, la resistencia a fármacos. De forma habitual, esta resistencia va apareciendo y aumentando a medida que se administran fármacos en las distintas líneas de tratamiento. Hoy en día se desarrollan programas de medicina personalizada que tratan de aumentar la efectividad de los tratamientos y evitar la aparición de resistencias mediante la administración de fármacos dirigidos frente a las alteraciones genómicas específicas de cada tumor. En este sentido, la posibilidad de disponer de modelos derivados del paciente (avatares) para el testaje *ex vivo* de las posibles opciones terapéuticas, abre la posibilidad de administrar los tratamientos más eficazmente, prediciendo la posible aparición de resistencias y evitando toxicidades innecesarias (**Figura 4**) [106]. Los avatares que se utilizan hoy en día son:

Líneas celulares derivadas del paciente: consiste en cultivos primarios en monocapa (2D) generados a partir de explantes tumorales frescos o tejido tumoral disgregado. Estos cultivos primarios, con un bajo número de pases en cultivo, reproducen las características genéticas del tumor original de forma más fiable que las líneas tumorales comerciales, las cuales ya han sufrido multitud de alteraciones genómicas después del elevado número de pases en cultivo.

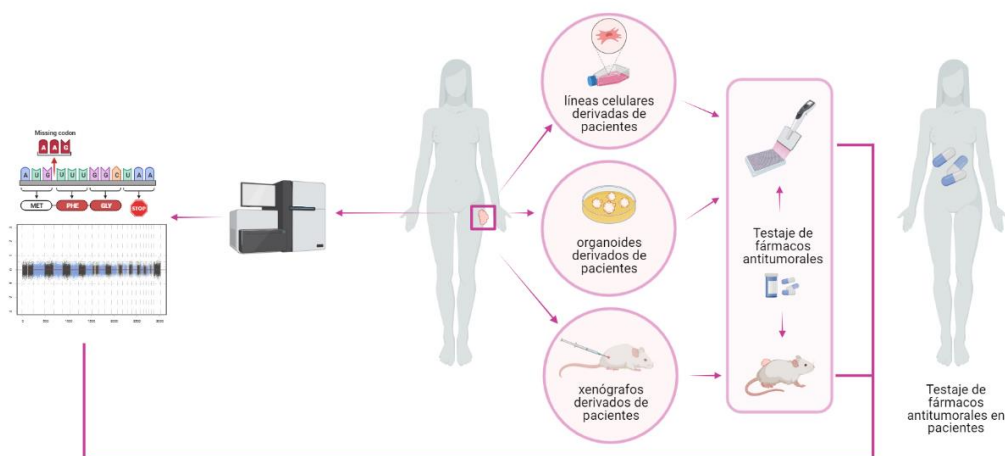


Figura 4. Estrategia de medicina personalizada empleando avatares tumorales derivados de muestras tumorales de pacientes. Creada con Bio-render.

Organoides derivados de pacientes: son cultivos en 3D en los cuales el tejido fresco sano o tumoral se digiere en pequeños fragmentos o se disgrega en células individuales y se embebe en un material similar al de la matriz extracelular, cultivándose en condiciones que

asemejan a las empleadas para el crecimiento de las células madre. Este sistema favorece el crecimiento y mantenimiento a largo plazo de todas las estructuras tumorales reproduciendo su heterogeneidad, su complejidad genómica e, incluso, en cierta medida, el microambiente en el que se encuentran los tumores originales [107].

Xenoinjertos derivados de paciente (PDX): consiste en implantar directamente las muestras tumorales frescas en ratones inmunodeficientes o humanizados (aquellos que incluyen ciertos aspectos del sistema inmunológico humano) [108]. Este método consigue la preservación tanto de la arquitectura tumoral como su heterogeneidad interna. Se pueden implantar en sitios genéricos (por ejemplo, inoculación subcutánea) o en localizaciones específicas para un determinado tipo de tumor (inoculaciones ortotópicas) que permiten analizar la capacidad metastásica, la interacción de las células tumorales con el microambiente y la influencia de éste en los tratamientos.

Las líneas celulares primarias son los modelos más limitados a la hora de reproducir ciertas características del tumor original, como es su estructura 3D y la interacción entre las propias células tumorales y otras células del entorno. Sin embargo, también son los modelos logísticamente menos complicados de manejar. En ellas, se pueden realizar escrutinios farmacogenéticos a gran escala y se puede estudiar el efecto de estos compuestos en subpoblaciones concretas de una forma sencilla. Además, son modelos mucho más económicos y de rápido uso con respecto a los organoides y los PDXs. Los estudios encaminados a establecer las condiciones bajo las que el uso de líneas primarias como avatares en programas de medicina personalizada pueden aportar resultados tan fiables como el uso de organoides y/o PDXs, supondrá un avance hacia la implantación más generalizada de estos programas en el ámbito clínico, al ser estos modelos más baratos y fáciles de usar.

El cultivo de un tumor, tanto *in vitro* como *in vivo*, lleva implícita la aparición de alteraciones genómicas asociadas a la adaptación de las células tumorales al crecimiento en un ambiente distinto, que no estaban presentes en el tumor original. Sin embargo, y como veremos a lo largo de esta Tesis Doctoral, modelos derivados de condrosarcoma de pacientes han demostrado su capacidad para reproducir las mutaciones más relevantes del

tumor original que dirigen el crecimiento tumoral y que pueden tener implicaciones terapéuticas [109].

Teniendo en cuenta las limitaciones de los distintos modelos para reproducir el tumor original y su complejidad logística, estos modelos podrían usarse de manera complementaria, realizando los estudios farmacogenómicos a gran escala en los métodos menos laboriosos (líneas primarias) y las validaciones posteriores en modelos más complejos (organoides y PDXs). Con todo ello, el desarrollo adecuado de programas de medicina personalizada que incluyan el testaje de opciones terapéuticas en avatares derivados de los propios pacientes, facilitará la información necesaria para la toma de decisiones clínicas adecuadas y resultará en el desarrollo de biomarcadores pronósticos y predictivos más fiables.

1.3.3. Resistencia a las terapias antitumorales: resistencia global y resistencia asociada a las CSCs

Para poder estudiar y conocer los mecanismos implicados en la respuesta del tumor a la terapia, no ha de considerarse al tumor como una masa homogénea de células, sino como un conjunto heterogéneo de subpoblaciones celulares malignas que tienen efecto sobre el entorno extra e intracelular y que, además, este entorno influye en ellas.

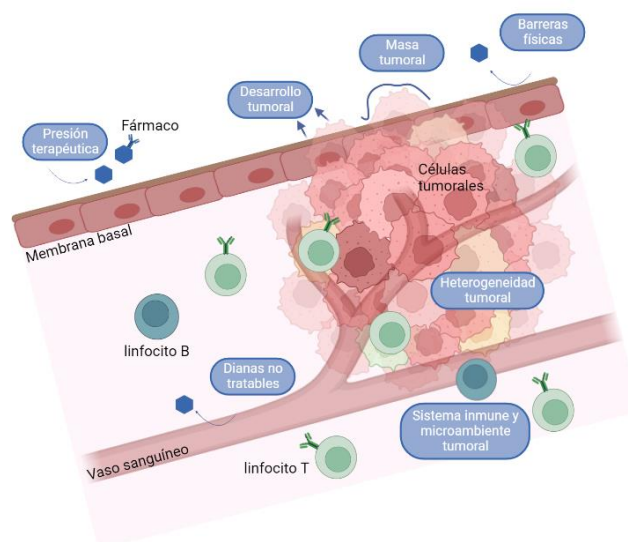


Figura 4. Principales factores implicados en la resistencia a los tratamientos. La heterogeneidad del tumor y el entorno en el que se encuentra, como son la membrana basal, la vasculatura, las células del sistema inmune y el microambiente tumoral, además de distintos parámetros físicos, impulsan la resistencia a los tratamientos. Creada por Bio-render.

Existen una serie de mecanismos de resistencia globales que permiten a las células defenderse y adaptarse a las situaciones de estrés producidas por las terapias antitumorales. En la **Figura 4** se resumen los mecanismos más relevantes, entre los que podemos destacar la inestabilidad genómica y cromosómica [110], la propia estructura de la masa tumoral [111] y las células reclutadas por las propias células tumorales como acción protectora [111, 112].

Por otro lado, es importante destacar los mecanismos de resistencia propios que presentan las CSCs frente a la acción de los tratamientos antitumorales. Estos mecanismos, van a permitir que estas subpoblaciones sobrevivan aun cuando la mayoría de la masa tumoral se ha eliminado. A continuación, detallaremos algunas de las características que presentan estas subpoblaciones y que son responsables de la resistencia a las terapias:

Quiescencia: el hecho de que, una vez formado el tumor, las CSCs se mantengan en un estado latente o fase G₀, hace que el tratamiento con agentes quimioterapéuticos comunes dirigidos frente a células que se dividen rápidamente sea un problema. Son muchos los estudios que demuestran que el tratamiento con quimioterapia convencional es capaz de erradicar aquellas células tumorales activas, pero incrementa la expansión de células quiescentes [113, 114]. Por este motivo, es importante el desarrollo de terapias dirigidas frente a aquellas CSCs que se mantienen de manera quiescente [115] o, en contraposición, emplear terapias capaces de mantener de manera prolongada ese estado celular quiescente [116] que eviten una posible recaída o metástasis.

Transición epitelio-mesénquima: como hemos visto, se han reportado evidencias donde la inducción MET o dediferenciación celular produce un aumento en la capacidad de invasión local y metastásica de las células tumorales [117, 118]. Dado que las CSCs expresan muchos de los marcadores de las células madre sanas, incluyendo su habilidad para sobrevivir en un estado dediferenciado [119], pueden ser las células donde se origine esta transición. Existen estudios que demuestran que la relación entre el fenotipo EMT y la resistencia a fármacos se debe a la expresión de marcadores tales como SOX2 [120], OCT4 [121] y NANOG [122], entre otros.

Resistencia a la muerte inducida por daños en el ADN: al igual que las células madre normales, las CSCs poseen una respuesta al daño en el ADN (DDR, por sus siglas en inglés, *DNA-Damage Repair*), así como vías de reparación que se asemejan mucho a las de las células madre normales [123]. Es, precisamente, este DDR lo que provoca una radio y quimiorresistencia en las CSCs [117]. Como ejemplo, genes que inducen la muerte celular mediada por la vía DDR, tales como p53 [124], se encuentran mutados en las CSCs, lo que hace que no sea capaz de actuar como sensor cuando se produce un daño perjudicial en el ADN, o enzimas relacionados con la reparación del ADN como las N-metiltransferasas (NMT) [124] se encuentran sobreexpresadas en las CSCs. Además, las CSCs son capaces de disminuir significativamente compuestos que activan la vía apoptótica, tales como aldehídos y especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, *Reactive Oxygen Species*) mediante la sobreexpresión de elementos oxidantes tales como la aldehído deshidrogenasa [125] o enzimas relacionadas con la oxidación de ROS como la superóxido dismutasa, superóxido reductasa, catalasa, glutatión peroxidasa o glutatión reductasa [126].

Transportadores: al igual que ocurre con las células madre sanas, las CSCs sobreexpresan transportadores en la membrana celular que son capaces de expulsar activamente un amplio rango de compuestos fuera de la célula [127]. En condiciones normales, estos transportadores se encargan del paso de sustancias a través de la placenta, del intestino y de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, en las neoplasias, desempeñan un papel clave en la expulsión de agentes citotóxicos al exterior de la célula y, de hecho, la expresión de estos transportadores aumenta conforme la célula madre es más indiferenciada [128]. Los principales transportadores asociados a la resistencia a fármacos en las CSCs son ABCB1 y ABCG2 [128].

2. Sarcomas

Los sarcomas comprenden un grupo heterogéneo de patologías neoplásicas que derivan de las células madre mesenquimales procedentes del mesodermo o del ectodermo embrionario. Se consideran tumores raros y representan menos del 1% de los cánceres a nivel global [129]. Sin embargo, en edad pediátrica, se encuentran en el tercer lugar entre las neoplasias con mayor incidencia, siendo ésta de entre un 12 y un 15% [130]. Debido a su alta capacidad metastásica, son considerados tumores muy agresivos, lo que hace que, en aquellos tumores localizados, la tasa de supervivencia a 5 años sea del 70%, mientras que la tasa de supervivencia a 3 años disminuye a un 20% en pacientes con patologías avanzadas y metastásicas [131, 132].

2.1. Células madre mesenquimales en sarcomas

Las células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés, *Mesenchymal Stem Cell*) son una población poco frecuente de células estromales no hematopoyéticas presentes en la médula ósea y otros tejidos conectivos del organismo. Son un grupo de células madre capaces de diferenciarse a tejidos mesenquimales tales como hueso, cartílago, grasa y músculo. En el campo de la investigación, han sido una de las células madre más estudiadas ya que pueden aislarse y expandirse de forma fiable a partir de diferentes fuentes de tejidos, tienen la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares, tienen propiedades inmunomoduladoras únicas y son capaces de localizarse en zonas de daño tisular y tumores [133].

Las MSC pueden aislarse y propagarse a partir de muchos tejidos del cuerpo, siendo las dos fuentes principales la médula ósea y el tejido adiposo blanco. Sin embargo, estas células no son idénticas y difieren tanto en sus capacidades de diferenciación como en la regulación epigenética del genoma [134, 135]. Esto hace que existan diferentes nomenclaturas para referirse a las MSC; las MSC derivadas de la médula ósea (BM-MSCs, por sus siglas en inglés, *Bone Marrow-MSC*) han sido recientemente propuestas para ser llamadas células madre esqueléticas [136], mientras que las MSC del tejido adiposo blanco son tradicionalmente llamadas células estromales derivadas de tejido adiposo (ASC, por sus siglas en inglés, *Adipocyte Stem Cell*). Un caso particular de tejido mesenquimal es el músculo esquelético,

que cuenta con su propia población de células madre, las denominadas células satélite y el nicho de células madre satélite se comporta como una población similar a las MSC y que se denomina precursor de fibroblastos-adipocitos (FAP, por sus siglas en inglés, *Fibroblast-Adipocyte Precursor*) [137]. Existe, además, una población separada de células madre adultas, aquellas derivadas de la cresta neural [138].

Las MSCs o tipos celulares derivados de ellas dentro de los linajes mesodérmicos pueden constituir la célula de origen responsable del desarrollo de distintos tipos de sarcomas. En el desarrollo de los sarcomas, muchos de los tejidos mesenquimales afectados se someten a una remodelación y renovación continuas muy similares a las ocurridas en los epitelios, por lo que no es de extrañar que exista una organización jerárquica similar. En la cima de esta jerarquía celular se encontrarían las MSCs que se comportan de manera muy parecida a otras células madre adultas, es decir, pueden autorrenovarse y diferenciarse en los respectivos tipos de células posteriores. En el caso de las MSC, el potencial de diferenciación trilineaje *in vitro* se considera un criterio de definición, es decir, tras una estimulación adecuada, pueden entrar en diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica [139, 140]. En general, para que se produzca la transformación tumoral de las MSCs deben ocurrir distintos tipos de mutaciones que bloqueen su diferenciación a un determinado linaje y promuevan la proliferación incontrolada de un determinado clon pretransformado. Esta combinación de mutaciones puede ocurrir en MSCs inmaduras, en tipos celulares derivados de ellas o, incluso, pueden darse en dos momentos distintos dentro de la jerarquía de un determinado linaje. En cualquier caso, parece que cuanto más diferenciado sea el tipo celular que recibe las mutaciones transformantes y actúa como célula de origen, más diferenciado será el sarcoma generado [141, 142]. Además, la posible activación de mecanismos de desdiferenciación epigenética puede también influir en el estado de diferenciación de los sarcomas generados [143].

2.2. Células madre tumorales en sarcomas

Las CSC se han estudiado profundamente en los sarcomas y se ha demostrado su existencia en cada uno de los sarcomas óseos y sarcomas de tejido blando más comunes. Si bien es cierto que la mayoría de estos estudios han desvelado la complejidad intrínseca y la

plasticidad del fenotipo de las CSC, lo que hace que sea importante buscar aquellos reguladores funcionales encargados de mantener un estado similar al de célula madre normal en el contexto del cáncer. Aunque las causas que conducen a la reprogramación pueden ser diversas, incluyendo alteraciones genéticas y epigenéticas, o un microambiente desregulado, el inicio y la progresión del sarcoma parece estar relacionado con una desregulación de los principales factores de pluripotencia de las células madre embrionarias (ESC, por sus siglas en inglés, *Embryonic Stem Cell*). De ellos, SOX2 es el factor más destacado asociado al desarrollo del cáncer [144, 145]. Se han reportado muchos estudios en los que se relaciona la expresión de SOX2 con numerosos cánceres, poniendo de manifiesto que unos niveles elevados de SOX2 son indicativo de mal pronóstico [144]. De hecho, en muchos estudios se ha propuesto como un oncogén, dado su importante papel en el mantenimiento de las células madre y la reprogramación de la pluripotencialidad, considerándose esencial para el desarrollo de la tumorigenicidad y la autorrenovación de las CSC en muchos tipos de tumores [144, 146]. En los sarcomas, ha sido reconocida la función de SOX2 en la adquisición y mantenimiento del fenotipo de las CSC en distintos subtipos [146] demostrando que SOX2 es un regulador crucial de la sarcomagénesis y que sus altos niveles se corresponden con el fenotipo de las CSC. Además, también se ha observado que el desarrollo y supervivencia de muchos sarcomas, así como de sus poblaciones CSCs, es dependiente de la expresión de SOX2 y/o SIRT-1 [147].

Además, como es esperable, otros factores clave en el desarrollo de los sarcomas, son OCT3/4, NANOG o KLF4 [82]. Por otro lado, el efecto de supresores tumorales tales como p53 y pRb juegan un papel clave en el control del desarrollo tumoral puesto que promueven la senescencia. Como vimos anteriormente, la senescencia es un mecanismo clave para la supervivencia de las CSCs durante el desarrollo de las neoplasias, aunque en las primeras etapas de la aparición del sarcoma la activación de la senescencia puede actuar como una barrera de la proliferación tumoral [147].

Entre las rutas de señalización involucradas en la adquisición del fenotipo CSC en sarcomas podemos encontrar WNT/ β -catenina, cuya actividad se ha relacionado con la inducción de senescencia y diferenciación osteogénica o condrogénica en las MSCs [147]. También cabe mencionar la ruta de NOTCH, que juega un papel trascendental en el desarrollo tumoral en

sarcomas de Kaposi [148], osteosarcomas [149] o sarcoma de Ewing, entre otros. Otras rutas relevantes asociadas a fenotipos CSC en sarcomas son Hedgehog, Hippo o ALK [147, 149-151].

2. 2. 1. Aislamiento de subpoblaciones de CSCs en sarcomas

Como hemos visto en el apartado 1.2.3., para detectar y aislar subpoblaciones de CSCs existen una serie de ensayos funcionales que permiten caracterizar este fenotipo, así como la separación mediante citometría de flujo de aquellas células que expresan marcadores de membrana o factores de transcripción relacionados con la pluripotencia. A continuación, expondremos algunos ejemplos empleados para la detección y caracterización de estas subpoblaciones en sarcomas utilizando estos métodos.

Biomarcadores: existen varios ejemplos de biomarcadores intracelulares empleados para la separación de CSCs, como SOX2, OCT4, NANOG o nestina, utilizados para el aislamiento de estas subpoblaciones en distintos subtipos de sarcoma [82]. También, gracias al uso de construcciones celulares con expresión de GFP en respuesta a la actividad de factores de pluripotencia tales como SOX2 y/o OCT4, se ha demostrado que OCT4 es un factor pro-tumorogénico en osteosarcoma [152]. Además, se han logrado aislar subpoblaciones celulares con características de CSC según la expresión del marcador de membrana CD133 individualmente o en combinación con otros marcadores como CD44 en osteosarcomas, condrosarcomas y rhabdomyosarcomas [153-155]. Otros marcadores empleados son STRO-1 y c-kit (CD117) [156] para osteosarcomas, donde se ha visto que aquellas subpoblaciones con expresión de ambos marcadores presentaban mayor capacidad tumorogénica y de generar metástasis.

Ensayos funcionales: se han reportado varios estudios en los que se han aislado subpoblaciones celulares con características de CSC mediante diferentes ensayos funcionales. Mediante el ensayo ALDEFLUOR se ha visto que la expresión de las isoformas ALDH1A1 y ALDH1A3, así como su actividad, está incrementada en subpoblaciones de CSCs originadas por células iniciadoras de sarcomas [157]. Por otro lado, la técnica SP fue la primera empleada para detectar CSCs en sarcomas, permitiendo detectar estas subpoblaciones en sarcoma de Ewing, sarcoma pleomórfico indiferenciado y osteosarcoma

[158-160]. Estas subpoblaciones mostraron características propias de las CSCs, como son, una mayor capacidad de autorrenovación, comportamiento invasivo y mayor resistencia a fármacos, además de ser capaces de generar tumores en ratones de manera más eficiente. Como hemos visto, otro tipo de ensayo que permite aislar subpoblaciones de CSCs está relacionado con su capacidad de generar tumorosferas en cultivo en suspensión. Gracias a ello, se han logrado enriquecer subpoblaciones con características de CSCs en sarcomas de hueso y sarcomas de tejido blando [161].

2.3. Metástasis e invasión en sarcomas

En el caso de los sarcomas, el principal sitio de aparición de crecimientos neoplásicos secundarios es el pulmón [77]. Durante el proceso de metástasis, las células de naturaleza mesenquimal pueden sufrir una migración celular de manera individualizada o formando cadenas de células [162], siguiendo dos mecanismos diferentes; por un lado, la invasión mesenquimal que se caracteriza porque la célula adquiere una morfología elongada y es dependiente de que se produzca la proteólisis de la matriz celular, mientras que en la invasión ameboide, la célula adquiere una morfología redondeada y es independiente de la adhesión y degradación de la matriz extracelular [163].

Modelo mesenquimal: en este tipo de invasión celular adquiere un papel muy importante la matriz extracelular, tanto la interacción que se produce entre ella y las células tumorales mediante las integrinas, como su remodelación mediada por proteasas [162]. Durante el inicio de la migración se observan cambios similares a los ocurridos durante la transición epitelio-mesénquima observado en las células epiteliales, es decir, existe un aumento en la expresión de N-cadherinas y una disminución en la expresión de E-cadherinas, lo que favorece el crecimiento independiente de anclaje [164]. En rabdomiosarcomas, se ha visto que la expresión de N-cadherina y de la integrina 9α se asocia con una mayor actividad invasiva dependiente de NOTCH [165].

Modelo ameboide: en este tipo de invasión llevada a cabo en algunos subtipos de sarcomas se ha visto que durante la migración a través del endotelio se produce una transformación celular del fenotipo mesenquimal al ameboide (MAT, por sus siglas en inglés, *Mesenchymal to Amoeboid Transition*) [162]. Se han descrito varios casos en los que se produce este tipo

de migración, como es en el caso del liposarcoma mixoide, donde la proteína de fusión FUS-CHOP juega un papel importante promoviendo la invasión dependiente de la ruta SRC/FAK/Rho/Rock [166] o en fibrosarcomas [162].

Ambos tipos de migración celular, tanto la de tipo mesenquimal como la de tipo ameboide, dependen de las características celulares, así como del microambiente celular [162, 166, 167].

2.4. Clasificación de los sarcomas

De manera general, los sarcomas se clasifican en dos grandes grupos según las características histopatológicas que presentan: sarcomas primarios de hueso (BS, por sus siglas en inglés, *Bone Sarcomas*) y sarcomas de tejido blando (STS, por sus siglas en inglés, *Soft Tissue Sarcomas*). En la **Tabla 2** se describen las características principales de los subtipos histológicos que se incluyen dentro de estos dos grandes grupos.

Otra clasificación de los sarcomas se basa en la complejidad de los defectos genéticos que presentan y que son responsables del mantenimiento de la neoplasia. Basándonos en esta clasificación, encontramos sarcomas que presentan defectos simples en el cariotipo (translocaciones o inversiones cromosómicas y mutaciones activadoras) [129] y sarcomas que presentan alteraciones complejas en el cariotipo (reordenamientos cromosómicos, principalmente).

Puesto que los resultados expuestos en esta Tesis Doctoral se centran, principalmente, en dos subtipos histológicos de sarcomas, a continuación, describiremos de manera detallada las características de cada uno de ellos, centrándonos en los aspectos más importantes para la correcta comprensión de los estudios realizados, así como para la interpretación de los descubrimientos obtenidos.

Tabla 2. Principales subtipos de sarcoma y sus características. Adaptado de [168].

SUBTIPO DE SARCOMA	PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS
SARCOMAS ÓSEOS	
Condrosarcoma [§]	<ul style="list-style-type: none"> - Localización: cartílago, superficie del hueso o interior óseo - Histopatología: lóbulos compuestos por condrocitos malignos atrapados en el interior de una matriz condroide con zonas calcificadas - Mutaciones identificadas: IDH1/2, EXT1/2
Sarcoma de Ewing [§]	<ul style="list-style-type: none"> - Localización: huesos largos y planos (≈80%), zonas extraesqueléticas (≈15%) - Histopatología: células redondas pequeñas indiferenciadas, en su mayoría con inmunorreactividad de membrana positiva para CD99 y citoplasma PAS-positivo - Translocaciones somáticas FET-ETS (≈85% EWS-FLI1, ≈10% EWSR1-ERG, ≈5% subtipos raros)
Osteosarcoma [§]	<ul style="list-style-type: none"> - Localización: superficie ósea o interior del hueso - Histopatología: células neoplásicas con morfología mesenquimal y polimorfismo frecuente (epiteliode, fusiforme, redonda, en huso) asociado con una matriz osteoide extracelular - Varios subtipos se caracterizan por presentar áreas hemorrágicas - Cariotipos aneuploides con múltiples aberraciones cromosómicas (numéricas y estructurales) - Mutaciones frecuentes en TP53 y Rb
SARCOMAS DE TEJIDO BLANDO	
Fibrosarcoma [§]	<ul style="list-style-type: none"> - Localización: tejidos blandos profundos en las extremidades, tronco, cabeza y cuello - Histopatología: células cancerígenas monomórficas fibroblásticas en una matriz de colágeno
Tumores del estroma gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none"> - Localización: tracto gastrointestinal (estómago e intestino delgado, principalmente) - Histopatología: amplio espectro morfológico con, principalmente, células fusiformes y células epitelioides (≈20% de los casos) o histología mixta caracterizada por la diferenciación hacia células intersticiales de Cajal. Por lo general, inmunopositivos para CD117 (KIT) y DOG1 - Mutaciones activadoras en KIT y PDGFRA
Leiomioma	<ul style="list-style-type: none"> - Localización: peritoneo y útero (raramente en hueso) - Histopatología: mesenquimal, células fusiformes con diferenciación de músculo liso (positividad para SMA, desmina y h-caldesmon) - Cariotipos muy complejos con inestabilidad genómica

Antecedentes

Liposarcoma [§]	<ul style="list-style-type: none">- Localización: variable (más comúnmente en el espacio retroperitoneal)- Histopatología: células cancerígenas con diferenciación adipocítica variable y una morfología heterogénea incrustadas en un estroma vascularizado (en el subtipo mixoide, en el interior de un estroma mixoide)
Rabdomiosarcoma	<ul style="list-style-type: none">- Localización: variable- Histopatología: fenotipo mesenquimal con diferenciación miogénica variable (generalmente positividad para miogenina y MYOD)
Sarcoma pleomórfico indiferenciado [§]	<ul style="list-style-type: none">- Localización: más frecuentemente en las extremidades- Histopatología: células neoplásicas indiferenciadas con elevado grado de atipia y pleomorfismo celular
Sarcoma sinovial	<ul style="list-style-type: none">- Localización: principalmente en los tejidos blandos de las extremidades- Histopatología: células fusiformes con diferenciación mesenquimal y/o epitelial variable (como los subtipos monofásico, bifásico).- Oncogenes de fusión SS18-SSX1/2/4

[§]Los subtipos más comunes de sarcomas óseos y sarcomas de tejido blando según la clasificación de tumores WHO 2020).

2. 4. 1. Condrosarcomas

El término condrosarcoma (CDS) se emplea para denominar a un grupo heterogéneo de tumores primarios de crecimiento lento, caracterizados por la formación de tejido neoplásico hialino cartilaginoso. Afecta principalmente a individuos en edad adulta y es el segundo tumor sólido primario de hueso más común después del osteosarcoma [169]. Los CDS representan aproximadamente 3 nuevos casos por cada 106 casos de neoplasia al año [170]. El pronóstico para la mayoría de los pacientes con CDS es favorable, ya que, aproximadamente el 90% de ellos son de grado bajo-intermedio (grado 1-2), donde el paciente apenas muestra dolor y rara vez hace metástasis [171]. Sólo el 5-10% de los CDS convencionales son de grado 3, caracterizados por presentar una resistencia al tratamiento con quimio o radioterapia y donde el desarrollo de metástasis pulmonares es habitual [172].

2. 4. 1. 1. Condrogénesis

La condrogénesis es la formación de condrocitos y tejidos cartilaginoso que comienza con el reclutamiento y la migración de células madre mesenquimales (MSC), la condensación

de los progenitores y la diferenciación y maduración de los condrocitos. La diferenciación condrogénica de las MSC depende de la correulación de muchos factores exógenos y endógenos, entre ellos, señales microambientales específicas, ARNs no codificantes, factores físicos existentes en las condiciones de cultivo, etc.

En la **Figura 5** se resumen las vías de señalización y proteínas implicadas en la diferenciación condrogénica de las células madre mesenquimales.

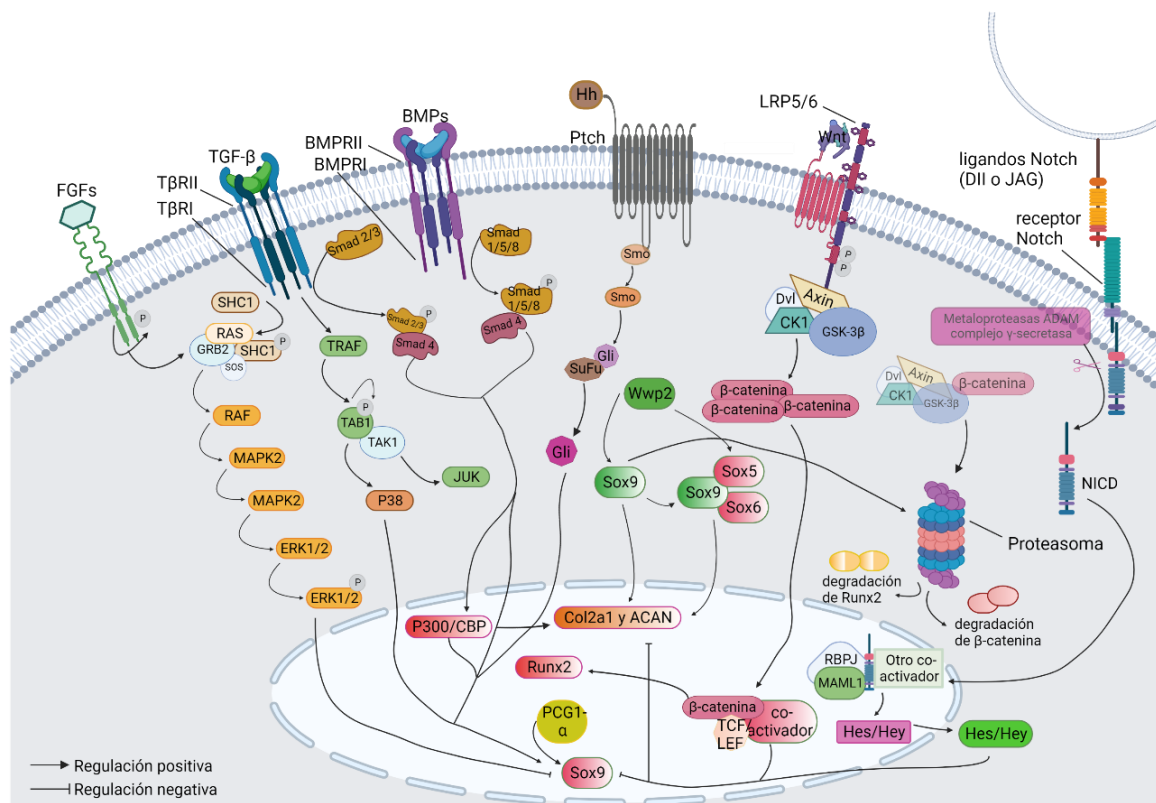


Figura 5. Vías de señalización y proteínas implicadas en la diferenciación condrogénica de las células madre mesenquimales. Las vías TGF- β y Hedgehog dependientes de R-SMAD pueden promover la sobreexpresión de SOX9, mientras que las vías Notch y Wnt pueden inhibir el factor de transcripción condrogénico SOX9. El FGF puede actuar en la vía de TGF- β independientemente de R-SMAD, participando así en la diferenciación condrogénica. Hay otras moléculas que interactúan con SOX9, como el factor de transcripción osteogénico Runx2, el coactivador del receptor gamma 1 α activado por los peroxisomas (PGC1- α) y el miembro de la familia de la histona acetiltransferasa P300/CBP. Creada con Bio-render.

2. 4. 1. 2. Formación de neoplasias cartilaginosas

En condiciones normales, el proceso de formación de hueso es el resultado de una producción de matriz cartilaginosa hialina producida por los condrocitos, seguida de la osificación de la matriz por los osteoblastos. En primer lugar, las células madre

mesenquimales se diferencian en la placa de crecimiento epifisaria en condrocitos, que primero se encuentran en reposo para luego migrar a una zona proliferativa donde se multiplican y aumentan la celularidad de la matriz. Estas células proliferativas abandonan la placa epifisaria antes de comenzar la fase hipertrófica, en la que maduran hasta convertirse en grandes células claras. Finalmente, las células sufren apoptosis, dejando atrás la característica matriz hialina hipocelular del cartílago. En este momento, los osteoblastos migran a esta matriz e inician la osificación [173].

El problema ocurre cuando se produce una desregulación en el proceso de formación normal que ocasiona la aparición de las neoplasias cartilagosas. Uno de los tumores óseos benignos más comunes son los osteocondromas, que consisten en una protuberancia ósea recubierta de cartílago en la superficie del hueso, la cual contiene una cavidad medular continua con el hueso subyacente [174]. En la mayoría de los casos la formación de estas lesiones ocurre de manera esporádica, pero un 15% presentan lesiones múltiples de este tipo debidas al trastorno genético autosómico dominante del osteocondroma múltiple (MO, por sus siglas en inglés, *Multiple Osteochondroma*). El riesgo de que se produzca una transformación maligna hacia CDS periférico secundario varía en función de la lesión primaria; mientras que para el osteocondroma esporádico es del 1%, para el MO es del 5% [174]. Otro tipo de neoplasia cartilaginosa benigna son los encondromas que, a diferencia con los anteriores, surgen en el interior de la cavidad medular del hueso. Histológicamente se asemejan mucho a los CDS de grado 1 por lo que para realizar el diagnóstico es necesario realizar una correlación radiográfica.

2. 4. 1. 3. Clasificación de los condrosarcomas

Atendiendo a las características histológicas y clínicas, los CDS se clasifican en 4 grados tumorales, de forma que los grados más altos presentan un peor pronóstico [169]:

- **Grado I (grado bajo):** se caracterizan por tener un crecimiento lento y un riesgo bajo de desarrollar metástasis. Histológicamente presentan una celularidad moderada, encontrando células con núcleos grandes e hipercromáticos, así como células binucleadas.

- **Grado II (grado medio-bajo):** junto con los anteriores, son los tumores más comunes al diagnóstico. Histológicamente se caracterizan por presentar una celularidad más abundante, un mayor grado de atipia celular y una mayor presencia de células mitóticas.
- **Grado III (grado medio-alto):** se caracterizan por presentar celularidad atípica, con mayor tasa de división mitótica y menor porcentaje de células con reminiscencia condrocítica, es decir, presentan un menor grado de diferenciación.
- **Grado IV (grado alto):** es el de peor pronóstico y mayor probabilidad de metastatizar. Suele corresponderse con el subtipo de condrosarcoma dediferenciado.

Hay que tener en cuenta que, ocasionalmente, también se pueden encontrar en un mismo tumor, áreas con diferente grado histológico.

Podemos encontrar distintos subtipos de CDS basándonos en su localización y origen. Los CDS que surgen sin estar asociados a una lesión preexistente se denominan CDS **primarios**, mientras que aquellos que se desarrollan a partir de un tumor cartilaginoso benigno preexistente, como son el encondroma o el osteocondroma, se denominan CDS **secundarios**. Pueden clasificarse, además, como CDS **centrales** cuando surgen en el interior de la cavidad medular y CDS **periféricos** cuando surgen de la superficie ósea, principalmente de la cubierta cartilaginosa de una exostosis. En el caso de los CDS primarios son casi siempre centrales, mientras que los CDS secundarios pueden ser centrales o periféricos [169].

Existen otras variantes de CDS menos comunes [169, 175]. Los CDS **dediferenciados** se desarrollan cuando los convencionales de bajo grado se transforman en un sarcoma de alto grado, presentando de manera más frecuente características de osteosarcoma, fibrosarcoma o sarcoma pleomórfico indiferenciado. Es altamente agresivo, siendo la supervivencia a un año inferior al 10%. Por otro lado, los CDS **mesenquimales** son altamente malignos, con un componente de células redondas pequeñas altamente indiferenciadas mezcladas con islas de cartílago bien diferenciado [176]. En el caso del CDS **mixoide**, se trata de una neoplasia de crecimiento lento caracterizada por una

degeneración mixoide y un curso clínico prolongado a pesar de las altas tasas de recurrencia local y metástasis [177]. Este subtipo de CDS se caracteriza por presentar translocaciones tales como EWSR1-NRA3 [178], EWSR1-TAF15 [179] y EWSR1-TCF12 [180].

2. 4. 1. 4. Alteraciones genéticas y epigenéticas en los condrosarcomas

Existen una serie de alteraciones metabólicas en los condrosarcomas que están directamente relacionadas con el estado epigenético y el microambiente tumoral y que son responsables de una respuesta negativa frente a los tratamientos convencionales:

COL2A1: el gen COL2A1 codifica la cadena α de las fibras de colágeno de tipo II, el principal colágeno constituyente del cartílago articular. Ha sido descrita hipermutabilidad en este gen con inserciones, deleciones y reordenamientos en el 37% de los casos de CDS [181]. Esto provocaría una alteración en el proceso de maduración del colágeno, produciendo una cadena α aberrante, desencadenando tanto un depósito anormal de la matriz, como alteraciones de la señalización normal implicada en la diferenciación cartilaginosa.

IDH: las enzimas isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) y 2 (IDH2) están implicadas en varias funciones celulares, incluyendo la regulación del metabolismo de los carbohidratos, epigenética, diferenciación, reparación en el ADN y estado redox. En condiciones normales, IDH1 e IDH2 catalizan la descarboxilación oxidativa del isocitrato y su conversión a α -cetoglutarato (α -KG, por sus siglas en inglés, *α -ketoglutarate*) en la mitocondria durante el ciclo de Krebs y, simultáneamente, la reducción de NADP⁺ a NADPH. El α -KG es un metabolito central del ciclo TCA (ácido tricarbóxico, por sus siglas en inglés, *Tricarboxylic Acid Cycle*) y también es necesaria para la función de las dioxigenasas dependientes de α -KG que participan en la regulación epigenética y en la reparación del ADN. Las mutaciones en IDH son prevalentes en varios tipos de cáncer, entre los que se incluyen, glioma de bajo grado y glioblastomas secundarios (80%) [182, 183], leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés, *Acute Myeloid Leukemia*) (20%) [184-186], colangiocarcinoma (20%) [187, 188], condrosarcoma (80%) [189], carcinoma indiferenciado nasosinusal (49-82%) [190-192] y linfoma angioinmunoblástico de células T (32%) [193, 194]. Estas mutaciones en IDH se encuentran siempre en heterocigosis y se producen en forma de puntos calientes

en los sitios enzimáticamente activos, aunque se han reportado algunos casos de la mutación en homocigosis, en glioma difuso [195] y en glioblastoma [196]. Estas mutaciones

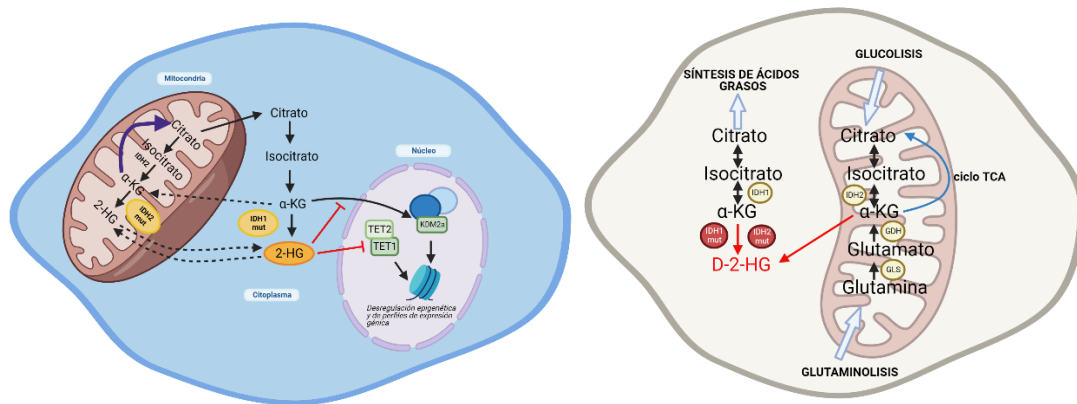


Figura 6. Vías de producción de D-2-HG. Se muestran las distintas vías de producción del oncometabolito a nivel citoplasmático y mitocondrial como consecuencia de mutaciones en IDH1/2, así como su efecto sobre la desregulación epigenética. Creada con Bio-render.

dan lugar a sustituciones no sinónimas en los residuos de arginina R132 en IDH1 y R172 en IDH2, así como una mutación ocasional de IDH2 en R140 en neoplasias mieloides malignas [186]. Estos cambios de aminoácidos modifican el sitio activo de las enzimas IDH, en los que se unen los sustratos y se produce la reacción catalítica. Como consecuencia, la enzima mutada adquiere una actividad enzimática nueva en la que se cataliza la conversión del α-KG en un oncometabolito, el enantiómero (D) de 2-hidroxiglutarato (D-2-HG). Este compuesto está, normalmente, presente a niveles fisiológicos muy bajos, ya que la enzima D-2-HG deshidrogenasa lo reconvierte de manera muy eficiente en α-KG. Sin embargo, la mutación de las enzimas IDH tiene como consecuencia la acumulación patológica de D-2-HG. El acúmulo de elevados niveles de D-2-HG produce alteraciones metabólicas que pueden inducir la formación de tumores, tales como gliomas [197], carcinoma renal [198], carcinoma escamoso de cabeza y cuello [199], carcinoma papilar de tiroides [200], cerebro [201], leucemias [202] y condrosarcomas [203]. Este oncometabolito es estructuralmente similar al α-KG y, por tanto, compite con éste por sustratos comunes, resultando en la inhibición de oxigenasas dependientes de α-KG, las hidroxilasas de metilcitosina y las desmetilasas de histonas de la familia TET, que regulan el estado de metilación del ADN y las histonas, respectivamente (**Figura 6**). La inhibición de estas enzimas promueve la hipermetilación del ADN y de las histonas, produciendo una desregulación génica que tiene

como resultado el bloqueo de distintas rutas de diferenciación celular y el comienzo de procesos oncogénicos. Este fenotipo hipermetilado se ha encontrado en todos los tumores con mutaciones en las enzimas IDH, incluyendo los condrosarcomas [204]. De forma paralela, el D-2-HG puede provocar un aumento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*) secretado por las células tumorales y promover así la proliferación de las células endoteliales, además de inducir la angiogénesis aumentando la actividad de MMP a través de VEGFR2 [205]. Además, también se cree que el D-2-HG desestabiliza HIF1 mediante la inhibición competitiva de las hidroxilasas de prolina dependientes de α -KG que facilitan su degradación proteosomal, activando la señalización de HIF1, promoviendo la angiogénesis y la tumorigénesis [206].

Vía Hedgehog: como hemos descrito anteriormente, la vía HH es vital para el proceso de embriogénesis normal y desempeña un papel esencial en el mantenimiento, la renovación y la regeneración de los tejidos adultos [52]. La señalización comienza cuando el ligando IHH se une al receptor de membrana (PTCH1), produciendo la liberación de SMO que media la activación del factor de transcripción GLI para iniciar una serie de respuestas celulares, incluyendo supervivencia, proliferación y diferenciación celular [207]. El proceso de condrogénesis está regulado por la vía IHH/hormona paratiroidea PTHrP. IHH induce la división de los condrocitos, así como la secreción de PTHrP. A su vez, PTHrP inhibe la diferenciación condrocítica y los mantiene en un estado proliferativo, además de regular negativamente a IHH para mantener la diferenciación de los condrocitos controlada. Una desregulación en esta ruta provocaría, por tanto, el desarrollo de CDS.

Retinoblastoma y TP53: las alteraciones en vías supresoras tumorales son comunes en CDS. En condiciones normales, la proteína Rb provoca una inhibición en la progresión del ciclo celular. Mediante la secuenciación de exoma completo, así como mediante técnicas de inmunohistoquímica, se han visto alteraciones en esta vía por pérdida de heterocigosidad en el gen en diferentes casos de CDS convencional y CDS desdiferenciado [208, 209]. En el caso del gen TP53, es el gen más comúnmente mutado en tumores humanos. Se han descrito alteraciones en este gen en CDS convencionales y CDS desdiferenciados [210]. La inactivación de la proteína p53 también puede ser debida a la

unión con la proteína MDM2 y, de hecho, se ha observado una sobreexpresión de MDM2 en CDS de alto grado que se correlaciona con un aumento en el grado histológico [208].

Vía PI3K-AKT-mTOR: como vimos anteriormente, AKT regula múltiples procesos biológicos, como son la supervivencia y proliferación celular, el crecimiento y el metabolismo del glucógeno [60]. Por su parte, mTOR regula la progresión del ciclo celular, la proliferación celular, la autofagia y la angiogénesis mediante la señalización PI3K/AKT [211]. En líneas celulares derivadas de condrosarcomas humanos se ha descrito una fosforilación de los receptores tirosina-quinasa (RTK, por sus siglas en inglés, *Receptor Tyrosine Kinase*), en particular, AKT, MEK y la quinasa S6, lo que sugiere la importancia clínica de la vía PI3K-AKT-mTOR en CDS [212].

Epigenética: una correcta regulación post-transcripcional de los genes requiere de la metilación del ADN y de la modificación de las histonas. En CDS, se ha descrito, que el promotor del gen supresor de tumores P16INK4a se encuentra hipermetilado [213]. De igual manera, se ha descrito que la hipermetilación de la región promotora del factor de transcripción RUNX3 produce un aumento de la proliferación celular y una reducción de la apoptosis en células de CDS *in vitro* [214]. Como hemos visto, y resulta importante destacar en este punto, todas estas alteraciones epigenéticas producidas en los CDS son resultado de una acumulación patológica del oncometabolito D-2-HG producido por una conversión aberrante del isocitrato durante el ciclo de Krebs y que conlleva a una inhibición de las demetilinasas de metilcitosina TET.

Otras rutas y genes alterados: además de lo anteriormente expuesto, otros genes frecuentemente mutados en el CDS, relacionados con el proceso de control del ciclo celular, son MDM2 y la quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4), que inhiben a p53 y están sobreexpresados en los CDS [215]. La alta expresión de CDK4 y MDM2 se asocia con la amplificación en la región 12q13 del gen, lo cual se ha observado con frecuencia en los CDS centrales y se correlacionó con un mayor grado histológico de este tumor [208]. La sobreexpresión de MDM2 también se observó en los CDS desdiferenciados [216] y en el subtipo de CDS periosteales [217]. Como hemos visto, otra vía crucial que se encuentra alterada en el CDS de alto grado es la vía del pRb, en la que el gen del inhibidor quinasa

dependiente de ciclina 2A (CDKN2A), que codifica para p16INK4a y p14ARF [208], desempeña un importante papel. La pérdida de expresión de CDKN2A/p16/INK4A, causada por una deleción en la región 9p21 [208, 215] ha sido descrita en varios subtipos de CDS, como en CDS desdiferenciados [218] y CDS mesenquimales [216]. Otras alteraciones genéticas observadas en los CDS son la amplificación en la región 8q24 del oncogén c-Myc o en las regiones cromosómicas 13q14 y 17p13 que se producen, principalmente, en los CDS bien diferenciados [219]. También ha sido detectada una amplificación en la región 11q22, que alberga a un clúster del gen de las metaloproteinasas de la matriz (MMP), altamente expresado en CDS [220, 221]. También han sido descritas mutaciones inactivadoras en los genes de la exostosina-1/2 (EXT1/2), implicados en la proliferación de la placa de crecimiento condrocítica, en CDS periférico [221]. Esta inactivación bialélica también se ha descrito en osteocondromas esporádicos y hereditarios [222, 223] con mucha mayor frecuencia que en los CDS, lo que sugiere que los mecanismos de patogénesis del CDS periférico secundario sean independientes de EXT [224].

2. 4. 1. 5. Tratamiento sistémico convencional en los condrosarcomas

La evaluación del grado histológico y una adecuada clasificación histopatológica y radiológica (radiografía convencional, resonancia magnética o tomografía computarizada) son necesarios para orientar las decisiones del tratamiento de elección, entre los que se encuentran:

Cirugía: aunque para todos los grados y subtipos de CDS no metastásico el tratamiento quirúrgico completo ofrece la única posibilidad de cura, es importante tener en cuenta que para cada uno de ellos existe un tipo de cirugía con un resultado óptimo respecto a otra. La escisión amplia y en bloque es el tratamiento quirúrgico idóneo para los CDS de grado medio y alto [225], sin embargo, puede ocasionar morbilidad y requerir de una reconstrucción, dependiendo de la localización. Por otra parte, en los CDS de bajo grado, se están observando resultados clínicos prometedores a largo plazo, así como un control local satisfactorio, tras la realización de un extenso curetaje intralesional seguido de un tratamiento adyuvante local (fenolización o criocirugía) para finalizar con un relleno de la cavidad mediante un injerto [226, 227]. Hay que tener en cuenta, que el tratamiento

adyuvante local sólo puede utilizarse con éxito en lesiones limitadas al hueso [227]. Si bien es cierto, en algunos de estos casos de CDS de bajo grado, la escisión intralesional puede no ser adecuada debido, por ejemplo, al gran tamaño de la misma, por lo que habría que practicar una resección amplia como tratamiento local. Para los pacientes que presentan lesiones irresecables de consistencia mucoide (generalmente CDS convencional de grado II o III), la aspiración del tumor es un método empleado como opción paliativa contra el dolor que sufren. En el caso de los pacientes con CDS desdiferenciados el pronóstico hoy en día sigue siendo malo, a pesar de una adecuada y amplia resección quirúrgica seguida de una terapia sistémica adyuvante [228].

Radioterapia: como los CDS crecen lentamente, con una fracción relativamente baja de células en división, y dado que la RT actúa sobre las células en división, este tipo de tumores sólidos se consideran resistentes a la radioterapia. La RT puede ser considerada en dos situaciones: tras una resección incompleta con el objetivo de conseguir el mayor control local y en situaciones en las que la resección no es factible o causa una morbilidad inaceptable. Hay que tener en cuenta que la radiación convencional con fotones no puede aplicarse en localizaciones comprometidas, tales como los CDS que surgen en la base del cráneo y el esqueleto axial. Por ello, se han probado otras modalidades alternativas de radiación, como la RT con protones [229] o la RT con iones de carbono [230] u otras partículas cargadas tales como helio y neón [231], todas ellas con buenos resultados. En los CDS que no son resecables, especialmente los CDS mesenquimales, la RT se emplea como método paliativo [232].

Quimioterapia: al igual que el tratamiento con RT, los agentes quimioterapéuticos convencionales actúan sobre células que se dividen activamente, por lo que no suelen ser eficaces en los CDS, especialmente en el CDS convencional y en la variante rara de CDS de células claras. Además, la alta cantidad de matriz extracelular y la escasa vascularización que presentan este tipo de tumores sólidos dificulta la difusión de los agentes citotóxicos hacia las células tumorales. Otro motivo de esta resistencia a la QT puede ser la expresión de genes de resistencia, tales como el gen de resistencia a múltiples fármacos, P-glycoprotein, que se ha reportado que aporta resistencia al tratamiento con doxorubicina *in vitro* [233]. Para el CDS desdiferenciado el tratamiento con QT apenas muestra

resultados, como se ha visto tras el empleo de doxorrubicina y cisplatino, los pacientes tuvieron una mala respuesta al tratamiento en su tumor primario [234].

2. 4. 1. 6. Terapias dirigidas en el tratamiento de los condrosarcomas

Como hemos visto, los CDS son prácticamente resistentes al tratamiento convencional con RT y QT debido, principalmente, a su fenotipo subyacente, es decir, a la escasa vascularización, la lenta tasa de división celular y la presencia de una matriz cartilaginosa hialina que impide el acceso del tratamiento hasta las células neoplásicas. Esto hace que exista una urgente necesidad de desarrollar nuevas opciones terapéuticas dirigidas, especialmente en aquellos pacientes que presenten una enfermedad irresecable o metastásica. Por ello, un conocimiento más profundo del metabolismo del condrosarcoma, incluyendo las enzimas glicolíticas y del TCA, los metabolitos, las vías de señalización y los genes supresores de tumores y oncogenes que modulan el metabolismo pueden ayudarnos a identificar vulnerabilidades que podrían ser explotadas terapéuticamente [235].

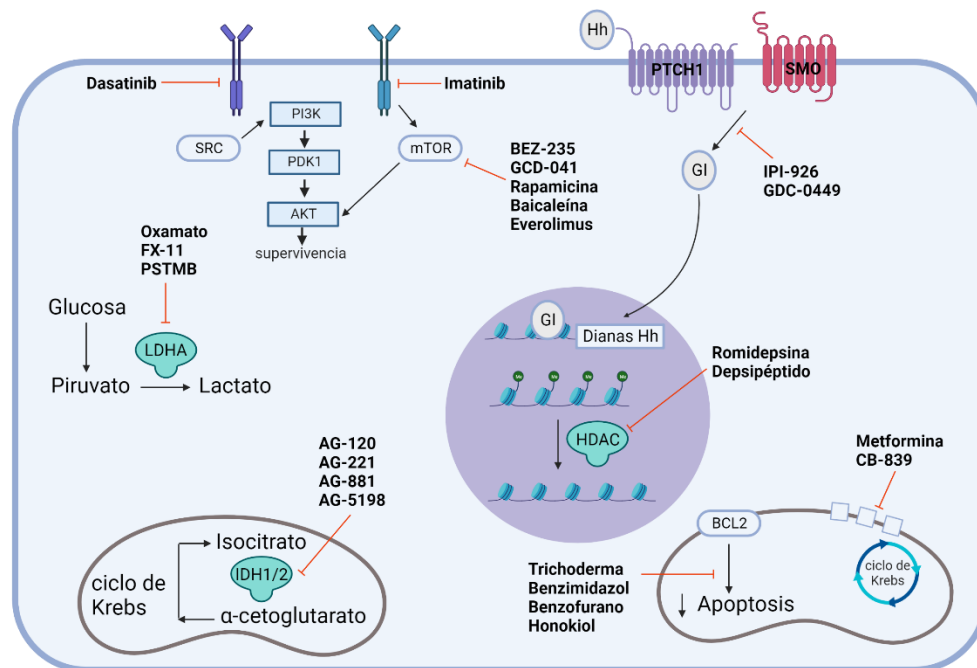


Figura 7. Dianas metabólicas y posibles terapias en condrosarcomas. Se muestran las principales rutas y genes alterados en condrosarcomas, así como las posibles terapias dirigidas frente a estas alteraciones. Creada con Bio-render.

Los cambios genéticos que afectan al metabolismo mitocondrial son de especial interés, ya que, como hemos visto, las mutaciones más comunes en estos cánceres se encuentran en el gen IDH y la enzima mutada resultante modula tal metabolismo [235]. Además, las vías que utilizan el α -KG como sustrato se encuentran alteradas en los cánceres con IDH mutado, lo que lleva a una desregulación epigenética produciendo metilación del ADN y modificación de histonas, reestructuración de la cromatina, bloqueo de la diferenciación celular y otros efectos transformadores [236-241], por lo que una inhibición de la glucólisis y de la glutaminólisis resultaría en una disminución de los niveles de α -KG [242].

En la **Figura 7** se muestra un resumen de las dianas metabólicas y posibles terapias dirigidas en los condrosarcomas. En esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en el empleo de inhibidores frente a mutaciones en el gen IDH, así como en inhibidores de las rutas de producción del α -KG, por lo que, para un mejor entendimiento de los resultados presentados, a continuación, detallaremos varios ejemplos de terapias dirigidas específicamente contra variantes mutantes de las enzimas IDH desarrolladas en los últimos años [243], así como inhibidores de las rutas de síntesis de α -KG:

Enasidenib (AG-221): inhibidor selectivo de IDH2 mutado, capaz de reducir los niveles de D-2-HG, revertir los patrones de metilación de las histonas e inducir la diferenciación celular, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, en una línea celular de AML. En ratones inoculados con estas células portadoras de la mutación IDH2-R140Q, el tratamiento oral con enasidenib fue bien tolerado, reduciendo los niveles intracelulares de D-2-HG por debajo de los límites detectables y promoviendo en las células la expresión de marcadores de diferenciación, incluyendo CD11b, CD14, CD15 y CD24. De hecho, al final del tratamiento, más del 60% de las células humanas se habían diferenciado y las células que no respondieron no expresaban CD15, lo que indica que la inducción de la diferenciación es necesaria para obtener un beneficio en la supervivencia [244].

Enasidenib fue aprobado por la Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*) en agosto de 2017 como tratamiento oral en pacientes con AML reincidente con mutación en IDH2. Se están llevando a cabo varios ensayos clínicos con este fármaco. El primer ensayo en

humanos en fase I/II incluyó a 345 pacientes con hematologías avanzadas que presentaban mutación en IDH2 (predominantemente AML o síndrome mielodisplásico de alto riesgo) [245-247], el 25% de los cuales tenía mutación IDH2-R172 y el 75% mutación IDH2-R140. En estos ensayos, enasidenib redujo los niveles de D-2-HG en plasma en el 92-99% de los pacientes con mutación R140Q y en el 28-94% de pacientes con la mutación R172K. Además, tras evaluaciones morfológicas e inmunofenotípicas, se observó una diferenciación mieloide y una recuperación del trilineaje hematopoyético. En general, el tratamiento fue bien tolerado, con algún efecto secundario como la hiperbilirrubinemia (10%) y la trombocitopenia (7%), así como el desarrollo de síndrome de diferenciación asociado al empleo del inhibidor.

En los últimos años, ha sido aprobado un ensayo clínico en adultos con tumores sólidos en estadio avanzado con mutación en IDH2, incluyendo glioma, linfoma angioinmunoblástico de células T, colangiocarcinoma intrahepático y condrosarcoma. Este ensayo en fase I/II incluye un total de 21 participantes y los datos de los resultados, hoy en día, no han sido todavía reportados (NCT02273739).

Ivosidenib (AG-120): inhibidor de las proteínas anómalas producidas por los genes IDH1 mutados. *In vitro*, reduce rápidamente los niveles de D-2-HG e induce la diferenciación celular en distintos modelos preclínicos [248]. En un modelo de xenógrafo de glioma humano con mutación en IDH1, redujo de forma dosis-dependiente los niveles de D-2-HG en los tumores cerebrales.

La FDA aprobó el uso de ivosidenib en pacientes con neoplasias hematológicas avanzadas con mutación en IDH1 basándose en un estudio en fase I que evaluaba la eficacia, la seguridad y el perfil farmacocinético del inhibidor [249, 250].

Actualmente, se están llevando a cabo ensayos clínicos en fase I en pacientes con condrosarcoma con mutación en este gen, consiguiéndose que los niveles de D-2-HG en plasma de todos disminuyeran significativamente hasta alcanzar el nivel de los individuos sanos [251].

AGI-5198: inhibidor selectivo de la mutación en IDH1 R132H/R132C. Un estudio realizado en líneas de condrosarcoma con estas mutaciones concluyó que el tratamiento fue capaz

de disminuir la producción de D-2-HG de una forma dosis-dependiente. Además, este tratamiento inhibió la proliferación de las células tumorales y su capacidad de migración, al tiempo que aumentaba la apoptosis [252]. Sin embargo, otro estudio reportó que, a pesar de que el tratamiento con este inhibidor es capaz de reducir de manera eficaz los niveles de D-2-HG en líneas de condrosarcoma mutadas para IDH1, no es capaz de inhibir sus propiedades tumorigénicas [253].

Vorasidenib (AG-881): inhibidor oral frente a ambas formas mutadas, IDH1 e IDH2. Aprobado por la FDA, en combinación con azacitidine, para el tratamiento de la AML. Se ha demostrado, además, que el tratamiento con este inhibidor en un modelo xenógrafo de glioma produjo la reducción de los niveles de D-2-HG [254].

Como decíamos, existen, además, inhibidores de las vías de producción de α -KG, el sustrato que emplean las enzimas mutadas IDH1 e IDH2 para la producción de D-2-HG. Se ha descrito que el uso de inhibidores de la ruta de la glucólisis y la glutaminólisis en líneas de condrosarcoma de alto grado puede ser una potencial estrategia terapéutica [242]. Los condrosarcomas de alto grado tienen una mayor expresión de glutaminasa, aunque no se observa una diferencia significativa en función del estado de IDH [255]. Se ha descrito que un subconjunto de líneas celulares de condrosarcoma es sensible a los fármacos dirigidos a la glutaminólisis, en concreto **CB-839**, inhibidor de la glutamato deshidrogenasa, y la **metformina**, inhibidor de la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS, por sus siglas en inglés, *Oxidative PHOSphosrylation*), así como de la glutaminólisis [242]. Este estudio demostró que la cloroquina aumentaba la apoptosis mediante el incremento de la actividad de la caspasa 3/7 *in vitro* y que la metformina redujo la señalización de mTOR en estas células de CDS disminuyendo la proteína S6 fosforilada, al igual que se había demostrado anteriormente en otros tipos de cáncer [256]. Como vimos, las mutaciones de IDH2 en células de CDS modulan la diferenciación mesenquimal a través de la desregulación epigenética, por lo que el tratamiento con el agente hipometilante **azacitidine** puede plantearse como una estrategia terapéutica prometedora [257].

Por último, otro estudio reciente identificó fármacos con eficiente efecto antitumoral en la eliminación de células madre tumorales de glioblastoma mediante un escrutinio de 147

fármacos antitumorales aprobados por la FDA en seis líneas primarias de glioblastoma. Entre estos fármacos, se encuentran compuestos quimioterapéuticos como la doxorubicina, la daunorrubicina o la epirubicina, inhibidores del proteosoma como borezomib o carfilzomib, inhibidores de la síntesis de proteínas como la omacetaxina o antibióticos antitumorales como la mitramicina [258]. De hecho, y como veremos a lo largo de los resultados expuestos en esta Tesis, se ha demostrado que el análogo de la mitramicina, **EC-8042**, presenta un potente efecto antitumoral contra subpoblaciones de CSCs en distintos tipos de sarcomas, incluyendo una línea de CDS con mutación en IDH2 establecida en nuestro laboratorio, por lo que este compuesto podría también resultar efectivo contra este tipo de tumores sólidos [259].

Por tanto, es importante destacar la necesidad de nuevos estudios que determinen con claridad los factores de los que depende la respuesta a los inhibidores de mutantes IDH en CDS. De hecho, hasta la fecha, no se ha testado el efecto de fármacos dirigidos contra enzimas IDH2 mutantes, como es el enasidenib, en CDS con mutaciones para este gen.

2.4.2. Sarcoma pleomórfico indiferenciado

Se trata de un grupo heterogéneo de sarcomas pleomórficos que no presentan una línea de diferenciación definida [84, 260]. Es por ello por lo que estos tumores pueden presentar una amplia variedad de morfologías, características biológicas, pronóstico y respuestas a tratamientos. Los lugares de aparición principales son las extremidades, principalmente las inferiores, durante la adultez tardía, presentando su pico de incidencia entre los 60 y los 70 años [84]. Además, pueden aparecer como tumores secundarios en tejidos previamente irradiados y, en casos excepcionales, en úlceras crónicas [260].

Se consideran tumores agresivos, con una tasa de mortalidad a 5 años del 65%, mostrando, en la mayor parte de casos, metástasis temprana en pulmón [260]. Esto está relacionado con la presencia de subpoblaciones de CSCs, que se ha descrito que muestran alteraciones en las rutas de señalización de Notch y Hedgehog [84].

Son muchos los estudios que han reforzado la idea de que el origen más probable de estos tumores son las MSCs y, de hecho, como veremos a continuación, en nuestro laboratorio se ha establecido un modelo celular de sarcoma pleomórfico indiferenciado a partir de

MSCs sometidas a un proceso de transformación tumoral mediante la introducción secuencial de eventos oncogénicos [261]. Además, también han sido reportadas varias translocaciones asociadas a este tipo de tumores que producen proteínas quiméricas que suelen involucrar PRDM10 [262]. Otras dianas asociadas con la sarcomagénesis en estas líneas incluyen p53 y Ptch1 [84].

2. 4. 2. 1. Generación del modelo de UPS

Como acabamos de mencionar, en esta Tesis Doctoral se incluye un modelo celular de sarcoma pleomórfico indiferenciado generado previamente en nuestro laboratorio [261]. Para la generación de este modelo se empleó una colección de BM-MSCs humanas, mutadas de forma secuencial con hasta cinco eventos oncogénicos, de forma que se estableció una colección de MSCs con un estatus tumorigénico que abarca desde las MSCs salvajes (sin mutaciones oncogénicas, MSC-0H) hasta MSCs completamente transformadas y capaces de generar UPS *in vivo* (MSC-5H) [263]. Los eventos oncogénicos introducidos incluyen la expresión ectópica de hTERT, la inactivación de p53 y/o Rb mediante la expresión de los antígenos E6 y E7 del virus HPV-16, la introducción del antígeno T pequeño del virus SV40 capaz de inactivar la fosfatasa PPA2 que provoca la estabilización de c-Myc y la expresión del oncogén H-RAS (**Tabla 3**). Cabe destacar, que la posterior introducción del gen de fusión FUS-CHOP en las MSCs con cuatro eventos oncogénicos (MSC-4H) causó la transformación tumoral completa de esta línea pre-transformada en un modelo de liposarcoma mixoide, capaz de formar tumores *in vivo* que recapitulan las características más importantes de los liposarcomas mixoides humanos [261].

Tabla 3. Colección de líneas MSCs generadas. Se muestran los eventos oncogénicos introducidos en bm-MSCs humanas.

bm-MSC	hit#1	diana	hit#2	diana	hit#3	diana	hit#4	diana	hit#5	diana
MSC-0H										
MSC-1H	shARN p53	depleción p53	HPV-16 E7	inactivación familia Rb						
MSC-3H	HPV-16 E6	degradación p53	HPV-16 E7	inactivación familia Rb	hTERT	telomerasa humana				
MSC-4H	HPV-16 E6	degradación p53	HPV-16 E7	inactivación familia Rb	hTERT	telomerasa humana	SV40-ST	estabilización c-Myc		
MSC-5H	HPV-16 E6	degradación p53	HPV-16 E7	inactivación familia Rb	hTERT	telomerasa humana	SV40-ST	estabilización c-Myc	RAS ^{V12}	señal mitogénica

Antecedentes

Además, a partir de los xenógrafos tumorales generados por estos modelos, se derivaron varias líneas celulares (T-5H-0, T-5H-GFP y T-5H-FC) que fueron capaces de generar tumores similares a los anteriores en una segunda ronda de inoculación en ratones inmunodeficientes. Estas líneas generaron tumores con una latencia menor que las correspondientes células de origen, demostrando así un incremento en la agresividad tumoral del modelo (**Tabla 4**).

Tabla 4. Características de la colección de MSCs humanas empleadas para generar el modelo de UPS.

LÍNEA MSC	MUTACIONES TRANSFORMANTES	ESTADO ONCOGÉNICO	TUMORES/RATÓN (PENETRANCIA)	LATENCIA [§]	ANÁLISIS HISTOLÓGICO
MSC-0H-GFP	-	tipo salvaje	0/4	-	
MSC-0H-FC	FC	no inmortalizadas	0/4	-	
MSC-1H-GFP	p53 ⁻	no inmortalizadas	0/4	-	
MSC-1H-FC	P53 ⁻ /FC ⁺	no inmortalizadas	0/4	-	
MSC-3H-GFP	P53 ⁻ /Rb ⁻ /hTERT ⁺	no transformadas/inmortalizadas	0/7	-	
MSC-3H-FC	P53 ⁻ /Rb ⁻ /hTERT ⁺ /FC ⁺	transformadas/inmortalizadas	0/7	-	
MSC-4H-GFP	P53 ⁻ /Rb ⁻ /hTERT ⁺ /c-Myc ⁺	transformadas/inmortalizadas	0/7	-	
MSC-4H-FC	P53 ⁻ /Rb ⁻ /hTERT ⁺ /c-Myc ⁺ /FC ⁺	transformadas/inmortalizadas	6/7	138±32	liposarcoma mixoide
T-4H-FC	P53 ⁻ /Rb ⁻ /hTERT ⁺ /c-Myc ⁺ /FC ⁺	línea tumoral derivada de xenógrafo	7/7	38±2	liposarcoma mixoide
MSC-5H-0	P53 ⁻ /Rb ⁻ /hTERT ⁺ /c-Myc ⁺ /RAS ^{v12}	transformadas/inmortalizadas	7/7	25±2	UPS
MSC-5H-GFP	P53 ⁻ /Rb ⁻ /hTERT ⁺ /c-Myc ⁺ /RAS ^{v12}	transformadas/inmortalizadas	7/7	25±2	UPS
MSC-5H-FC	P53 ⁻ /Rb ⁻ /hTERT ⁺ /c-Myc ⁺ /RAS ^{v12} /FC ⁺	transformadas/inmortalizadas	7/7	25±2	Liposarcoma mixoide+UPS
T-5H-0	P53 ⁻ /Rb ⁻ /hTERT ⁺ /c-Myc ⁺ /RAS ^{v12}	línea tumoral derivada de xenógrafo	7/7	15±2	UPS
T-5H-GFP	P53 ⁻ /Rb ⁻ /hTERT ⁺ /c-Myc ⁺ /RAS ^{v12}	línea tumoral derivada de xenógrafo	7/7	15±2	UPS
T-5H-FC	P53 ⁻ /Rb ⁻ /hTERT ⁺ /c-Myc ⁺ /RAS ^{v12} /FC ⁺	línea tumoral derivada de xenógrafo	7/7	15±2	liposarcoma mixoide

[§]media de los días (± SD) necesarios para observar un volumen tumoral aproximadamente de 1 cm³.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La principal hipótesis que relaciona la resistencia al tratamiento terapéutico en los tumores se basa en la existencia de subpoblaciones en las que reside la capacidad de mantener y propagar el tumor, las denominadas subpoblaciones de células madre tumorales (CSCs). Se sabe que, en algunos subtipos de sarcomas, como el osteosarcoma, el fenotipo CSC es mantenido por factores de pluripotencia tales como SOX2 y/o OCT4. Por ello estudiar su implicación en la iniciación y progresión de otros tipos de sarcoma resultaría de gran relevancia para poder desarrollar terapias dirigidas frente a estas subpoblaciones. Además de la importancia que tiene comprender mejor estos tumores y dirigirse a estas subpoblaciones responsables en muchos casos de recidivas y metástasis, para aquellos tumores más agresivos donde las terapias actuales no son efectivas, es igualmente necesario desarrollar estrategias de medicina de precisión basadas en el uso de modelos celulares y animales que compartan y reproduzcan las características del tumor del paciente para así poder identificar mutaciones específicas y testar fármacos dirigidos frente a ellas.

Basándonos en estas premisas, proponemos los siguientes objetivos:

- 1) Analizar el papel de SOX2 como posible marcador de CSCs en sarcomas y evaluar la eficacia de fármacos anti-tumorales dirigidos frente a estas subpoblaciones en un modelo de sarcoma pleomórfico indiferenciado y en líneas primarias de condrosarcoma.
- 2) Caracterizar las líneas primarias derivadas de sarcomas de pacientes y evaluar su utilidad como herramienta que permita conocer la deriva genética que sufren los cultivos celulares durante su crecimiento *in vitro* e *in vivo*.
- 3) Testar la capacidad anti-tumoral de inhibidores específicos frente a las mutaciones identificadas en las líneas primarias de sarcoma.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

1. Métodos de biología molecular

1.1. Análisis de ADN

1.1.1. Secuenciación Sanger

El ADN genómico tanto de tejido sano y tumoral, como de líneas celulares se extrajo utilizando el Kit QIAmp DNA Mini Kit (Ref: 51306, Qiagen) siguiendo las instrucciones del propio fabricante. Se amplificó por PCR empleando el kit Taq PCR Master Mix (2x) (Ref: E2520, EURx). Los fragmentos analizados incluyen: exón 4 de los genes IDH1 e IDH2, exón 20 del gen PI3KCA y los exones 4 y 6 del gen TP53. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando los cebadores directos e inversos detallados en la **Tabla 5**. Los diferentes productos de la PCR se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Ref: 50004, Lonza) al 1,5% mostrando una única banda. Las muestras fueron purificadas y secuenciadas por la empresa Macrogen (Seúl, Corea), así como por el servicio de secuenciación de la Universidad de Oviedo (Oviedo, España) y se alinearon con las secuencias de referencia de los genes utilizando el programa informático SnapGene® versión 4.2.11 (GSL Biotech, disponible en www.snapgene.com).

Tabla 5. Lista de oligonucleótidos empleados para la secuenciación de mutaciones por Sanger. En la tabla se muestran los genes analizados en este trabajo, con información referente a los fragmentos amplificados, así como la secuencia utilizada de cada cebador, tanto directo como reverso, en dirección 5´- 3´y la secuencia de referencia.

Gen	Exón	Codón	Cebadores		Secuencia de referencia
			Directo (5´- 3´)	Reverso (5´- 3´)	
IDH1	4	101 a 133	CACCAAATGGCACCATACGA	CAATTCATACCTTGCTTAATGGG	NM_001282387
IDH2	4	126 a 178	ATTCTGGTTGAAAGATGGCG	AAGTCTGTGGCCTTGTACTG	NM_002168
PIK3CA	20	997 a 1068	TATTCGACAGCATGCCAATC	CCTATGCAATCGGTCTTTGC	NM_006218
TP53	4	33 a 125	TGAGGACCTGGTCCTCTGAC	GATACGGCCAGGCATTGAAG	NM_001126114
	6	187 a 224	GCCTCTGATTCTCACTGAT	GCCACTGACAACCACCTTA	

1.1.2. Secuenciación de segunda generación

El ADN genómico tanto de tejido sano y tumoral, como de líneas celulares se extrajo utilizando el Kit QIAmp DNA Mini Kit (Ref: 51306, Qiagen) siguiendo las instrucciones del propio fabricante. Partiendo de 5 µg de ADN, se realizó la secuenciación de un panel de 160 genes humanos implicados en cáncer (Ref: DHS-3501Z, Qiagen) en colaboración con el Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España).

1.1.3. Secuenciación de exoma completo

La secuenciación de exoma completo (WES, por sus siglas en inglés, *Whole Exome Sequencing*) fue realizada por la empresa Macrogen (Seúl, Corea) a partir de 1 µg de ADN genómico de cada muestra. El ADN fue disgregado utilizando el ultrasonicador Covaris S2 y se utilizó para la construcción de una librería de secuenciación de doble sentido, como se describe en el protocolo de preparación de muestras para secuenciación de doble sentido proporcionado por Illumina. A continuación, se realizó el enriquecimiento de las secuencias exónicas para cada librería utilizando los kits SureSelect Human All Exon v6 (Ref: 5190-8863, Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones del propio fabricante. El ADN enriquecido en exones se extrajo mediante bolitas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Ref: 88816, Invitrogen), con sus correspondientes lavados, eluciones y ciclos adicionales de amplificación de la librería captada. Las librerías enriquecidas se secuenciaron (2 x 101 pb) en un secuenciador Illumina HiSeq4000. Los resultados se procesaron con el programa bioinformático HD Genome One (DREAMgenics, Oviedo) con certificado IVD/CE.

El proceso de análisis del exoma incluyó los siguientes pasos: 1. Control de calidad y alineación: los controles de calidad se realizaron con FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). La eliminación de bases de baja calidad, adaptadores y otras secuencias técnicas se realizó con Trimmomatic [264]. A continuación, se empleó BWA-mem para el alineamiento con el genoma humano de referencia (GRCh37/hg19), generando archivos BAM ordenados con SAMtools [265]. Por último, los duplicados ópticos y de PCR se eliminaron con Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>); 2. Identificación de variantes somáticas: para la

identificación de variantes de un solo nucleótido (SNV, por sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Variant*) y de inserciones-deleciones se empleó una variante del algoritmo Sidrón [266] cuyo rendimiento ha sido descrito previamente [264]. Las variantes somáticas se identificaron utilizando una serie de parámetros (profundidad de lectura total ≥ 15 , frecuencia de la variante $\geq 0,05$, calidad de las bases ≥ 20 y calidad del mapeo ≥ 30). Las mutaciones detectadas en las muestras tumorales se integraron en la muestra normal para definir el estado somático de cada variante; 3. Anotación de variantes: para la anotación de variantes se consultaron una serie de bases de datos, tales como bases de datos poblacionales (1000 Genomes, ESP, dbSNP, ExAC), información funcional (Ensembl, CCDS, RefSeq, Pfam), relacionada con la enfermedad (Clinvar), así como 1 score (GERP++) para la conservación evolutiva del nucleótido afectado [267]. Para estimar el impacto proteico de las mutaciones puntuales, se tuvieron en cuenta los algoritmos de predicción SIFT [265], PolyPhen2 [268], PROVEAN [268], Mutation Assessor [269], Mutation Taster [270], LTR [271], MetaLR, MetaSVM [272], FATHMM, FATHMM-MKL [266] y M-CAP [273]. Su puntuación predictiva se integró y normalizó en un único valor escalado (valor DG), que va de 0 (tolerado) a 5 (deletéreo); 4. Identificación de variaciones en el número de copias (CNV, por sus siglas en inglés, *Copy Number Variations*) y de pérdida de heterocigosidad (CN-LOH, por sus siglas en inglés, *Copy Neutral Loss Of Heterozygosity*): la detección de CNVs y CN-LOH se realizó empleando Exome2cnv, evaluando la profundidad de las lecturas y los cálculos de desequilibrio alélico. El algoritmo emplea un fondo de muestras agrupadas procesadas con el mismo protocolo de captura y tecnología de secuenciación [264, 266]; 5. Composición subclonal y evolución: la reconstrucción subclonal se realizó con PhyloWGS [274]. Para este análisis, se extrajeron las variantes somáticas de todas las muestras tumorales para así generar un grupo de mutaciones somáticas. Para evaluar correctamente su representación, sólo se consideraron las posiciones con cobertura ≥ 15 en todas las muestras. La evolución de la población se representó utilizando el paquete Fishplot para R [275].

Los conjuntos de datos generados durante el estudio están disponibles en el repositorio del Archivo Europeo de Nucleótidos, <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB31233>

1.1.4. Análisis del número de copias génicas

La amplificación de los genes en el ADN genómico se evaluó mediante PCR en tiempo real, de igual modo que se detallará más adelante. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando los siguientes cebadores: para el gen MDM2 5'-TGGCTGTTCAAGTGGTTC-3' (directo) y 5'-GTGGTGACAGGGTGCTCTAAC-3' (reverso), para el gen CDKN2A 5'-CACATTCGGGCATTTTC-3' (directo) y 5'-TGCTTGTCATGAAGTCGACAG-3' (reverso) (exón 3, que reconoce las secuencias p14^{ARF} y p16^{INK4}) y para el gen de referencia RPPH1 (componente H1 del ARN de la ribonucleasa P) 5'-GAGGGAAGCTCATCAGTGG-3' (directo) y 5'-ACATGGGTGAGTGACAG-3' (reverso). El análisis de la curva de disociación de todos los productos de la PCR mostró un único pico agudo y el número relativo de copias del gen se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ como veremos más adelante. Para cada conjunto de muestras se utilizó como calibrador el ADN del tejido sano correspondiente a cada paciente.

1.1.5. Array de metilación

El ADN genómico de las líneas celulares se extrajo utilizando el Kit QIAmp DNA Mini Kit (Ref: 51306, Qiagen) siguiendo las instrucciones del propio fabricante. El ADN genómico purificado se sometió a modificación de bisulfito utilizando el kit de conversión de metilación de ADN EX96 (Ref: D4303, Zymo Research) siguiendo el protocolo proporcionado por el propio fabricante. A continuación, se llevó a cabo el protocolo de ensayo de metilación de Illumina Infinium HD mediante la hibridación de las muestras de ADN con los BeadChips Infinium Methylation EPIC que permiten analizar el estado de metilación de más de 800,000 sitios CpG en el genoma humano.

1.1.6. Análisis diferencial de la metilación

Todos los análisis de los datos obtenidos del MethylationEPIC BeadChip array se realizaron utilizando el software estadístico R (v.4.0.2.). Los datos del array se pre-procesaron utilizando el paquete *minfi* [276] (v.1.32.0), de modo que todas las muestras pasaran el control de calidad tanto para las señales de intensidad metiladas como para las no metiladas. Las sondas se eliminaron utilizando los siguientes criterios: (a) p-valor de detección > 0,01 en al menos una muestra, (b) las localizadas en cromosomas sexuales, (c) las de reactividad cruzada o de mapeo múltiple [277, 278] y (d) las que incluyen

polimorfismos de nucleótido único (SNPs, por sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Polimorfism*) con frecuencia del alelo menos común (MAF, por sus siglas en inglés, *Minor Allele Frequency*) $\geq 0,01$ en sus sitios CpG o SBE (por sus siglas en inglés, *Single-Base Extension*) (dbSNP v.147). A continuación, se realizó una normalización en dos pasos utilizando el método ssNoob [279] de valores de intensidad *minfi* para eliminar ruido de fondo y el método *BMIQ* [280] implementado en *ChAMP* [281] (v.2.16.2.) para corregir los valores β debidos al diseño de la sonda. A continuación, se realizaron análisis de metilación diferencial a nivel de sonda utilizando modelos lineales implementados en el paquete *limma* [282] (v.3.44.3.). Los valores β fueron transformados en valores M utilizando el paquete *lumi* (v.2.40.0.) para lograr una mejor homocedasticidad en los modelos lineales [283]. Finalmente, las sondas diferencialmente metiladas (DMPs, por sus siglas en inglés, *Differentially Methylated Probes*) se definieron como aquellas CpGs con un ajuste Benjamini & Hochberg (FDR) con p-valor $< 0,05$ utilizando pruebas *t* empíricas moderadas por Bayes.

1.2. Análisis de ARN

1.2.1. Retrotranscripción

El ARN total se extrajo de los cultivos celulares utilizando el kit de purificación GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (Ref: E3598, EURx) siguiendo las instrucciones del propio fabricante. Para llevar a cabo las reacciones de retrotranscripción, partimos de 1 μg de ARN y, usando el Kit Maxima First Strand cDNA Synthesis para RT-qPCR (Ref: K1671, ThermoFisher), obtuvimos el ADN complementario (ADNc) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Después de 25 minutos de reacción, el ADNc obtenido se diluye 8 veces en agua estéril para su posterior uso en reacciones de PCR.

1.2.2. PCR a tiempo real (RT-qPCR)

Con el fin de describir el grado de expresión génica, se empleó la técnica de PCR a tiempo real. Partiendo de 2,5 μl de ADNc diluido 1:8, se añadieron 3,75 μl de oligos a una concentración 4,5 pmol, 18,75 μl de Power SYBR Green PCR Master Mix (Ref: 4309155, Applied Biosystems), que contiene Sybr Green, fluoróforo que se une al ADN de doble cadena, dNTPs con dUTPs y tampón de reacción de ADN polimerasa y 7,5 μl de agua estéril.

Se analizaron triplicados de todas las muestras. Como control endógeno, se utiliza la expresión del gen RPL19. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo StepOne Plus (Applied Biosystems) siguiendo las condiciones estándar: un primer paso de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C y 50 segundos a 60°C, 50 segundos a 72°C y un último paso de curva de disociación con 10 minutos a 72°C.

Para analizar los datos, se usó el programa informático StepOne Plus (Applied Biosystems) que procesa el nivel de fluorescencia emitida por nuestras muestras para así generar un ciclo umbral (CT, por sus siglas en inglés, *Cycle Threshold*) de cada muestra, siendo éste el ciclo en el cual se detecta un incremento de la fluorescencia por encima de la señal basal. La cuantificación del nivel de expresión relativo se realizó en tres pasos:

- 1) Cuantificación de ΔCT (muestra/calibrador) = CT gen problema – CT RPL19
- 2) Cálculo del $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ muestra - ΔCT calibrador, siendo el calibrador el control de la cinética, es decir, el valor con respecto al que queremos saber si nuestro gen problema tiene mayor o menor nivel de expresión.
- 3) Nivel de expresión del gen para cada muestra según: $2^{-\Delta\Delta CT}$

Para comprobar que se amplificó el ARN mensajero (ARNm) del gen de interés, se analizó la curva de disociación, apareciendo siempre un único pico de disociación.

La diferencia estadística en los niveles de expresión del gen se analizó utilizando la prueba *t* de *Student*.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en estos análisis se recogen en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Lista de oligonucleótidos empleados para la cuantificación de ARN en los ensayos de PCR a tiempo real. En la tabla se muestran los genes analizados en este trabajo, con información referente al nombre completo del gen y la secuencia de cada cebador, tanto directo como reverso, en dirección 5' - 3'.

Nombre completo	Gen	Cebadores	
		Directo (5' - 3')	Reverso (5' - 3')
Sex-determining region Y-Box2	SOX2	TCAGGAGTTGTCAAGGCAGAGAAG	CTCAGTCCTAGTCTTAAAGAGGCAGC
Sex-determining region Y-Box9	SOX9	CTCTGGAGACTTCTGAACG	AGATGTGCGTCTGCTC

Procedimientos experimentales

Bone Morphogenetic Protein 4	BMP4	AGCTTCACCACGAAGAACAT	AAGCCCCTTTCCAATCAGG
Aggrecan Core Protein	ACAN	CAGACCGTCAGATACCC	ATAGGTCCTGACCCCTG
Collagen Type II α-1 Chain	COL2A1	GATCGTGGTGAGACTGG	CTTGAGGACCCTGGATTC
Collagen Type X α-1 Chain	COL10A1		
Matrix Metalloproteinase 2	MMP2	TTCTGGAGATACAATGAGGTG	CTTGAAGAAGTAGCTGTGAC
Osteoblast-Specific Transcription Factor 2	RUNX2	AAGCTTGATGACTCTAAACC	TCTGTAATCTGACTCTGTCC
60S ribosomal protein L19	RPL19	AGCGAGCTCTTCTTTTCG	GAGCCTCTTCTGAAGCCTGA

1.3. Análisis de proteínas

1.3.1. Extracción de proteínas

Los precipitados celulares recogidos a partir de los cultivos se resuspendieron en tampón RIPA (por sus siglas en inglés, *Radioimmunoprecipitation Assay*) para la extracción de proteínas totales (150 mM de cloruro de sodio, 1% de Tritón X-100, 0,5% de sodio deoxicolato, 0,1% de SDS y 50 mM de Tris pH 8) suplementado en el momento de ser usado con el cóctel de inhibidores de proteasas Complete™ Mini (Ref: 11836153001, Roche) e inhibidores de fosfatasa-2 y -3 (Ref: P5726, Ref: 0044, Sigma-Aldrich) y se incubaron en hielo durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. Finalmente, la cantidad de proteína se cuantificó por colorimetría mediante un ensayo Bradford usando el reactivo Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Ref: 500-0006, Bio-Rad).

1.3.2. Electroforesis y transferencia a membrana de nitrocelulosa: Western blotting

Se prepararon geles compuestos de una zona analítica inferior al 10 o 12% de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (Ref: BP1408-1, ThermoFisher) y una zona superior de empaquetamiento de las proteínas al 4%. En esta parte superior se cargaron entre 20 y 30 μ g de extractos proteicos de cada muestra previamente diluidas con el tampón de carga

Laemmli Sample Buffer 6x e incubadas a 95°C durante 5 minutos. En una calle de cada uno de los geles se cargan 5 µl del marcador de peso molecular preteñido Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Ref: 161-0374, Bio-Rad). La electroforesis se realizó empleando el sistema mini-protean III (Ref: 1658004EDU, Bio-Rad) aplicando una intensidad de 20-25 mA durante, aproximadamente, 90 minutos.

Para transferir las proteínas se emplearon membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (Ref: 501594401, HealthCare-Amersham) utilizando un sistema de transferencia húmeda Mini-Trans Blot (Ref: 1660827EDU, Bio-Rad) con un tampón que contiene: Tris 48 mM, Glicina 39 mM, metanol al 20% (v/v) y SDS 0,05%. Se aplicó una intensidad de corriente de 100 V, en hielo, durante un tiempo variable, en función del peso molecular de las proteínas de interés, de entre 70 y 120 minutos, para la detección de proteínas de bajo y alto peso molecular, respectivamente. Para verificar la correcta transferencia proteica, las membranas se tiñeron con una solución de rojo Ponceau (Ref: P3504, Sigma) (0,5% p/v en ácido acético al 5%, v/v) y se lavaron varias veces con agua destilada para retirar el exceso de colorante.

1.3.3. Detección y revelado

Para detectar las proteínas, el primer paso es el bloqueo de la membrana de nitrocelulosa con el fin de evitar la aparición de señales inespecíficas. Para ello, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución salina tamponada con Tris (TBS) y Tween-20 (Ref: P7949, Sigma-Aldrich) (TBS-T) al 0,01% (v/v) y un 5% (v/v) de seroalbúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés, *Bovine Serum Albumin*) (Ref: 97061-422, VWR Chemicals) en agitación. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (**Tabla 7**) diluidos en la misma solución de bloqueo, pero en este caso con un 3% de BSA, durante toda la noche en agitación y a 4°C. Para su posterior uso, los anticuerpos primarios se conservaron a 4°C con azida sódica 1 mg/ml. Seguidamente, se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS-T al 0,01% (v/v) a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron los anticuerpos secundarios y se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios usados, unidos a marcadores de fluorescencia infrarroja, fueron IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H+L)

(Ref: 926-3221, LI-COR®) para anticuerpos primarios de conejo y IRDye 680RD Goat anti-Mouse IgG (H+L) (Ref: 926-68070, LI-COR®) para anticuerpos primarios de ratón. Finalmente se retiraron los anticuerpos secundarios y se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS-T al 0,01% (v/v) a temperatura ambiente.

El revelado de la membrana se realizó con un escáner Odyssey FC (LI-COR®) y la intensidad de la señal se cuantificó por medio del programa de análisis de imagen asociado a este escáner Image Studio (LI-COR®).

Tabla 7. Lista de anticuerpos primarios empleados para los ensayos de detección de proteínas mediante técnica Western-Blot. En la tabla se muestran los anticuerpos empleados en este trabajo para la realización de ensayos de Western Blot, con información referente a la dilución de uso, hospedador en el que fue generado, casa comercial donde fueron adquiridos y referencia.

Diana	Dilución	Hospedador	Casa comercial	Referencia
SOX2	1:1000	Conejo	ThermoFisher	PA1-094
SOX2	1:1000	Ratón	Sigma-Aldrich	AMAB91307
ALDH1A1	1:1000	Ratón	Abcam	ab105920
ALDH1A3	1:500	Conejo	Abgent	AP7847a
β -Actina	1:10000	Ratón	Sigma-Aldrich	A-5441

2. Cultivo celular

Todos los ensayos se llevaron a cabo en esterilidad trabajando en cabinas de seguridad biológica de clase I o II, empleando los equipos de protección individual (EPIs) requeridos.

2.1. Líneas celulares empleadas en este trabajo

Para este trabajo se emplearon distintas líneas celulares derivadas de tejido de muestras de sarcomas humanos, así como un modelo de Sarcoma Pleomórfico Indiferenciado (**Tabla 8**).

Las líneas primarias empleadas se obtuvieron a partir de muestras tumorales cedidas por el BIOBANCO del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), previo consentimiento informado debidamente firmado por el paciente. La muestra tumoral se disgregó de manera mecánica, con ayuda de pinzas y bisturí estériles, y enzimáticamente, utilizando el kit de disociación de tejidos MACS® Tissue Dissociation Kit (Ref: 130-095-929, Miltenyi

Biotech) y el sistema de disociación gentleMACS™ Dissociator (Ref: 130-093-235, Miltenyi Biotech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células sueltas obtenidas se plaquearon en frascos de cultivo y se realizaron cambios de medio cada dos días. Tras un periodo variable de tiempo, dependiendo del tipo tumoral, se observó crecimiento celular continuo, momento en el que se consideró que la línea celular primaria quedó establecida. La comparación de la identidad de las líneas celulares con la muestra original del paciente se realizó en la unidad de secuenciación de la Universidad de Oviedo (Oviedo, España) mediante el análisis de repeticiones cortas en tándem (STR, por sus siglas en inglés, *Short Tandem Repeats*) del ADN genómico correspondiente empleando, para ello, el kit de amplificación AmpFLSTR® Identifier® PCR Amplification Kit (Ref: 4322288, ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 8. Lista de líneas primarias derivadas de sarcomas utilizadas en este trabajo. En la tabla se muestra un listado de las líneas celulares que han sido empleadas en este estudio, indicando el origen anatómico del tumor y su diagnóstico histológico correspondiente.

Línea celular	Origen	Diagnóstico histológico
T-5H-0	-	Sarcoma Pleomórfico Indiferenciado
CDS06	pelvis	Condrosarcoma sobre osteocondroma
CDS11	fémur	Condrosarcoma grado II
CDS17	hemipelvis	Condrosarcoma desdiferenciado grado III con diferenciación osteosarcomatosa
T-CDS17#1, #3, #4	-	Condrosarcoma desdiferenciado
CDS20	-	Condrosarcoma mixoide extraesquelético
SW1353	húmero	Condrosarcoma grado II
L2975	n/d	Condrosarcoma desdiferenciado
SARC06	-	Sarcoma pleomórfico indiferenciado
SARC20	muslo	Sarcoma pleomórfico indiferenciado grado III
SYN01	-	Sarcoma sinovial
HEK293T	riñón embrionario	Células epiteliales embrionarias

La línea T-5H-0 utilizada en este trabajo, se obtuvo mediante la introducción de distintos eventos oncogénicos en células BM-MSCs [261], como hemos visto en el apartado 2.4.2.1. de antecedentes.

Además, la línea HEK 293T, obtenida a partir de la transformación de células de riñón embrionario humano, también ha sido utilizada en este trabajo para la transfección con partículas lentivirales.

2.2. Mantenimiento de los cultivos celulares

Las líneas celulares se cultivaron en monocapa adherente en frascos estériles de cultivo celular de distinto tamaño de superficie (Corning) con medio DMEM (1x) con rojo fenol 4,5 g/l de glucosa y 2 mM de L-glutamina (Ref: 10-017-CM, Corning) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS, por sus siglas en inglés, *Fetal Bovine Serum*) (Ref: 35-079-CV, Corning) inactivado previamente a 56°C durante 30 minutos, penicilina/estreptomicina (10.000 U/ml) en relación 1:100 (Ref: 15140122, Gibco) y glutaMAX (100x) (Ref: 35050038, Gibco) en relación 1:100 (nos referiremos a este medio como DMEM completo). Los cultivos se mantuvieron en incubadores estériles a 37°C con una atmósfera húmeda del 5% de CO₂.

Una vez las células alcanzaron una confluencia aproximada del 90%, se realiza el correspondiente pase, eliminando el medio de cultivo, lavando las células con tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés, *Phosphate Buffered Saline*) (Ref: 21-031-CM, Corning) e incubándolas entre 2 y 5 minutos a 37°C con Tripsina 0,25%/EDTA con rojo fenol (Ref: 25200-072, Corning). Una vez las células han perdido la adherencia con la superficie de cultivo, se añade medio con FBS para inactivar la tripsina y se centrifuga a 1300 r.p.m. a temperatura ambiente durante 3 minutos. El precipitado celular se resuspende con medio completo, se realiza el contaje mediante una cámara de Neubauer (Ref: 718605, BlauBrand) y se siembran en un nuevo frasco en la dilución correspondiente.

Se comprobó mensualmente la ausencia de contaminación por micoplasma en los cultivos mediante el kit de detección MycoAlert® Mycoplasma Detection (Ref: LT07, Lonza) siguiendo las instrucciones del propio fabricante.

2.3. Congelación y descongelación de líneas celulares

Para congelar las células se emplearon crioviales de 2 ml (Ref: 10418517, Corning), en los que se introdujeron las células resuspendidas en 1 ml de medio de congelación compuesto de medio DMEM completo y un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Ref: 13494279, ThermoFisher). Los viales se congelaron a -80°C en el interior de un recipiente con isopropanol para garantizar que la temperatura descendiera gradualmente. Tras 24 horas, los viales fueron almacenados en un tanque de nitrógeno líquido a -196°C.

Para la descongelación de células almacenadas en nitrógeno líquido, los viales se introdujeron en un baño a 37°C con una leve agitación y así descongelarlos rápidamente. Una vez descongelados, se trasvasaron a un tubo Falcon® de polipropileno de 15 ml (Ref: 188261, Greiner) con 5 ml de medio DMEM completo y se centrifugó a 1300 r.p.m. Se descartó el sobrenadante con el fin de eliminar los restos de DMSO contenidos y las células fueron resuspendidas en medio DMEM completo fresco y plaqueadas en la densidad deseada.

2.4. Cultivo de esferas clonales (tumorosferas)

Para favorecer el crecimiento clonal en suspensión de células con propiedades de CSCs (generación de tumorosferas), se empleó un medio DMEM Ham's F-12 (Ref: 11500586, Gibco) suplementado con penicilina/estreptomina 1:1000, glutaMAX 1:1000, EGF (Ref: 1150-04, GoldBio) y FGF básico (Ref: 1140-02, GoldBio), ambos a una concentración final de 1 µg/ml, suplemento de B27 sin vitamina A 50x (Ref: 12587-010, Gibco) 1:50 y heparina sódica 720 U/ml (Ref: H3149-10KU, Sigma) 1:1000. Cabe destacar la ausencia de FBS en el suplemento, lo que favorecerá la selección de subpoblaciones con capacidad de crecer en condiciones de estrés nutricional.

Para llevar a cabo estos cultivos de tumorosferas se usaron placas de 6 pocillos para cultivo adherente recubiertas de poli-2-hidroximetacrilato (Poli-Hema) (Ref: P3932, Sigma) para impedir la adherencia de las células a la superficie del plástico y favorecer así el crecimiento de células con capacidad de crecimiento clonal en suspensión. En cada pocillo, se añadieron 700 µl de una dilución 10 g/l de Poli-Hema en etanol al 95%, se dejaron secar a 56°C durante 2 días, de manera que el compuesto formase una película adherida al fondo de cada pocillo.

Las células fueron plaqueadas en una densidad de 1.500 células por pocillo. Dada la inestabilidad de los factores de crecimiento, cada tres días se suplementó el medio con EGF y bFGF frescos a una concentración final de 1 µg/ml. Dependiendo de la línea celular, el crecimiento de esferas clonales de un tamaño significativo (diámetro cercano o superior a 100 µm) se obtuvo tras 10-12 días.

2.5. Ensayos de diferenciación

Para la diferenciación condrocítica, se añadieron $2,5 \times 10^5$ células en tubos Falcon® de polipropileno de 15 ml (Ref: 188261, Greiner) y se centrifugaron a 1000 r.p.m. durante 3 minutos. El precipitado celular se cultivó en 500 ml de medio DMEM completo o de medio de diferenciación condrogénica StemPro (Ref: A1007101, Gibco) siguiendo, en este caso, las recomendaciones del fabricante. Para garantizar las condiciones de temperatura y humedad en el interior del incubador, los tubos Falcon® con las células no se cerraron completamente. Cada 3 días, el medio con o sin fármacos se retiró cuidadosamente para evitar la resuspensión de las células y se añadió medio fresco. Tras 21 días, el precipitado celular se lavó con PBS, se fijó a 4°C con formaldehído (Ref: 104002, Merck) al 4% y se embebió primero en HistoGel® (Ref: HG-4000-012, EpreDia) y en parafina después para poder realizar los estudios histológicos necesarios (ver más adelante).

2.6. Modificación de líneas celulares

2.6.1. Plásmidos

Todos los plásmidos empleados para la modificación genética de las líneas celulares descritas en esta Tesis Doctoral fueron diseñados para una transducción estable o transitoria mediante el uso o no de partículas lentivirales (**Tabla 9**).

2.6.2. Amplificación del plásmido

La amplificación de los plásmidos para obtener una concentración de ADN suficientemente alta para elaborar la modificación de las líneas celulares se realizó mediante la transformación de la cepa Stbl3 de *Escherichia coli* (Ref: C737303, Invitrogen).

El cultivo de estas bacterias se llevó a cabo en medio LB (Ref: L3022, Sigma-Aldrich) compuesto por Triptona 10 g/l, NaCl 5 g/l y extracto de levadura 5 g/l. En el caso de cultivos sólidos sobre placas Petri (Ref: 351029, Corning), se añadió 1,5% de agar (Ref: A-10752, Alfa Aesar) al medio de cultivo. En ambos casos, la preparación de LB fue previamente autoclavada a 120°C durante 40 minutos.

Tabla 9. Lista de plásmidos empleados en este trabajo. Se muestra el gen diana sobre la que cada plásmido tiene efecto y su referencia

Nombre	Diana	Casa comercial
Sore6-mCMVp-dsCopGFP-PURO	Detección de SOX2/OCT4	8522-MO1-663 (cedido por L.M. Wakefield, National Cancer Institute, Bethesda) [284]
mCMVp-dsCopGFP-PURO	Control	10279-M28-663 (cedido por L.M. Wakefield, National Cancer Institute, Bethesda) [284]
pLKO-1-puro-sh-RNA-SOX2 (TRCN0000085748)	Inhibición estable de SOX2	Dharmacon
pLKO-1-puro-sh-RNA-control	Control	Dharmacon
SOX2 On-Target plus siRNA (J-011778-05-002)	Inhibición transitoria de SOX2	Dharmacon
siGenome RiSC-Free control siRNA (D-001220-01)	Control	Dharmacon
pSin-EF2-SOX2-Puro	Sobreexpresión de SOX2	Cedido por María Vivanco (CIC bioGUNE, Derio) [285]
pSin-EF2-GFP-Puro	Control	Cedido por María Vivanco (CIC bioGUNE, Derio) [285]
Tet-pLKO-puro-SOX2	Inhibición de SOX2 inducible con Doxiciclina	Addgene

Como primer paso para la transformación, las bacterias fueron descongeladas durante 7 minutos en hielo, tiempo tras el cual se introdujo la cantidad de ADN necesaria (a partir de 10 pg) y se dejó incubar en hielo durante 30 minutos, para luego inducirles un choque térmico de 45 segundos a 42°C. Tras esto, se añadió 1 ml de LB fresco y se sembró, por agotamiento, en placas con LB - agar sólido a las que se les había añadido previamente el antibiótico de selección ampicilina a una concentración de 100 µg/ml. El objetivo de este paso es obtener, en el intervalo de 12 a 24 horas de incubación de las placas a 37°C, colonias de bacterias aisladas de manera que se garantice la selección de un único clon bacteriano que haya integrado el plásmido. De esta manera, la colonia aislada se incubó durante toda una noche en agitación y a 37°C en 5 ml de LB fresco con antibiótico.

2.6.3. Conservación del cultivo bacteriano

Con el fin de generar una batería de bacterias transformadas con el plásmido, una porción del cultivo amplificado se almacena. Para ello, aproximadamente, una cuarta parte se

separa del cultivo y se centrifuga durante 10 minutos a 1.300 r.p.m. El precipitado celular es resuspendido en 600 μ l de LB sin antibiótico y 600 μ l de glicerol (Ref: G7757, Sigma-Aldrich) al 50% previamente autoclavado y conservado en criotubos a -80°C .

2.6.4. Extracción del ADN amplificado

Para extraer el ADN plasmídico amplificado se utilizó el kit HiPure PureLink™ Midiprep (Ref: K210004, Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se cuantificó mediante la adquisición de la absorbancia en el sistema DeNovix DS-11.

2.6.5. Producción de partículas lentivirales

La modificación genética de las líneas celulares se llevó a cabo mediante el uso de vectores recombinantes introducidos por transducción lentiviral con un sistema de empaquetamiento viral de tercera generación. En este procedimiento, se cotransfectó la línea celular HEK-293T, caracterizada por tener una alta actividad catabólica, tanto con el plásmido vector lentiviral, como con los plásmidos que codifican las diferentes proteínas que componen la cápsula vírica. Los plásmidos víricos empleados fueron pLP1 (225 ng / pocillo), pLP2 (150 ng / pocillo) y VSV.G (210 ng / pocillo).

Las células HEK-293T se cultivaron en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 70%, momento en el que se retiró el medio DMEM completo y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en medio Opti-MEM™ (Ref: 11058021, Gibco). Para realizar la cotransfección, se generaron vesículas lipídicas con Lipofectamina™ 3000 (Ref: L3000008, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del propio fabricante.

Tras 6 horas de transfección, se cambió el medio por DMEM completo fresco. A las 48 horas de producción de virus, se recolectó este medio de cultivo y se eliminó cualquier resto de las células productoras mediante el centrifugado y el posterior filtrado del medio a través de un filtro con membrana de polietersulfona (PES) de $0,45\ \mu\text{m}$.

2.6.6. Transducción con partículas lentivirales

Para llevar a cabo todos los experimentos en los que se manipulan lentivirus activos se siguieron las normas de seguridad que se exigen para el trabajo con este tipo de agentes.

Las líneas celulares a transformar se sembraron en monocapa en placas de 6 pocillos y se crecieron hasta alcanzar una confluencia del 70%, momento en el que se añadió el medio anteriormente filtrado conteniendo las partículas víricas, cambiándose por medio DMEM completo fresco a las 24-48 horas post-infección.

Una vez finalizado el proceso de infección, la línea celular transformada fue amplificada en cultivo y se seleccionaron aquellas subpoblaciones que incorporaron el plásmido y, por tanto, expresen el gen marcador.

En este trabajo, las células fueron seleccionadas durante 48 horas en cultivo en base a su resistencia al antibiótico puromicina (Ref: A1113803, Gibco) en concentración variable. Para determinar la concentración óptima de puromicina, se realizaron curvas de muerte de cada línea celular. En este experimento dosis-respuesta, las células fueron sometidas a cantidades crecientes del antibiótico para así poder determinar la concentración mínima de antibiótico necesaria para matar todas las células en el transcurso de una semana.

Una vez finalizado el proceso de selección, las células se cultivaron en presencia de una concentración de puromicina de mantenimiento de 1 µg/ml.

En las líneas celulares infectadas con una secuencia de ARN inducible, los cultivos se trataron con 2 µg/ml de doxiciclina (Ref: D9891, Sigma-Aldrich).

2.6.7. Transfección transitoria

Para el silenciamiento transitorio de la expresión génica con plásmidos no recombinantes, es decir, plásmidos que permanecerán en el citoplasma celular expresándose de manera temporal, se empleó el método de lipofección con Lipofectamina™ 3000 (Invitrogen), anteriormente descrito, directamente sobre la línea celular a modificar, sin necesidad de generar partículas lentivirales en células HEK-293T.

3. Ensayos en cultivos celulares

3.1. Crecimiento celular independiente de anclaje: formación de colonias en agar blando

El crecimiento independiente de anclaje es una de las características de la transformación celular y es considerado como uno de los ensayos *in vitro* más apropiados para demostrar la transformación maligna. Para analizar esta propiedad realizamos un ensayo de formación de colonias en medio agar semisólido usando el kit Cytoselect™ Cell Transformation (Ref: CBA-135, Cell Biolabs). Los ensayos se realizaron en placas de 48 pocillos incluyendo triplicados de cada condición en cada experimento. En primer lugar, se preparó una capa de agar en la base del pocillo. Para ello calentamos el reactivo agar matriz (10X) a 90°C durante 30 minutos y lo mantuvimos a 37°C en un termobloque (Ref: MSC-100, Lan Technics) para evitar su solidificación. Por otro lado, calentamos medio DMEM (2x) con 20% de FBS a 37°C durante otros 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se mezclaron, para cada pocillo a ensayar, los siguientes reactivos en un volumen final de 100 µl: 50 µl DMEM (2x), 40 µl de agua destilada y 10 µl de agar matriz (10x). Esta mezcla se dejó solidificar a 4°C durante 30 minutos y después otros 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, preparamos, para cada pocillo, 150 µl de la siguiente mezcla que incluye la suspensión celular en agar semisólido: 70 µl DMEM (2x), 55 µl de diluyente, 15 µl agar matriz (10x) y 10 µl de suspensión celular con 9.000 células. La mezcla se homogeneizó y se añadió inmediatamente a la placa, que se dejó enfriar a 4°C durante 15 minutos para permitir la correcta solidificación antes de introducir las células en el incubador, donde se mantiene durante 10 días. Transcurrido ese tiempo, el número de colonias formadas se cuantificó utilizando un microscopio invertido (Leica) y se tomaron fotografías. Para analizar la capacidad de crecimiento en agar semisólido, recuperamos las colonias de los pocillos y las disgregamos utilizando el reactivo de disolución (1X) según las especificaciones del fabricante. Las células recuperadas se sembraron en placas de 24 pocillos en medio DMEM completo y, una vez adheridas al sustrato, se estudió su viabilidad mediante un ensayo WST-1 (como veremos en el apartado 3.4.1.).

3.2. Ensayos de toxicidad en esferas clonales

Las condiciones fundamentales para el establecimiento de estos cultivos se detallaron en el apartado 2.4. de procedimientos experimentales.

Sobre estos cultivos de tumoresferas ya formadas, se establecieron distintos tratamientos con el fin de determinar el efecto directo del compuesto sobre las subpoblaciones de CSCs. Para ello, en placas de 6 pocillos con esferas ya generadas, se añadió el tratamiento concentrado sobre el volumen de medio de cultivo CSC ya existente, hasta un máximo de 2 ml/pocillo, para así conseguir la concentración del tratamiento deseada. Los tratamientos se realizaron en tres pocillos con la finalidad de establecer triplicados técnicos. Tras la adición del fármaco, las placas fueron incubadas durante 96 horas, momento en el que se realizó el conteo del número total de esferas en cada pocillo empleando el microscopio invertido Leica DM IL. Además, se obtuvieron imágenes representativas de cada pocillo con la cámara acoplada en el microscopio Leica MC120 HD. A continuación, las esferas de cada pocillo fueron recogidas, centrifugadas y plaqueadas en placas de 24 pocillos no adherentes (Ref: 144530, Sigma-Aldrich) para así realizar un ensayo WST-1 (como veremos en el apartado 3.4.1.).

Tanto los valores de esferas contabilizadas, como los resultados de los ensayos WST-1, fueron procesados con el programa informático GraphPad Prism versión 8.0 (La Jolla).

3.3. Ensayos de invasión de esferas en matrices tridimensionales de colágeno

Para analizar el efecto de los diferentes agentes citotóxicos sobre la capacidad invasiva de las distintas líneas celulares, se llevaron a cabo cultivos tridimensionales de esferoides. Para ello, las células se resuspendieron en DMEM completo con 5% de metilcelulosa (Ref: M7027, Sigma-Aldrich) a una densidad de 80.000 células/ml. Para la formación de los esferoides, se depositaron cuidadosamente gotas de 25 μ l en la tapa de una placa Petri no adhesiva, de manera que los esferoides tuvieran una densidad de 1.000 células. Se incubaron en posición invertida durante 18 horas, con PBS sobre el fondo de la placa Petri para evitar, así, el secado de las gotas. Tras este tiempo, cada esferoide se transfirió individualmente a un pocillo de una placa de 96 pocillos, en el que previamente se habían añadido 70 μ l de una matriz compuesta por 3 mg/ml de colágeno bovino tipo I (Ref: 5005-

B, Advanced Biomatrix). Tras 2 horas a 37°C de polimerización del colágeno con el esferoide embebido, se añadieron 100 µl de medio DMEM completo con los distintos tratamientos, así como el control con medio DMEM completo y DMSO. En cada experimento se incluyeron, al menos, tres réplicas de cada condición experimental. El proceso de invasión iniciado en cada esferoide fue monitorizado utilizando un microscopio invertido de célula viva Zeiss Cell Observer Live Imaging Microscope acoplado a un sistema de incubación con CO₂ al 5%, temperatura de 37°C y condiciones de humedad. Las imágenes fueron adquiridas en intervalos de 15 minutos durante un tiempo total de 24 horas, utilizando la cámara acoplada en el propio equipo Zeiss AxioCam MRc camera. El área de invasión se determinó con el programa informático libre ImageJ, calculando la diferencia entre el área final del esferoide tras 24 horas y el área inicial a tiempo 0 horas, utilizando el programa informático libre ImageJ. El área de invasión en cada condición fue normalizada con respecto al área de las células control.

3.4. Ensayos de viabilidad celular

3.4.1. WST-1

Para este ensayo se emplea el reactivo de proliferación celular WST-1 (Ref: 5015944001, Roche). Se trata de un ensayo colorimétrico basado en cuantificar la proliferación celular en base a la actividad metabólica de un cultivo, más específicamente a la producción de NAD(P)H. De esta manera, un cultivo celular expuesto a este reactivo mostrará un viraje en el color del medio de cultivo proporcional a la actividad metabólica del mismo.

El análisis WST-1 se realizó sobre placas de cultivo de 96 pocillos. Para ello, las células se plaquean en placas de 24 pocillos en una densidad de 15.000 células/pocillo. Una vez las células se hayan adherido a la superficie del plástico, se testaron un intervalo de hasta 10 concentraciones diferentes del tratamiento, además de un control al que se añadió DMSO en un volumen similar al introducido con la concentración intermedia de tratamiento. Cada una de las concentraciones se añadió en dos pocillos, a modo de duplicados técnicos y en un total de tres placas independientes, a modo de triplicados experimentales. Una vez añadido el tratamiento, las placas se incubaron durante 72 horas. Pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 200 µl de medio DMEM completo con una concentración de 18 µl/ml de reactivo WST-1. El cultivo se mantuvo en incubación entre 30

y 45 minutos (según la actividad metabólica de cada línea celular) para su posterior cuantificación mediante la adquisición de la absorbancia a 444 nm en el lector de placas Synergy™ HT de BioTek del sobrenadante trasvasado a placas de 96 pocillos.

La mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC_{50}) de la viabilidad celular para cada tratamiento se determinó mediante regresión no lineal utilizando el programa informático GraphPad Prism v8.

3.4.2. Capacidad de formación de colonias

En este ensayo, se establece un cultivo de células espacialmente aisladas sobre las que se evalúa el efecto del fármaco, observando la capacidad de generación de colonias aisladas de las diferentes líneas celulares. Para ello, se plaquearon 5.000 células resuspendidas en 6 ml de medio DMEM completo sobre placas de cultivo celular de 100 mm de diámetro (Ref: 10075371, Corning). Las placas se dejaron en incubación 12 horas, hasta conseguir que las células se adhiriesen a la superficie del plástico, pero sin haber empezado la división celular. A continuación, se añadió 1 ml de medio DMEM completo con el tratamiento (incluyendo un control con DMSO) 7 veces más concentrado con respecto a la concentración final deseada. Tras 24 horas de incubación, el medio con el tratamiento fue sustituido por medio DMEM completo fresco para, posteriormente, dejar las placas en incubación hasta observar la formación de colonias visibles al microscopio. El periodo necesario para la obtención de colonias fácilmente medibles varía según la capacidad proliferativa de cada línea celular, tomando de media unos 10 días.

Una vez desarrolladas las colonias aisladas, se retiró el medio DMEM y se realizaron tres lavados con 5 ml de PBS enfriado a 4°C. Las colonias fueron fijadas durante 10 minutos con 5 ml de metanol previamente enfriado a -20°C y teñidas a temperatura ambiente con cristal violeta al 0,5% (Ref: C0775, Sigma-Aldrich) durante 10 minutos. Tras este periodo, el colorante fue retirado y las placas fueron lavadas con agua destilada. De esta manera, las colonias aisladas se tiñeron con el cristal violeta y, tras secar durante 24 horas a temperatura ambiente, se pudieron fotografiar para, posteriormente, realizar el conteo para cada tratamiento.

3.5. Citometría de flujo y separación celular

Para detectar células con alta actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) se empleó el reactivo Aldefluor™ (Ref: #01700, StemCell), un sustrato para ADLH1, fluorescente no tóxico, capaz de difundir libremente en células intactas y viables. Se suspendieron 1×10^6 células en 1 ml del tampón proporcionado en el kit que contenía el sustrato de ALDH1 (Bodipy-Aminoacetaldehído Dietil Acetal) y se incubaron durante 45 minutos a 37°C. Como control de referencia, las células se suspendieron en tampón que contenía el sustrato en presencia de DietilAminoBenzaldehído (DEAB), un inhibidor específico de la enzima ALDH1. En la adquisición de las células por citometría de flujo, se establecieron *gates* para incluir menos del 1% de células positivas en los controles de DEAB de la condición que mostraba menos actividad ALDEFLUOR y se mantuvieron en todas las condiciones. Las células se incubaron con 0,5 µg/ml de yoduro de propidio (Ref: P4170, Sigma-Aldrich) durante 15 minutos y las células positivas a esta tinción (células muertas) se excluyeron del análisis. Las células que expresaron ALDH1 se detectaron utilizando el canal de fluorescencia verde (520-540 nm) con el citómetro de flujo MoFlo XDP (Beckman Coulter).

Para detectar y aislar células con expresión de SORE6 en cultivos no tratados o después de los diferentes tratamientos farmacológicos, se empleó el citómetro de flujo BD FACS Aria II (BD Bioscience). Las células transducidas con el lentivirus minCMVp-GFP se utilizaron como control negativo de SORE6 a la hora de establecer el *gating*. Las células muertas se excluyeron mediante la tinción con yoduro de propidio 0,5 µg/ml. Para analizar la inducción de la apoptosis en las subpoblaciones SORE6 + y SORE6 -, inmediatamente después del tratamiento, se cuantificó la actividad de la caspasa-3 en células no fijadas utilizando el kit BD Phamingen™ PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit (Ref: 550914, BD Biosciences), siguiendo las instrucciones del propio fabricante. De esta manera, se pudo detectar simultáneamente el nivel de fluorescencia GFP (SORE6) y PE (Caspasa-3) mediante citometría de flujo.

La expresión de SOX2 y OCT4 se detectó por citometría de flujo en células fijadas con etanol al 70% utilizando los anticuerpos anti-SOX2 (Ref: PA1-094, ThermoFisher, dilución 1:1000) y anti-OCT4 (Ref: ab19857, Abcam).

3.6. Medición de los niveles de D-2-HG

Para determinar los niveles del oncometabolito D-2-Hidroxi-glutarato, 1×10^7 células fueron tratadas durante 48 horas con el inhibidor Enasidenib a distintas concentraciones. Tras este tiempo, las células fueron recolectadas y los niveles de D-2-HG cuantificados empleando el kit D-2-HG assay colorimetric kit (Ref: ab211070, Abcam) siguiendo las instrucciones del propio fabricante.

3.7. Daño a nivel genómico: inmunofluorescencia

El daño genómico acumulado en las células tras el tratamiento se analizó mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra la histona γ H2Ax (Ser139) clon JBW301 (Ref: 05-636, Sigma), la cual se une a las roturas de doble cadena en el ADN. Para ello, se incubaron y trataron las líneas celulares en placas de cultivo de 6 pocillos sobre los que previamente se habían colocado cubreobjetos de 24x24 mm (Ref: 0101062, Marienfeld) en el fondo del pocillo, de manera que las células crecieran sobre ellos. Tras finalizar el tratamiento, los cubreobjetos fueron cuidadosamente lavados tres veces con PBS para, posteriormente, proceder a la fijación de las células con formaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los cubreobjetos con las células fijadas fueron lavados durante 5 minutos dos veces con PBS y permeabilizados con una solución de PBS al 0,1% de Triton X-100 (Ref: 93443, Sigma-Aldrich) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras realizar tres lavados con PBS, las células fueron bloqueadas con una solución de PBS al 0,05% de Tween-20 (PBS-T) y 5% de BSA durante 30 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Una vez realizado el bloqueo, los cubreobjetos se incubaron con una dilución 1:500 en PBS-T del anticuerpo contra la histona γ H2Ax durante 24 horas, de manera estática, a una temperatura de 4°C y en condiciones de humedad. Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados con PBS-T y los cubreobjetos se incubaron con una dilución 1:1000 del anticuerpo fluorescente secundario contra anticuerpo de ratón marcado con el fluoróforo Alexa Fluor

555 (Ref: A-21422, Invitrogen), en condiciones de humedad y oscuridad, a temperatura ambiente, durante 1 hora. El anticuerpo secundario se lavó tres veces con PBS-T en oscuridad y agitación a temperatura ambiente y los cubreobjetos fueron, finalmente, colocados sobre portaobjetos de 76x26 mm (Ref: 1053057, LineaLAB) empleando el medio de montaje líquido que contiene el colorante DAPI (diamidino-2-fenilindol) ProLong™ (Ref: P36930, Invitrogen) para el marcaje de los núcleos celulares. Finalmente, se obtuvieron imágenes de las muestras fluorescentes empleando el mismo tiempo de exposición en cada condición, utilizando el microscopio Zeiss-Apotome Cell Observer Live Imaging Microscope (Zeiss) acoplado a una cámara Zeiss Axio-Cam MRc camera. Se realizaron fotografías de, al menos, 150 células por condición. Los resultados de la cuantificación fueron analizados con el programa informático GraphPad Prism v8.

3.8. Fármacos e inhibidores empleados en los cultivos celulares

En la **Tabla 10** se recogen los fármacos e inhibidores utilizados en los diferentes ensayos realizados sobre cultivos celulares en esta Tesis Doctoral.

Tabla 10. Listado de fármacos e inhibidores empleados en este trabajo. Se muestra el nombre del compuesto, su diana específica y sus referencias comerciales

Fármaco/ Inhibidor	Diana	Referencia	Casa comercial
Trabectedina	ARN polimerasa II	ET-743	PharmaMar
Doxorrubicina	Topoisomerasa II	D1515	Sigma
Paclitaxel	Microtúbulos	S1150	Selleckchem
EC-8042	SP-1	Entrechem, S.L.	Entrechem, S.L.
PF-573228	FAK	S2013	Selleckchem
Dasatinib	Abl, Src, c-Kit	S1021	Selleckchem
Enasidenib AG-221	IDH2	S8205	Selleckchem
Ivosidenib AG-120	IDH1	S8206	Selleckchem
Vorasidenib AG-881	IDH1/IDH2	S8611	Selleckchem
Metformina HCl	AMPK	S1950	Selleckchem
CB-839	glutaminasa	S7655	Selleckchem

4. Ensayos de crecimiento tumoral *in vivo*

Todos los protocolos experimentales sobre modelos animales se han realizado de acuerdo con las directrices institucionales de la Universidad de Oviedo, siendo aprobadas previamente por el Comité de Ética en la Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo.

Con respecto a las muestras de tejido derivadas de pacientes oncológicos y a sus datos clínicos, fueron cedidos por el Biobanco del Principado de Asturias (PT17/0015/0023), integrado en la red nacional de Biobancos española, siendo procesadas según los procedimientos debidamente aceptados por los comités éticos y científicos correspondientes. Además, todas las muestras de tejido fueron obtenidas previo consentimiento informado del paciente.

4.1. Establecimiento de xenógrafos tumorales

Los modelos animales empleados en los diferentes procedimientos desarrollados en este trabajo fueron ratones hembra de 6 semanas de edad NOD/SCID (Janvier Labs) y Hsd:AthymicNude-Foxn1nu (Envigo). Todos los ratones fueron mantenidos bajo condiciones libres de patógenos, alimentados en condiciones *ad libitum*, en las instalaciones del Bioterio de la Universidad de Oviedo de acuerdo con la normativa vigente.

Previamente a su inoculación, en las líneas celulares empleadas se realizaron distintos análisis biológicos por un laboratorio externo, para descartar la presencia de distintos tipos de contaminación, tanto vírica como bacteriana.

Las diferentes líneas celulares fueron inoculadas por vía subcutánea (s.c., por sus siglas en inglés, *subcutaneously*) en ambos flancos del ratón (derecho e izquierdo). Para ello, las células fueron embebidas en una solución de Matrigel® (Ref: 354248, Corning) para evitar la dispersión celular y favorecer el implante del xenógrafo. La solución de matrigel se almacena diluida ½ en medio DMEM a -20°C y se descongela en hielo a 4°C durante una noche previamente a su utilización. Una vez descongelado, es diluido, de nuevo, ½ con medio DMEM completo conteniendo las células. Para evitar su polimerización, las muestras

se mantuvieron en hielo hasta el momento de la inoculación. En cada flanco, se inocularon 100 µl de la solución de matrigel conteniendo 5×10^5 células.

El crecimiento del tumor se monitorizó tomando medidas con un calibre cada dos días. El volumen tumoral se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$V_t = \frac{D \times d^2}{6} \times 3,14$$

Donde “D” es el diámetro máximo del tumor y “d” el diámetro mínimo del mismo.

En los ensayos LDA los animales fueron sacrificados 4 semanas después de la inoculación de las células. En estos experimentos, la frecuencia relativa de células iniciadoras de tumores (TIF, por sus siglas en inglés, *Tumor-Initiating cell Frequency*) se calculó utilizando el programa informático ELDA.

Para la inoculación ortotópica (i.b., por sus siglas en inglés, *intrabone*) de las líneas celulares en la tibia del ratón, se anestesiaron a los animales mediante anestesia inhalatoria con isoflurano (Zoetis). Una vez anestesiados, se realizó una pequeña incisión en la piel que recubre la tibia y se dobló la pata en un ángulo de 90° con el fin de exponer al exterior la zona a inocular. Con la ayuda de una aguja de un diámetro de 25G (Ref: 300600, Becton Dickinson) se realizó una pequeña perforación previa en el hueso para, posteriormente, inocular las células (2×10^5 células en 5 µl de medio de cultivo por ratón) usando una jeringa Hamilton® con aguja de un diámetro de 27G (Ref: 80300, Hamilton). Una vez introducidas las células, se retiró cuidadosamente la jeringa e, inmediatamente, se obturó la zona con pegamento tisular Cicastick®, colocando la piel retirada para cubrir la incisión. Los ratones fueron tratados con buprenorfina 0,1 mg/kg intraperitonealmente (i.p.) justo después de la inoculación, así como a las 24 y 48 horas.

En estos experimentos, el crecimiento del tumor se evaluó en el laboratorio de imagen preclínica de la Universidad de Oviedo utilizando un sistema de tomografía computarizada en la semana 8 tras la inoculación celular, así como un sistema µCT tras el sacrificio de los animales en la semana 12 (ver en apartado 4.3.).

4.2. Tratamiento de xenógrafos tumorales

Una vez el tamaño del tumor alcanzó un volumen máximo de 100-200 mm³, los ratones fueron asignados aleatoriamente en los distintos grupos (control y tratamientos) y se inició la administración del fármaco.

En el caso de los agentes citostáticos, estos fueron administrados por vía intravenosa (i.v.) a través de la vena lateral de la cola del animal de la siguiente manera: vehículo (suero salino, cada 7 días hasta un total de 3 dosis), EC-8042 (18 mg/kg, cada 3-4 días hasta un total de 5 dosis), trabectedina (0,15 mg/kg, cada 7 días hasta un total de 3 dosis), doxorubicina (4 mg/kg, cada 7 días hasta un total de 3 dosis) y paclitaxel (20 mg/kg, cada 7 días hasta un total de 3 dosis). En los animales en los que se inoculó la línea celular transformada con un plásmido inducible, se administró, además, una dosis diaria de doxiciclina (50 mg/kg) i.p.

En el caso del inhibidor Enasidenib (Ref: HY-18690, MedChem), éste se administró de manera oral (diariamente, dos dosis al día de 35 mg/kg, durante 21 días) en una solución de agua destilada al 0,5% de metilcelulosa (Sigma-Aldrich) y 0,2% de Tween-80 (Ref: P8074, Sigma-Aldrich) y empleando la solución vehículo (0,5% de metilcelulosa y 0,2% de Tween-80 en agua destilada) en los grupos control.

Diariamente, se observó la evolución de los animales realizando pesajes de estos. Así mismo, se monitorizó el crecimiento del tumor tomando medidas del volumen tumoral con un calibre. Una vez los tumores de los grupos control alcanzaron los 1.000 mm³, o se observó una pérdida de peso significativa en los animales, se finalizó el experimento, procediendo a su eutanasia mediante dislocación cervical. Posteriormente, los tumores fueron extraídos quirúrgicamente, pesados y medidos con el calibre, como se explicó anteriormente. Se promediaron los volúmenes tumorales de todos los animales de cada grupo para así obtener el volumen tumoral medio de cada grupo correspondiente y poder analizar la posible existencia de significación estadística mediante la prueba t de *Student*. La eficacia del tratamiento se expresó como el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% TGI, por sus siglas en inglés, *Tumor Growth Inhibition*) mediante la ecuación:

$$\% TGI = 100 - \left(\frac{T}{C}\right) \times 100$$

Donde “T” es el volumen relativo del tumor (RTV, por sus siglas en inglés, *Relative Tumor Volume*) tratado, calculado mediante la diferencia entre el volumen del tumor al inicio del tratamiento y el volumen del tumor al final de este y “C” es el RTV medio del grupo control.

Al finalizar el experimento, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los tumores se extrajeron, se fijaron en formaldehído al 4% y se procesaron para análisis histológicos (como veremos en el apartado 5.1.).

En aquellos tumores en los que se determinó el efecto de los fármacos sobre la actividad SORE6, los tumores frescos se disociaron en células individuales utilizando el kit de disociación de tejidos MACS® Tissue Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) y el sistema de disociación gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante y las subpoblaciones SORE6 positivas fueron cuantificadas por citometría de flujo.

4.3. Tomografía computarizada

En los experimentos de inoculación ortotópica, el crecimiento del tumor se evaluó en el laboratorio de Imagen Preclínica de la Universidad de Oviedo. En la semana 8 tras la inoculación de las células, los animales fueron analizados en un sistema de Tomografía Computarizada (CT, por sus siglas en inglés, *Computerized Tomography*) ADAC Argus SPECT/CT (Philips) con un voltaje de rayos X de 45 kV y una corriente de 300 µA. Las imágenes adquiridas se reconstruyeron utilizando Horos, un programa de código abierto y gratuito (FOSS, por sus siglas en inglés, *Free and Open Source Software*) que se distribuye gratuitamente bajo la Licencia Pública General Reducida (LGPL, por sus siglas en inglés, *Lesser General Public License*) en Horosproject.org y está patrocinado por Nimble Co LLC d/b/a Purview in Annapolis, MD.

Además, se analizaron muestras fijadas en formol al 4% correspondientes a las tibias de los animales sacrificados en la semana 12 post inoculación, con el sistema µCT SKYSCAN 1174 (Bruker) empleando un voltaje de rayos X de 50 kV y una corriente de 850 µA. La rotación angular del escaneo fue de 180°, el incremento angular de 0,3° y la resolución del pixel

volumétrico de 11,8 μm . Los conjuntos de datos se reconstruyeron con el programa informático NRecon (proporcionado por el propio fabricante del equipo μCT) y se segmentaron en imágenes binarias. Las reconstrucciones de superficie en 3D se realizaron con los programas informáticos CTAn, CTvox y CTvol (proporcionados por el propio fabricante del equipo μCT).

5. Análisis histopatológico

5.1. Procesamiento de las muestras

5.1.1. Inclusión en parafina

Las muestras frescas de tejido tumoral fueron, rápidamente, fijadas en formol tamponado al 10% durante 2 horas por cada cm^3 . En el caso de las muestras con tejido óseo, se descalcificaron usando soluciones de ácido nítrico al 10% o ácido fórmico al 4%/ácido clorhídrico al 4%. Posteriormente, fueron embebidas en parafina, proceso que conlleva la introducción de las muestras en cápsulas histológicas debidamente identificadas y que, colocadas en el interior de cestillos histológicos, son deshidratadas a través de un gradiente de concentraciones crecientes de etanol (desde el 50% al 100%). A continuación, la muestra deshidratada se extrae de la cápsula histológica y se coloca en un molde metálico que es rellenado de parafina líquida a 56°C. El bloque de parafina generado se deja enfriar durante 10 minutos a 4°C para así endurecerlo.

5.1.2. Microdissección

Previamente a realizar el corte, el bloque de parafina se mantuvo enfriando a -20°C durante 10 minutos para así favorecer su microdissección. A continuación, se colocó en el portabloques del microtomo y se realizaron múltiples cortes a 3-4 μm de grosor. Los cortes se depositaron en un baño de flotación con agua a 50°C donde, gracias a las fuerzas de tensión superficial que se generan en la lámina de parafina, se eliminan posibles pliegues en el corte. Éstos fueron, entonces, recogidos en un portaobjetos y se dejaron secar a 37°C hasta conseguir su completa adhesión al cristal.

5.1.3. Desparafinado y rehidratación

Una vez fijadas las muestras al portaobjetos, éstos se introdujeron en xilol durante 30 minutos para eliminar completamente la parafina. Luego, los cortes pasaron a través de un gradiente de concentraciones decrecientes de etanol (desde el 100% al 50%) hasta el agua destilada, para rehidratar la muestra.

5.1.4. Tinción

Una parte de las secciones obtenidas fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina (Hx-E). La hematoxilina tiende a unirse a estructuras ácidas, como el núcleo celular, dándole un tono azulado/morado. Por el contrario, la eosina tiende a unirse a estructuras más básicas, como el citoplasma celular, tiñéndolo de un tono rosáceo. Para llevar a cabo la tinción, los cortes debidamente desparafinados y rehidratados, se sumergieron en hematoxilina de Harris (Ref: 15938, Merck) durante 1 o 2 minutos y se lavó con agua corriente. Una vez eliminado el exceso de colorante, los cortes se sumergieron en una solución de carbonato de litio (Ref: 1369000, Merck) hasta conseguir el viraje a azul y se lavó en agua corriente, mínimo, 10 minutos. A continuación, se dieron 4 o 5 pases en una solución de agua acética y se lavaron rápidamente en agua destilada. Se sumergieron el tiempo necesario en función del tejido en eosina (Ref: 15935, Merck), se lavaron en agua corriente y, finalmente, se deshidrataron los cortes y se colocó un cubreobjetos de 50x24 mm (Ref: 0101222, Marienfeld) sobre el cristal utilizando Entellan™ (Ref: 107960, Sigma-Aldrich).

Otras secciones de tejido obtenidas fueron teñidas con PAS-azul alcian, para detectar polisacáridos, tanto glucógeno como mucopolisacáridos, así como cartílago. Los polisacáridos se teñirán de un tono rosa intenso/fucsia y los mucopolisacáridos ácidos se teñirán de un tono azul. Para ello, los cortes debidamente desparafinados y rehidratados, se sumergieron en una solución de azul alcian 8G (Ref: J60122-14, ThermoFisher) a pH 2,5 durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavaron con agua corriente durante 5 minutos y se trasladaron a una solución de ácido peryódico (Ref: 11994101, ThermoFisher) al 1% durante 10 minutos. Se volvieron a lavar con agua corriente durante 5 minutos y se colocaron en una solución de fucsina básica (reactivo Schiff de Coleman) durante 5 minutos. Los restos del reactivo se lavaron con agua tibia durante 10 minutos y, por último,

se tiñeron los núcleos con hematoxilina de Mayer (Ref: 72804, Epredia™) durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se deshidrataron pasándolas a través de concentraciones crecientes de alcohol (de 70% a 95%) hasta finalizar en xilol. Finalmente, se colocó un cubreobjetos de 50x24 mm (Marienfeld) sobre el cristal utilizando Entellan™ (Sigma-Aldrich) como medio de montaje, se dejaron secar y se analizaron en un microscopio óptico.

5.2. Matriz de tejidos de pacientes

Las matrices de tejido (TMA, por sus siglas en inglés, *Tissue MicroArray*) fueron elaboradas previa obtención del consentimiento informado de los pacientes. Patólogos del HUCA evaluaron el grado del tumor en las preparaciones teñidas con Hx-E utilizando el sistema de clasificación en tres grados de la Federación Francesa de Centros Oncológicos Integrales. Este sistema parte de la puntuación acumulativa en histologías neoplásicas en base a tres factores: el nivel de diferenciación tumoral (de 1 a 3 de mayor a menos grado de diferenciación); la presencia de necrosis (siendo 0 ausencia de necrosis, 1 menos de un 50% de necrosis en el tejido y 2 más de un 50% de necrosis en el tejido); y el contaje mitótico (siendo 1 de 0 a 9 células mitóticas contabilizadas en un campo de alta potencia (HPF, por sus siglas en inglés, *High Power Field*) a un aumento 40x); 2 de 10 a 19 mitosis o 3 si hay más de 20 mitosis). Así, una puntuación de 2 a 3 equivale a un grado I, de 4-5 a un grado II y de 6-8 a un grado III.

Tras el análisis histopatológico se seleccionaron las áreas tumorales de interés de un total de 90 muestras. En un bloque en blanco de parafina, se fueron realizando una serie de huecos o cilindros recibidores, en los que posteriormente se fueron introduciendo los cilindros donadores obtenidos de las distintas áreas tumorales de interés seleccionadas en las muestras de parafina de los pacientes. Una vez el bloque de parafina recibidor está completo, se procede al corte del TMA en el microtomo. Sobre estos cortes se realizó el análisis inmunohistoquímico de la expresión de SOX2 y OCT4 (ver en apartado 5.3.) y que fue analizada por dos patólogos independientes.

El análisis estadístico de los resultados fue realizado con el programa informático SPSS® versión 24 (IBM corp.). La significancia estadística de la comparación entre los diferentes

grupos experimentales se obtuvo empleando el test X^2 (con la corrección de Yates cuando fuese apropiado). Las curvas de supervivencia se calcularon mediante la estimación del límite de producto de Kaplan-Meier. Las diferencias entre los tiempos de supervivencia se analizaron mediante el método de rangos logarítmicos (*log-rank*) y el ratio *Hazard* fue calculado con el análisis de regresión de *Cox* univariante. Todos los análisis estadísticos fueron de dos colas y el umbral crítico de significancia para los *p*-valores fue inferior a 0,05.

5.3. Inmunodetección

La expresión de diferentes dianas en las secciones de tejido tumoral extraídas tanto de modelos animales como de histologías de pacientes se puede analizar mediante el marcaje inmunohistoquímico. De esta manera, es posible marcar zonas en las que se encuentran proteínas específicas incubando las secciones de tejido con anticuerpo primarios frente a éstas, que, posteriormente, se unirán a anticuerpos secundarios marcados con la enzima peroxidasa, capaz de procesar la diaminobencidina (DAB) adquiriendo un color marrón. En la **Tabla 11** se muestran los anticuerpos primarios empleados para el marcaje inmunohistoquímico de dianas concretas.

El proceso para realizar este marcaje se llevó a cabo utilizando la plataforma automática de teñido Dako Autostainer Link 48 (Agilent), siguiendo las instrucciones del propio fabricante.

Tabla 11. Lista de anticuerpos primarios empleados para los ensayos de detección de proteínas mediante técnica de inmunohistoquímica. En la tabla se muestran los anticuerpos empleados en este trabajo para la realización de ensayos de IHQ, con información referente a la dilución de uso, hospedador en el que fue generado, casa comercial donde fueron adquiridos y referencia.

Diana	Dilución	Hospedador	Casa comercial	Referencia
SOX2	1:3000	Conejo	Merck Millipore	AB5603
OCT4	1:2000	Conejo	Abcam	ab19857
Ki-67	listo-para-usar	Ratón	Dako	GA-626

RESULTADOS

CAPÍTULO I

Identificación de subpoblaciones de células madre tumorales en sarcomas mediante el análisis de la expresión y la actividad transcripcional de SOX2 y evaluación de la eficacia de fármacos anti-tumorales dirigidos a estas subpoblaciones

La función que el gen SOX2 desempeña en el inicio y la progresión tumoral en algunos tipos de sarcomas, como es el osteosarcoma, se encuentra ampliamente caracterizada, pero todavía se desconoce cómo ejerce su papel en otros subtipos de sarcomas. Por ello, en este apartado, desarrollaremos qué papel tiene SOX2 en uno de los subtipos de sarcoma, el sarcoma pleomórfico indiferenciado. Veremos cómo afecta la depleción o sobreexpresión del gen en la capacidad de generar esferas clonales en cultivo, o en la capacidad de iniciar crecimiento tumoral, así como el efecto sobre la tumorigenicidad en un modelo animal. Utilizaremos un sistema reportero (SORE6) que permite monitorizar células viables que expresan este gen y veremos qué diferencia existe en la capacidad tumoral entre subpoblaciones positivas y negativas. Además, en relación con este hallazgo, veremos cómo influye la expresión de SOX2 en diferentes muestras de sarcomas de pacientes, en el grado de diferenciación del tumor, la capacidad invasiva y la supervivencia de los pacientes. Por último, estudiaremos el efecto de un panel de fármacos antitumorales en células SOX2 positivas en un modelo de sarcoma pleomórfico indiferenciado, así como en líneas derivadas de condrosarcomas de pacientes.

1. La expresión de SOX2 en muestras humanas de sarcomas se asocia a un mal pronóstico y supervivencia

Nuestro objetivo era conocer si la expresión de factores de pluripotencia como SOX2 y OCT4 en pacientes con sarcoma es clínicamente relevante. Para ello, se analizó la expresión de SOX2 y OCT4 mediante inmunohistoquímica en una colección de matrices de tejidos que incluían muestras de pacientes de 10 subtipos de sarcomas. Tras realizar el análisis por expertos independientes de la tinción para ambos anticuerpos, se detectó expresión nuclear de SOX2 en 25 de ellos (28,4%) (**Figura 8 A,B**). Es importante destacar que la expresión de SOX2 se correlacionó significativamente con un mayor grado tumoral ($p = 0,001$), una mala diferenciación ($p = 0,005$) y la presencia de invasión vascular ($p = 0,003$) o linfática ($p = 0,005$) (**Figura 8 B**). Además, los casos con SOX2 negativo mostraron una tendencia a un mayor tiempo de supervivencia en comparación con los casos que expresaban este factor (80 meses frente a 42 meses, respectivamente). La tasa de supervivencia a 5 años fue del 78% en los casos negativos y del 38% en los positivos (**Figura 8 C**).

Por otro lado, la expresión nuclear de OCT4 sólo se detectó en 11 casos (11%) y, todos ellos, mostraron una tinción débil (**Figura 9 A,B**). En este caso, para este marcador, no encontramos ninguna asociación significativa entre la expresión de OCT4 y los parámetros clínicos. Sin embargo, se observó una fuerte correlación entre la expresión de SOX2 y OCT4 ya que todos los casos positivos para OCT4 también eran positivos para SOX2 (**Figura 9 B**).

Por lo tanto, podemos concluir que SOX2, pero no OCT4, se correlaciona con estadios tumorales avanzados, fenotipos más agresivos y de peor pronóstico en pacientes con sarcoma. Según estos datos, SOX2 (más que OCT4), podría desempeñar, principalmente, un papel activo en el inicio y la progresión de los sarcomas.

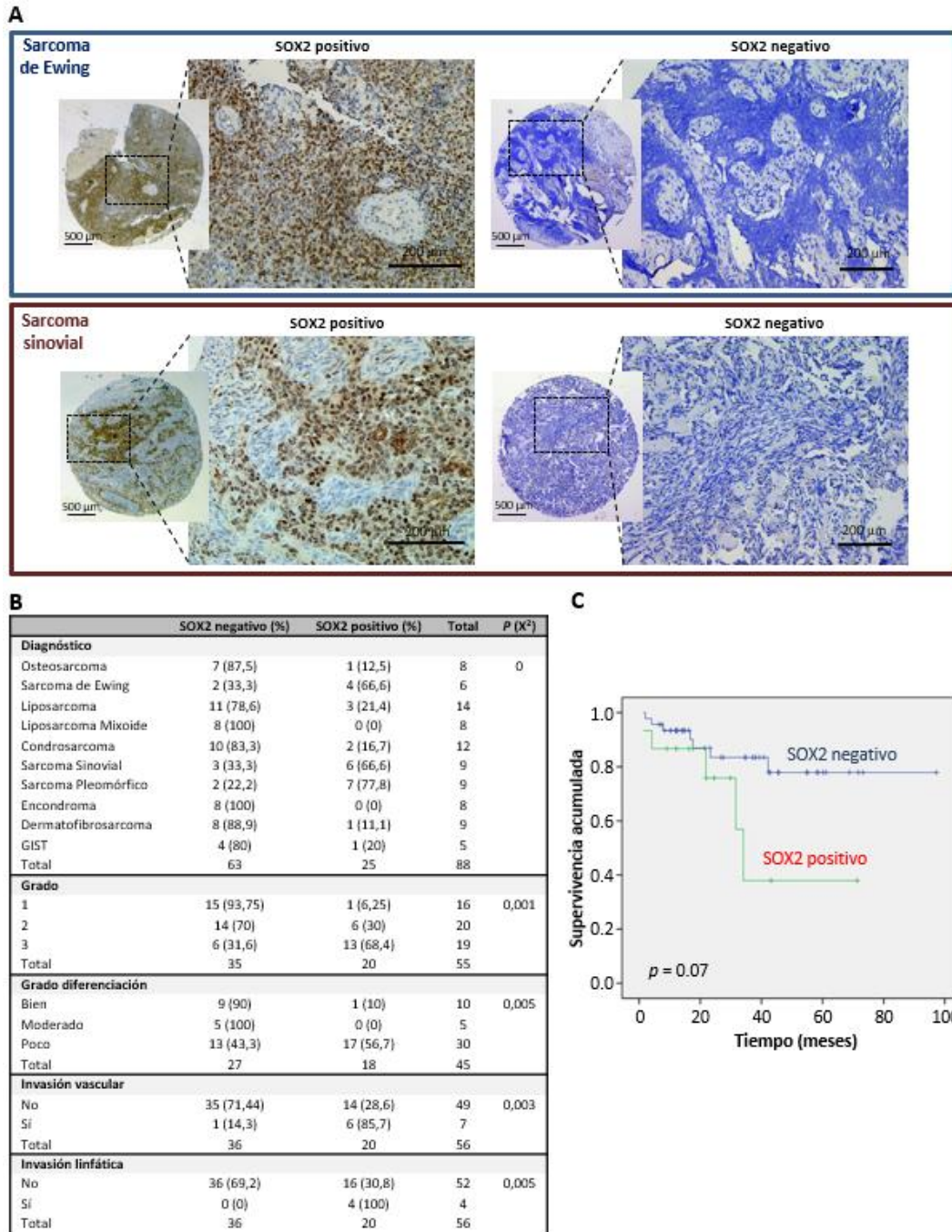


Figura 8. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de SOX2 en sarcomas de pacientes y asociación con los datos clínicos. (A) Ejemplos representativos de los tipos de sarcoma indicados que muestran una tinción positiva o negativa para SOX2. Barras de escala = 200 o 500 µm (aumentos). **(B)** Distribución de los distintos sarcomas de pacientes (n = 88) según el nivel de expresión de SOX2 en los distintos subtipos de sarcoma y características clinicopatológicas del tumor. Se muestran los p-valores. **(C)** Curvas de supervivencia acumulada Kaplan-Meier según la expresión de la proteína SOX2 en la cohorte de pacientes. Los p-valores fueron estimados utilizando la prueba *log-rank*.

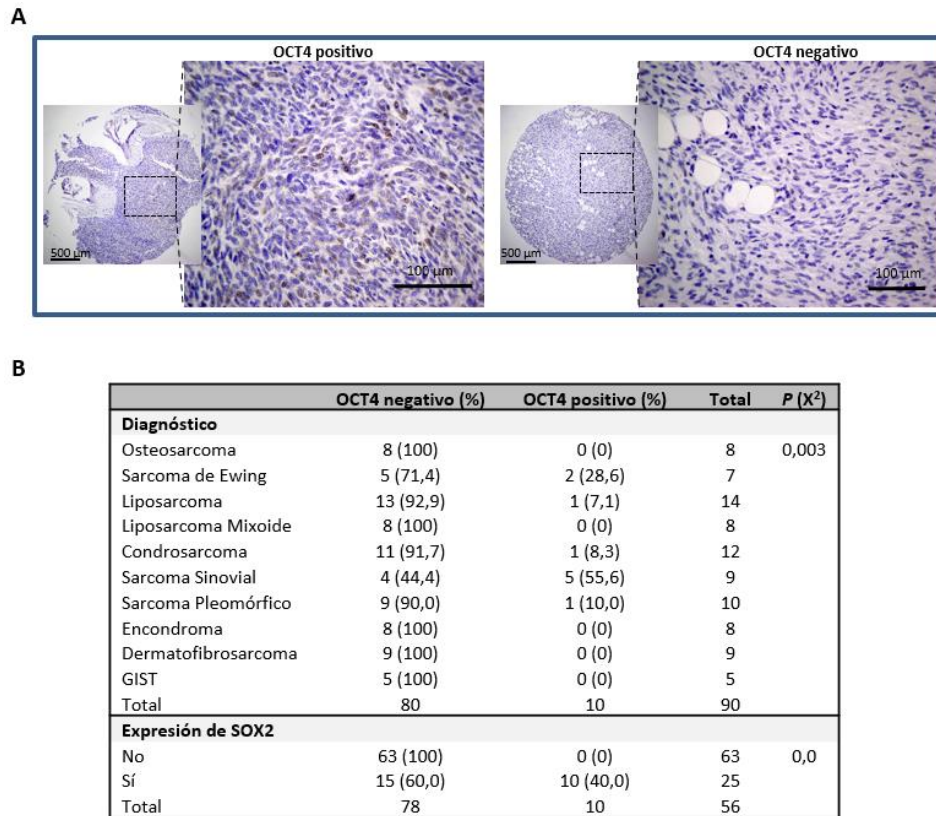


Figura 9. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de OCT4 en sarcomas de pacientes y asociaciones con los datos clínicos. (A) Ejemplos representativos de tinción OCT4 positiva (sarcoma sinovial) o negativa (dermatofibrosarcoma). Barras de escala = 100 o 500 µm (aumentos). **(B)** Distribución de los casos de sarcoma según su nivel de expresión de OCT4 y su correlación con la expresión de SOX2. Se muestran los *p*-valores.

2. SOX2 es necesario para mantener el potencial tumorigénico en las células de sarcoma

Para estudiar el posible papel pro-tumorigénico de SOX2 en sarcoma, modificamos genéticamente la línea celular T-5H-0 (modelo de sarcoma pleomórfico indiferenciado, establecida según hemos visto en el apartado 2.4.2.1. de antecedentes) para obtener una expresión reducida del gen. En primer lugar, transducimos las células T-5H-0 con partículas lentivirales portadoras de un shSOX2 inducible por doxiciclina y seleccionamos los tres clones (T-5H-0-Tet-shSOX2-C1, C3 y C8) que mostraron una depleción más eficiente de la expresión de SOX2 tras el tratamiento con 2 µg/ml de doxiciclina (**Figura 10 A,B**).

Dado que, como ha sido reportado, existe una regulación recíproca de ambos factores de pluripotencia SOX2 y OCT4 [286], analizamos la expresión de OCT4 en estas células y vimos

que las células deplecionadas para SOX2 también mostraron una expresión reducida de OCT4 (Figura 10 C).

En consonancia con el conocido papel de SOX2 en el mantenimiento de las propiedades CSC, su eliminación en todos los clones redujo significativamente la formación de esferas tumorales en suspensión (Figura 10 D,E). Y, lo que es más importante, el tratamiento i.p. con 50 mg/kg de doxiciclina en ratones inoculados s.c. con células T-5H-0-Tet-shSOX2#8 pre-tratadas en cultivo con doxiciclina, pero no en las T-5H-0 parentales, fue suficiente para prevenir el crecimiento tumoral *in vivo* (Figura 10 F).

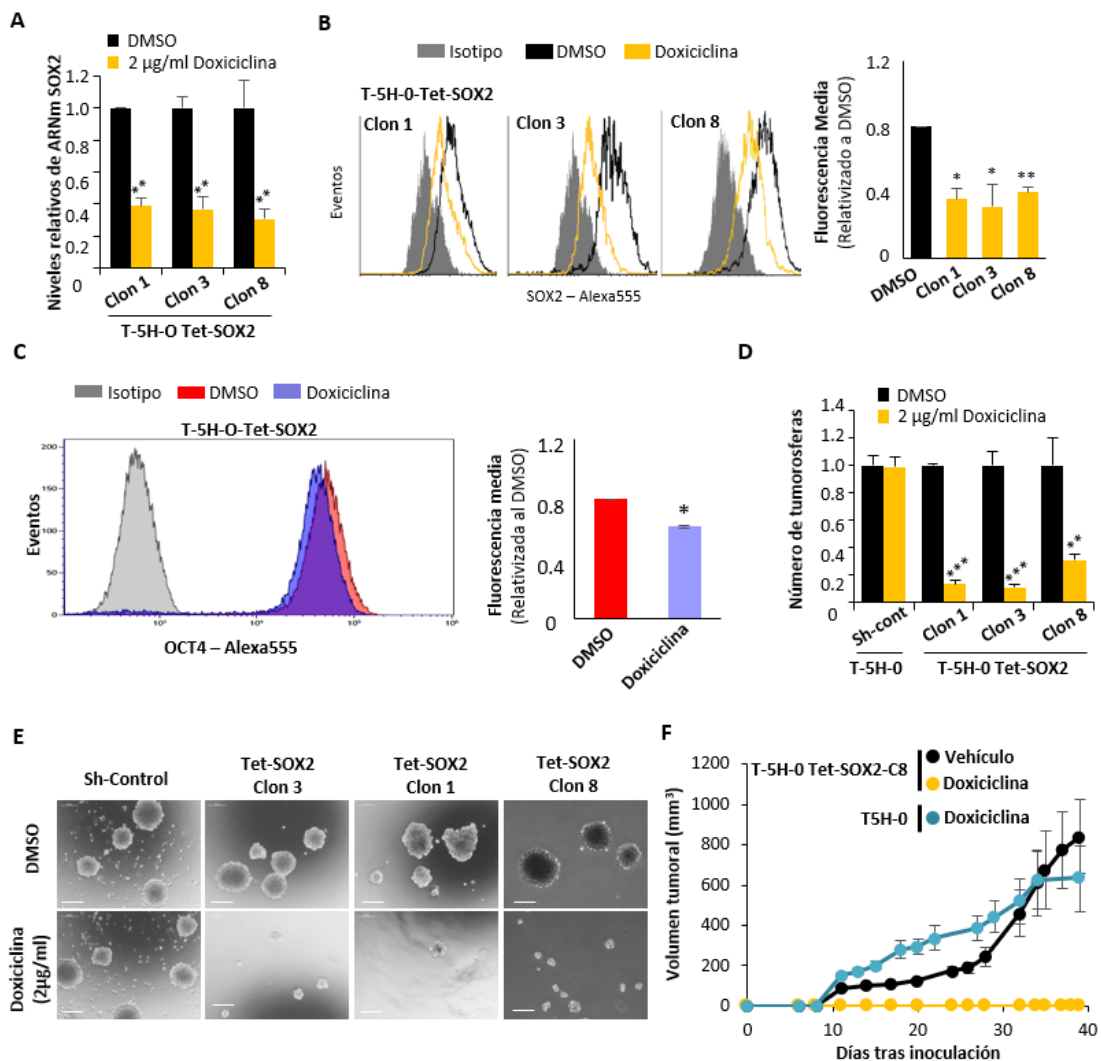


Figura 10. La depleción de SOX2 redujo drásticamente el potencial tumorigénico de las células de sarcoma. (A,B) Expresión relativa de ARNm (A) y análisis por citometría de flujo (B) de SOX2 en tres clones de células T-5H-0 portadores de un shARN de SOX2 inducible por doxiciclina en presencia o ausencia de 2 µg/ml de doxiciclina durante 48h. **(C)** Análisis por citometría de flujo de OCT4 en células T-5H-0 portadoras del shARN de SOX2 inducible por doxiciclina en presencia o ausencia de 2 µg/ml de doxiciclina durante 48h. **(D,E)** Promedio de tres experimentos independientes (D) e imágenes

representativas (E) de las tumorosferas formadas por las células T-5H-0 parentales transducidas con shARN control o de los clones de T-5H-0 portadores del shARN de SOX2 inducible por doxiciclina en presencia o ausencia de 2 µg/ml de doxiciclina durante 48 h. Barras de escala = 200 µm. (F) Las células T-5H-0 y T-5H-0-Tet-SOX2-C8 fueron pretratadas como se indica con el vehículo (DMSO) o con 2 µg/ml de doxiciclina durante 72h antes de la inoculación s.c. de 1×10^4 células en ratones inmunodeficientes (n=7 ratones por serie). Tras la inoculación, los ratones fueron tratados diariamente con el vehículo (solución salina) o doxiciclina (50 mg/kg) por vía i.p. Se representa la cinética de crecimiento del tumor (volumen medio) de cada serie. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con los grupos control (*p<0,05; **p<0,005; ***p<0,0005; prueba t de Student de dos colas).

Para confirmar estos resultados, utilizamos una secuencia diferente de shSOX2 no condicionado (Figura 11 A-E) y una secuencia de siSOX2 (Figura 11 F-J) en células T-5H-0 y encontramos, de nuevo, una reducción significativa tanto de la capacidad para formar colonias en agar blando, como de la capacidad para crecer como tumorosferas.

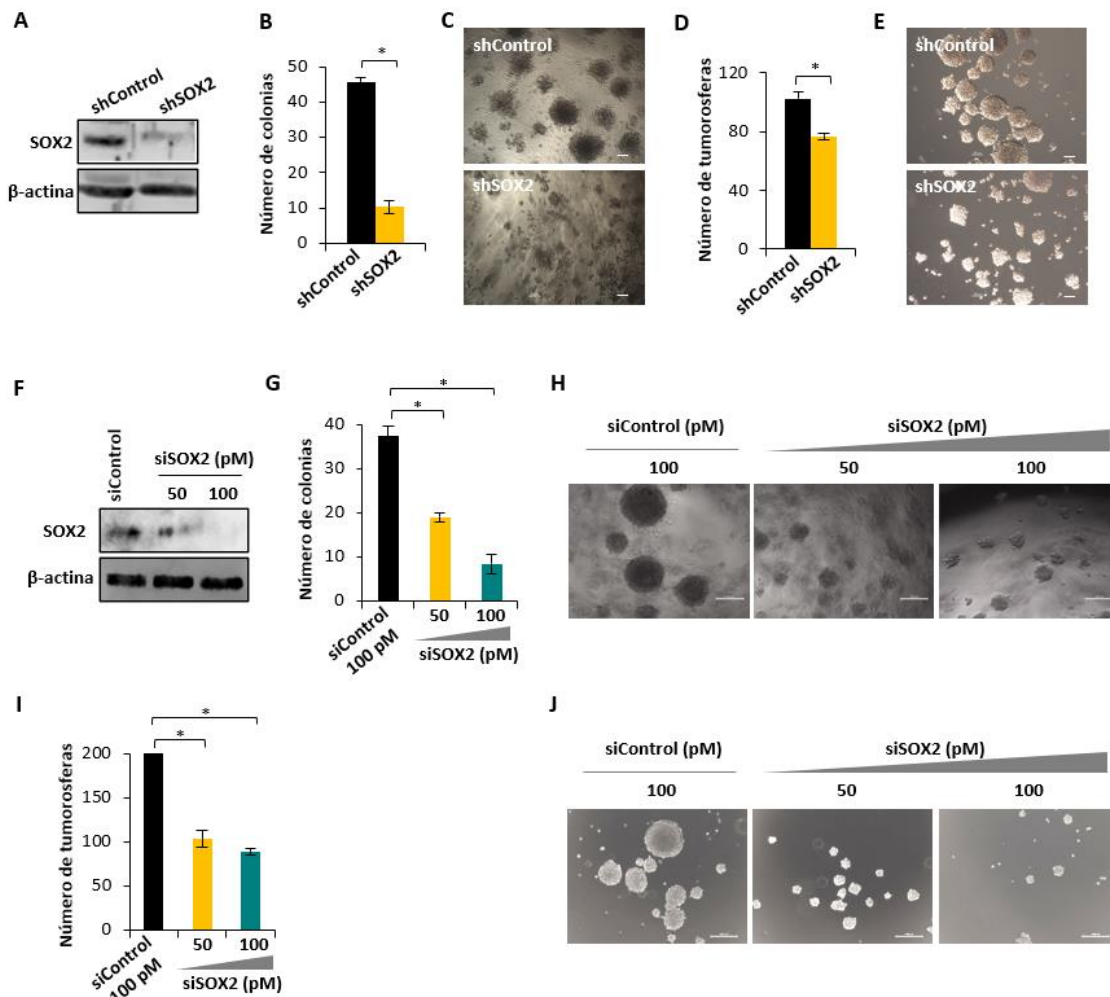


Figura 11. La depleción de SOX2 inhibió la formación de colonias en agar blando y el crecimiento de tumorosferas. (A-E) Efecto de la depleción de SOX2 en células T-5H-0 utilizando un shSOX2 específico no condicionado. (A) Análisis de western blot que muestra el nivel de depleción de SOX2 conseguido mediante transducción lentiviral con vectores de shARN. (B-C) Número de colonias (B) e imágenes representativas

(C) de ensayos en agar blando. (D-E) Número de tumosferas (D) e imágenes representativas (E) de cultivos de esferas clonales. (F-J) Efecto de la eliminación de SOX2 en las células T-5H-0 mediante el uso de un siARN específico. (F) Análisis de western blot que muestra el nivel de depleción de SOX2 conseguido mediante la transfección con concentraciones crecientes del siARN. (G-H) Número de colonias formadas en ensayos de formación de colonias en agar blando (crecimiento independiente de anclaje) (G) e imágenes representativas (H) de las diferentes condiciones ensayadas. (I-J) Número de tumosferas generadas (I) e imágenes representativas de cultivos de esferas clonales (J) de células transfectadas con el siControl y el siSOX2. Los gráficos representan la media \pm la desviación estándar, calculada a partir de, al menos, dos experimentos independientes (* $p < 0,05$ mediante la prueba *t* de Student de dos colas). Barra de escala = 100 μ m.

Para confirmar aún más las propiedades tumorigénicas impulsadas por SOX2 en las células de sarcoma, sobreexpresamos de manera estable el gen SOX2 en la línea celular T-5H-0 utilizando partículas lentivirales para la expresión del ADN complementario de SOX2 (Figura 12 A). La sobreexpresión de SOX2 no mostró ningún impacto en la capacidad de formar colonias en agar blando (Figura 12 B,C) ni en la capacidad de crecer como esferas tumorales (Figura 12 D,E). Sin embargo, las células que sobreexpresaban SOX2 eran más tumorigénicas y generaban tumores en ratones inmunodeficientes, significativamente, más rápido que las células control (Figura 12 F,H). Por lo tanto, los niveles basales de SOX2 parecen ser suficientes para promover eficazmente el crecimiento clonal *in vitro*, sin embargo, ciertas condiciones del microambiente tumoral de los experimentos *in vivo* podrían promover un potencial tumorigénico a largo plazo en aquellas células con mayor expresión de SOX2.

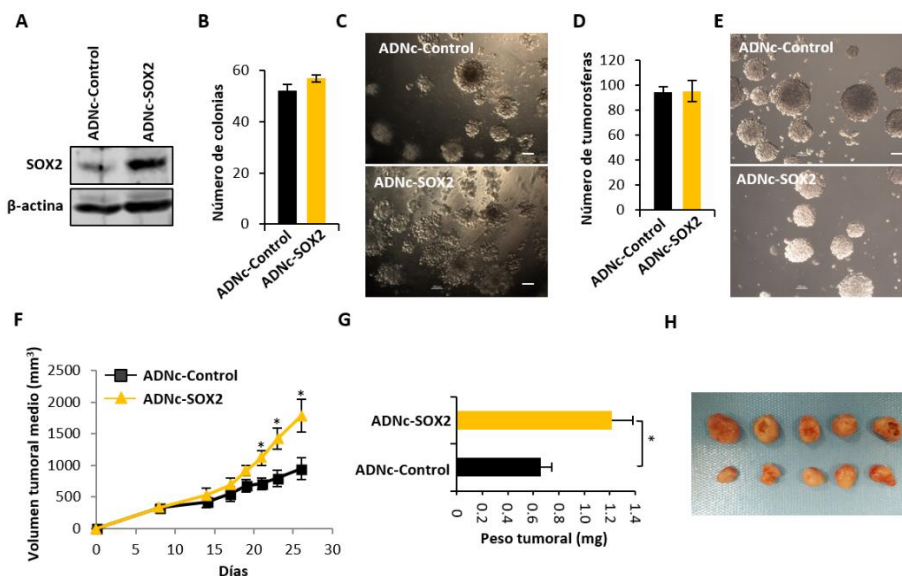


Figura 12. La sobreexpresión de SOX2 aumentó el potencial tumorigénico de las líneas de sarcoma. Las células T-5H-0 fueron transducidas de forma estable utilizando un vector lentiviral cADN de EGFP

(cADN Control) o de SOX2 (cADN SOX2). **(A)** Análisis por western blot de la expresión de SOX2 **(B,C)** Cuantificación del número de colonias formadas ($n=3$ experimentos independientes) (B) e imágenes representativas de los ensayos en agar blando (C) realizados con células control y células con SOX2 sobreexpresado. **(D,E)** Número medio de tumorosferas generadas en tres experimentos independientes (D) e imágenes representativas de los cultivos de tumorosferas indicados. (E). Barras de escala = 100 μm . **(F-H)** Evaluación del crecimiento tumoral observado tras la inoculación de 1×10^6 células transfectadas de forma estable con el cADN control o el cADN SOX2 en ratones inmunodeficientes. Se muestra la cinética de crecimiento tumoral (F), el peso del tumor (G) y las imágenes de los tumores al final del experimento (H). Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$ mediante la prueba t de *Student* de dos colas).

En conjunto, los datos de los experimentos de depleción y sobreexpresión sugieren que la expresión de SOX2 desempeña un papel activo en el inicio y la progresión de los sarcomas, lo que le confiere una gran importancia biológica y clínica.

3. Detección y aislamiento de subpoblaciones de CSCs con expresión de SOX2

Para evaluar si las células que expresan factores de pluripotencia como SOX2 se comportan como una subpoblación de CSC con mayor capacidad de promover la formación y mantenimiento tumoral, utilizamos un sistema reportero lentiviral en el que un elemento de respuesta a SOX2 y OCT4 (SORE6) se encuentra acoplado a un promotor mínimo de citomegalovirus (CMV) que controla la expresión del gen reportero GFP.

Además, en este sistema, el reportero lleva una marca que media su degradación continua por el proteasoma para así conseguir una mayor selectividad y resolución cinética [284]. Este sistema nos permitió, por tanto, detectar, monitorizar y aislar células viables que expresaban SOX2 y/u OCT4 transcripcionalmente de manera activa mediante citometría de flujo (**Figura 13 A**) o mediante microscopía en tiempo real de células vivas (**Figura 13 B**). Así, utilizamos estas construcciones lentivirales para transducir células T-5H-0, CDS17 y T-CDS17, con el fin de generar líneas con expresión estable de la construcción SORE6 (T-5H-0-SORE6-GFP, CDS17-SORE6-GFP y T-CDS17-SORE6-GFP, respectivamente), así como su correspondiente control sin el elemento de respuesta a SORE6 (T-5H-0-minCMV-GFP, CDS17-minCMV-GFP y T-CDS17-minCMV-GFP) que se han utilizado como controles para determinar el nivel basal de fluorescencia. En primer lugar, encontramos que las células T-5H-0-SORE6-GFP, CDS17-SORE6-GFP y T-CDS17-SORE6-GFP mostraban porcentajes de SORE6+ que oscilaban entre el 20 y el 40% (**Figura 13 A,B**). Por lo tanto, utilizamos la

actividad SORE6 para aislar las subpoblaciones SORE6+ y SORE6- mediante citometría de flujo en las tres líneas celulares y, como era de esperar, las células T-5H-0 SORE6+ mostraron una expresión de SOX2 significativamente mayor que la subpoblación SORE6- (Figura 14 A-E). También encontramos que las células SORE6+ presentaban mayor habilidad para formar tumorosferas que las células SORE6-, tanto en el modelo de UPS T-5H-0 (Figura 13 C,D) como en las líneas de condrosarcoma CDS17 y T-CDS17 (Figura 14 F,G).

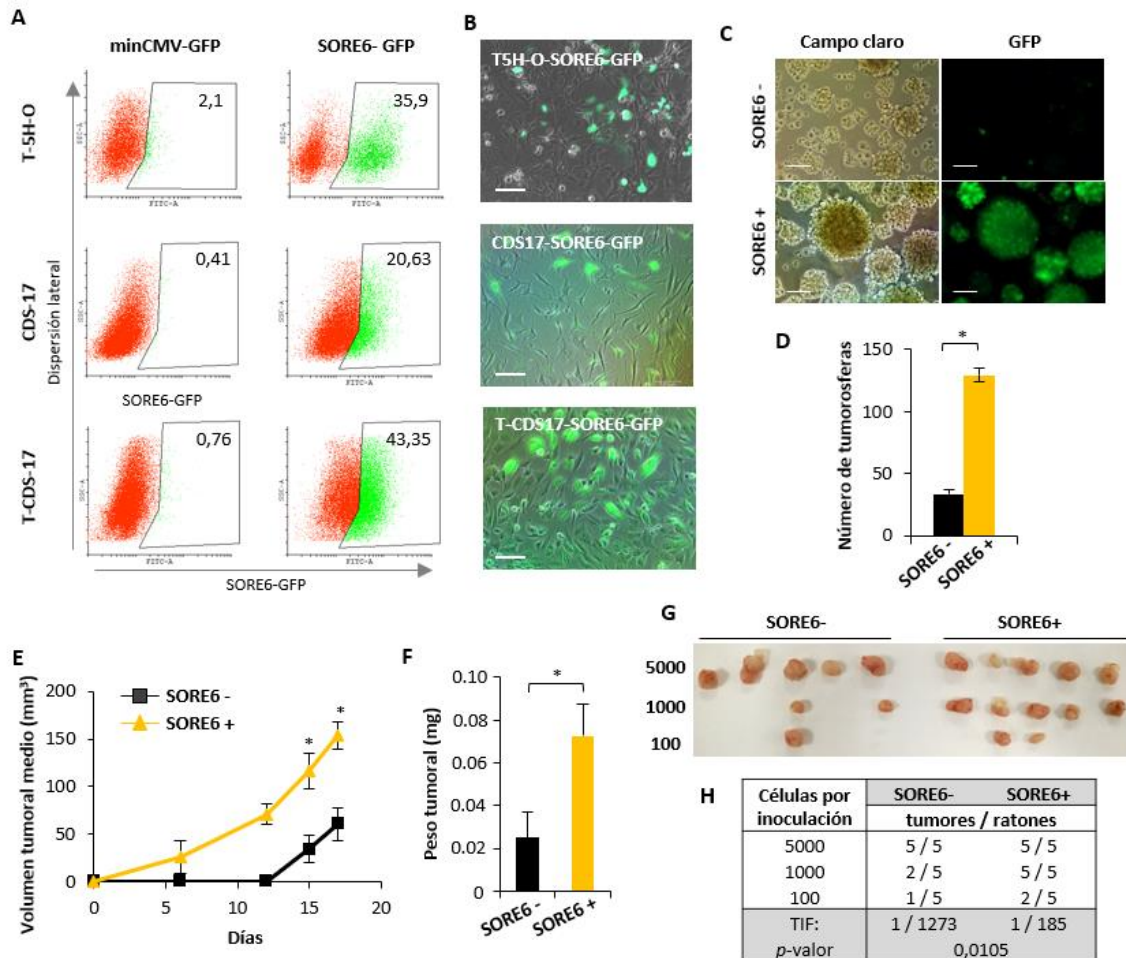


Figura 13. La actividad de SORE6 marca una subpoblación de CSCs en sarcoma. (A) Análisis por citometría de flujo que muestra el nivel de células SORE6+ en los cultivos T-5H-0-SORE6-GFP, CDS17-SORE6-GFP y T-CDS17-SORE6-GFP y en sus correspondientes células control minCMV-GFP. (B) Imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando subpoblaciones celulares con actividad SORE6-GFP. Barras de escala = 50 μ m. (C,D) Ensayo de formación de tumorosferas realizado con células SORE6+ y SORE6-. Imágenes representativas (C) y cuantificación del número de tumorosferas generadas en tres experimentos independientes (D). Barras de escala = 200 μ m. (E,F) Capacidad de formación de tumores *in vivo* de las subpoblaciones SORE6+ y SORE6- en células T-5H-0-SORE6-GFP. (E) Cinética del crecimiento tumoral tras la inoculación s.c. en ratones inmunodeficientes de 1×10^4 células de cada población (n=8 ratones por serie). (F) Peso medio del tumor al final del experimento. (G,H) Ensayo de dilución límite (LDA) *in vivo* para evaluar el potencial de formación de tumores de las poblaciones SORE6+ y SORE6- de las células T-5H-0-SORE6-GFP. (G) Imágenes de los tumores formados en ambas series tras la inoculación de 5.000, 1.000 o 100 células. (H) Cuantificación de la frecuencia de células iniciadoras de tumores (TIF) utilizando el software

Capítulo I

ELDA. Se indica el número de ratones que desarrollaron tumores tras cuatro semanas y el número total de ratones inoculados para cada condición. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$ mediante la prueba *t* de *Student* de dos colas).

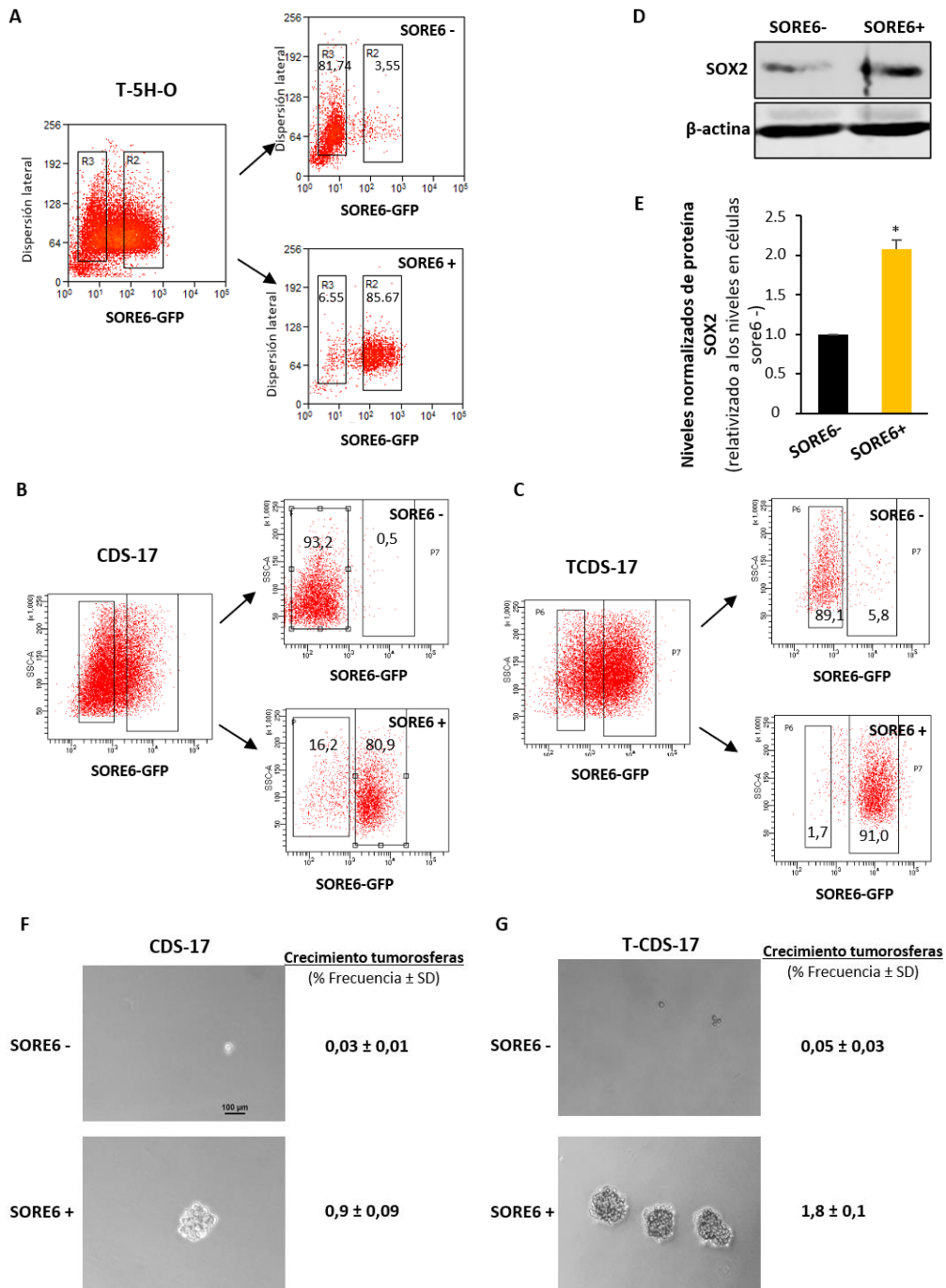


Figura 14. Separación por citometría de flujo de subpoblaciones SORE6 positivas y negativas. (A-C) Separación de subpoblaciones SORE6 en células T-5H-0 (A), CDS-17 (B) y T-CDS17 (C). (D) Análisis por western blot de la expresión de SOX2 en las células T-5H-0 SORE6 positivo y negativo. (E) Cuantificación de los niveles de la proteína SOX2 en las células T-5H-0. Los datos están normalizados a la β -actina y relativizados a los niveles observados en las células SORE6-. La gráfica muestra la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes y los asteriscos indican las diferencias estadísticamente

significativas ($p < 0,05$, prueba t de *Student* de dos colas) respecto a los niveles de las células SORE6-. (F,G) Capacidad de crecer como tumores de las subpoblaciones SORE6- y SORE6+ en CDS-17 (F) y T-CDS17 (G).

Para estudiar si la subpoblación SORE6+ estaba enriquecida en células iniciadoras de tumores, inoculamos 1×10^4 células de las subpoblaciones T-5H-0 tanto SORE6- como SORE6+ en ratones inmunodeficientes de manera s.c. y medimos la formación de tumores a lo largo del tiempo. Observamos crecimiento tumoral en la serie SORE6+ a partir del sexto día tras la inoculación, mientras que la serie SORE6- no generó crecimiento tumoral medible hasta 15 días después de la inoculación, siendo las diferencias del volumen tumoral respecto a la serie SORE6+ estadísticamente significativas (**Figura 13 E**). Al final del experimento, los pesos de los tumores confirmaron que las células SORE6+ generaban tumores significativamente mayores que los obtenidos a partir de las células SORE6- (**Figura 13 F**). Para confirmar y cuantificar el enriquecimiento de la subpoblación SORE6+ en las células madre tumorales, realizamos un ensayo de dilución celular límite (LDA) comparando la capacidad entre las células SORE6- y SORE6+ para iniciar el crecimiento tumoral *in vivo*. Encontramos que las células SORE6+ produjeron tumores en todos los casos tras la inoculación de 5.000 a 1.000 células y en 2 de 5 ratones (2/5) tras la inoculación de 100 células. Por otro lado, las células SORE6- generaron 5/5, 2/5 y 1/5 tumores tras la inoculación de 5.000, 1.000 y 100 células, respectivamente (**Figura 13 G**). Por lo tanto, la frecuencia de iniciación de tumores (TIF) calculada mediante el software ELDA fue 7 veces mayor en las células SORE6+ (1 célula iniciadora de tumor de 185) en comparación con las células SORE6- (1 célula de 1273) (**Figura 13 H**).

Estos experimentos sugieren, por tanto, que una elevada actividad transcripcional de SOX2/OCT4, medida por la actividad SORE6, podría utilizarse como marcador de las células madre tumorales en los sarcomas.

4. SORE6 como herramienta para monitorizar la respuesta de las CSCs a los tratamientos antitumorales

Dada su función como marcador de CSCs, nos propusimos comprobar si la actividad de SORE6 podría ser útil para evaluar la eficacia de los fármacos antitumorales dirigidos a las subpoblaciones de CSCs. Por lo tanto, estudiamos el impacto en poblaciones SORE6+ de

aquellos fármacos empleados en el tratamiento de los sarcomas, como la doxorrubicina, la trabectedina y el paclitaxel, así como el análogo de la mitramicina EC-8042, que ha demostrado ser altamente eficaz en el tratamiento de los sarcomas en estudios previos de nuestro laboratorio [258].

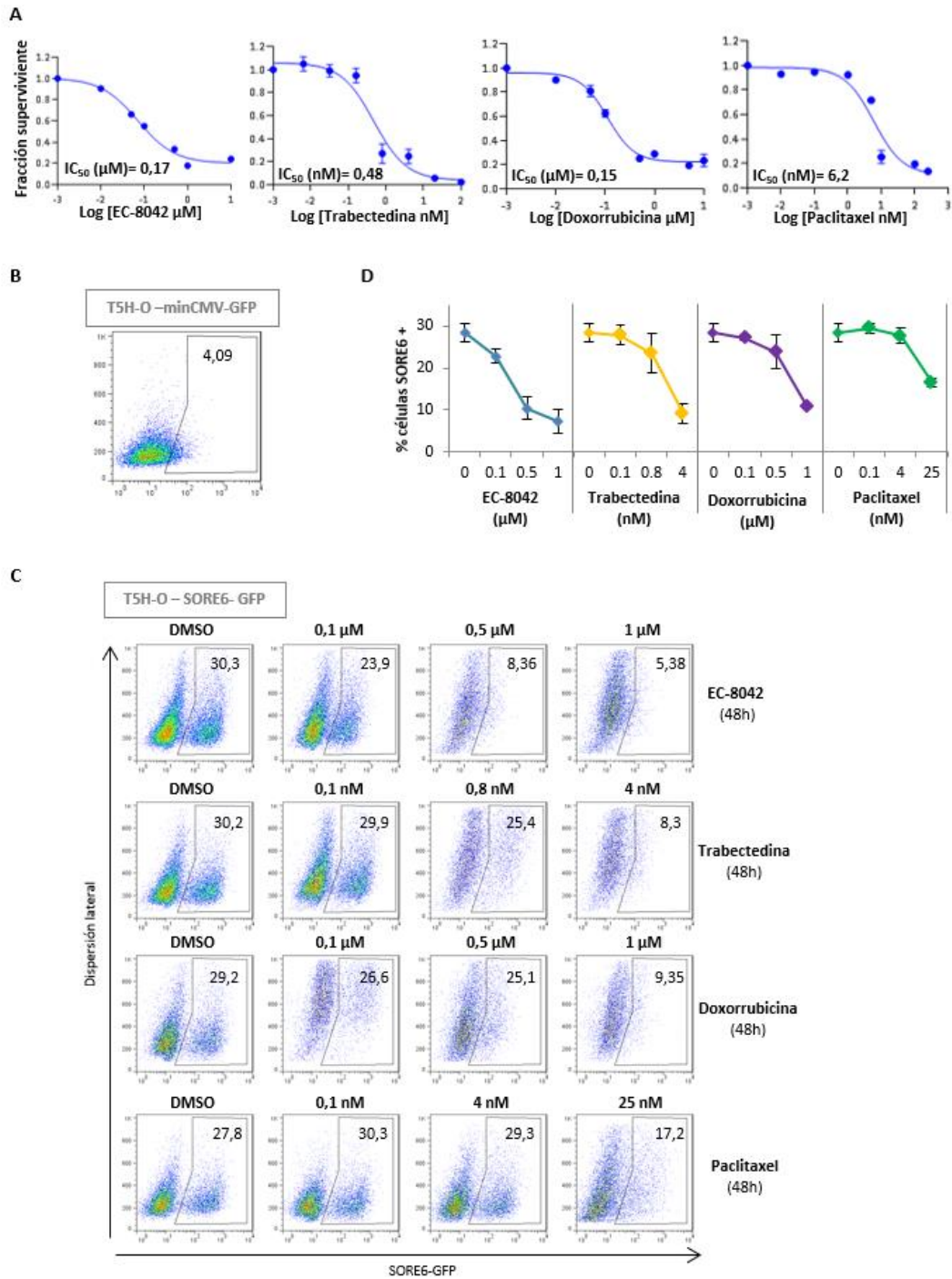


Figura 15. Curvas de toxicidad dosis-respuesta obtenidas tras el tratamiento de las células T-5H-0 con los fármacos indicados durante 48 h (A) y efecto dosis-respuesta de los fármacos antitumorales sobre las subpoblaciones de CSCs SORE6+ (B-D). Análisis representativo de la población SORE6+ en las células

T-5H-0-minCMV-GFP no tratadas (control) (B) o en células T-5H-0-SORE6-GFP tratadas con las concentraciones indicadas de EC-8042, trabectedina, doxorubicina o paclitaxel durante 48 h (C). (D) Gráfico que muestra la desviación estándar media de tres experimentos independientes.

Los valores de IC_{50} de estos fármacos en las líneas celulares T-5H-0-SORE6-GFP fueron de 307 nM para doxorubicina, 0,66 nM para trabectedina, 7 nM para paclitaxel y 288 nM para EC-8042 (**Figura 15 A**). De acuerdo con estos valores, evaluamos la actividad de SORE6 en la línea T-5H-0 en experimentos de dosis-respuesta utilizando concentraciones de cada fármaco que indujeron una toxicidad baja, media ($\approx IC_{60}$) y alta tras 48 horas de tratamiento. En estos experimentos, EC-8042 fue el fármaco más eficaz para reducir la subpoblación de SORE6+, siendo capaz de inducir una disminución del 75% de las células SORE6+ con una concentración del orden de su IC_{60} . Por otro lado, el resto de los fármacos sólo indujeron una clara regresión de la subpoblación SORE6 cuando se utilizaron las concentraciones más altas (**Figura 15 B-D**). Además, experimentos *time-course* tras el tratamiento con concentraciones del valor del IC_{60} también confirmaron el mayor potencial de EC-8042 para erradicar las células SORE6+ en comparación con la doxorubicina, la trabectedina y el paclitaxel (**Figura 16 A-C**). Esta gran capacidad del EC-8042 de dirigirse contra las células SORE6+ fue también evidente en los análisis de dosis-respuesta y de *time-course* realizados en CDS17-SORE6-GFP y T-CDS17-SORE6-GFP (**Figura 17**).

Para caracterizar mejor el mecanismo asociado a la capacidad de estos fármacos para reducir las células SORE6+, analizamos simultáneamente la actividad de SORE6 y la actividad caspasa-3 mediante citometría de flujo en células T-5H-0-SORE6-GFP tratadas con trabectedina o EC-8042. En estos análisis encontramos que la trabectedina era un inductor eficaz de la apoptosis tanto en células SORE6+ como en células SORE6-. Además, el tratamiento con EC-8042 redujo drásticamente el porcentaje de células SORE6+ incluso antes de que el efecto apoptótico se hiciera evidente (**Figura 16 D,E**). Estos resultados sugieren que ambos fármacos fueron capaces de eliminar subpoblaciones de CSCs mediante diferentes mecanismos. Por un lado, la trabectedina eliminó las células SORE6+ a través de la inducción de la apoptosis y, por otro lado, el EC-8042 fue capaz de desactivar la actividad transcripcional relacionada con SORE6, afectando así a las propiedades de las CSCs, antes de la inducción de la apoptosis.

A continuación, generamos tumores en ratones inmunodeficientes tras la inoculación subcutánea de la línea celular T-5H-0-SORE6-GFP, a los que tratamos con diferentes fármacos, utilizando regímenes de tratamiento previamente establecidos [258, 287, 288].

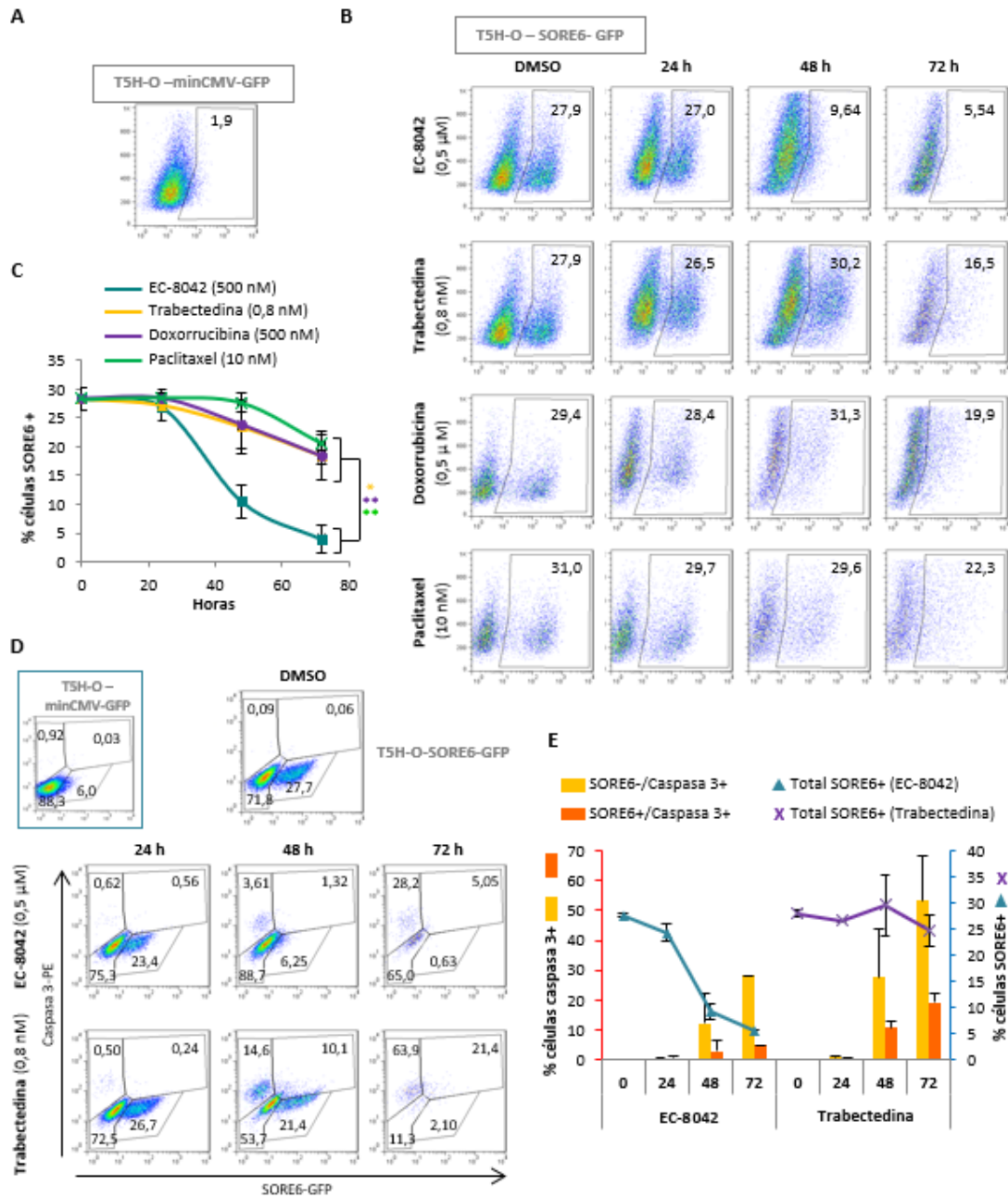


Figura 16. Efectos diferenciales de los fármacos antitumorales sobre las células SORE6 positivas. (A-C) Análisis time-course de las células SORE6+ durante el tratamiento con los diferentes fármacos. (A,B) Análisis por citometría de flujo de la población SORE6+ en células T-5H-0-minCMV-GFP no tratadas (control) (A) o en células T-5H-0-SORE6-GFP tratadas con 0,5 μM de EC-8042, 0,8 nM de trabectedina, 0,5 μM de doxorubicina o 10 nM de paclitaxel durante los tiempos indicados (B). (C) Gráfico que muestra la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con la serie EC-8042 a 72 h (*p<0,05, **p<0,005; prueba t de Student de dos colas). (D,E) Análisis biparamétrico por citometría de flujo de la actividad SORE6-GFP y

los niveles de caspasa-3 activa. (D) Análisis representativo en T-5H-O-minCMV-GFP sin tratar (control) o en células T-5H-O-SORE6-GFP tratadas con trabectedina (0,8 nM) o EC-8042 (0,5 μ M) durante los tiempos indicados. (E) Representación gráfica de tres experimentos independientes (media de la desviación estándar).

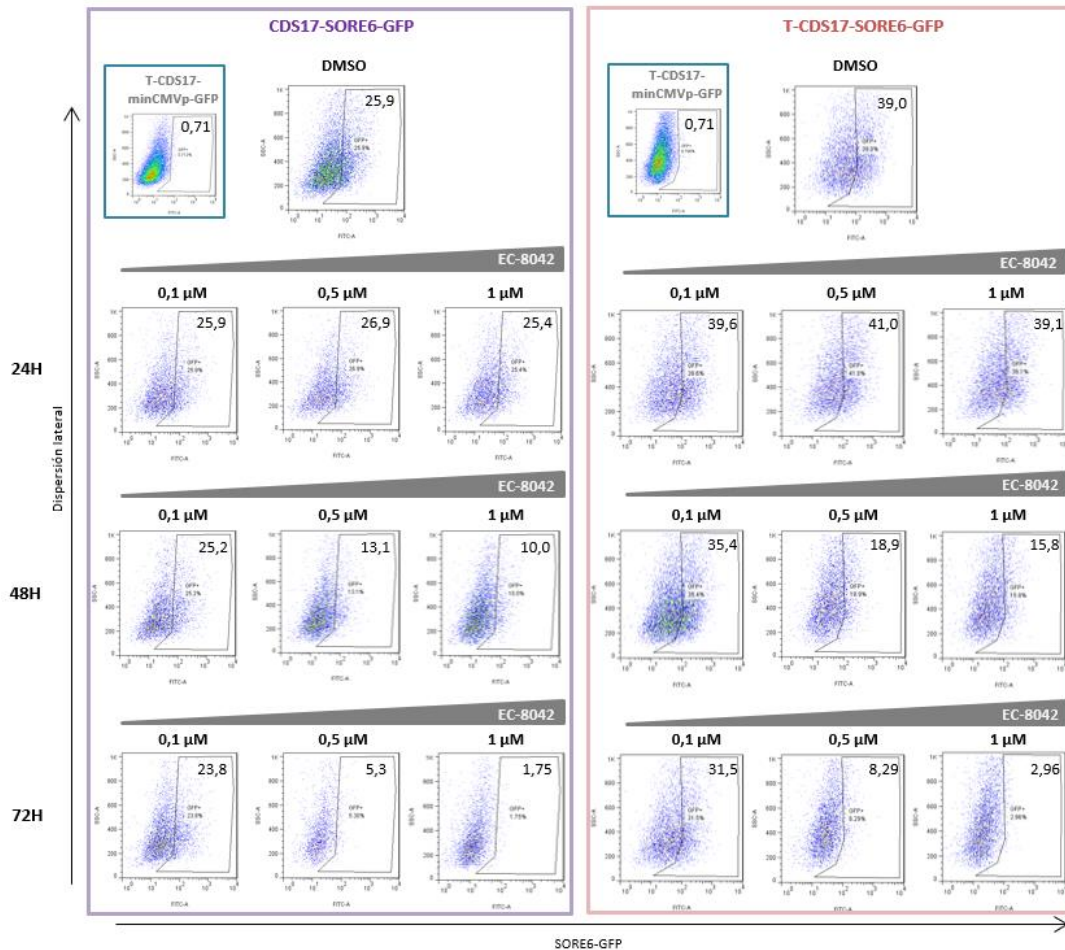


Figura 17. Efecto de EC-8042 en subpoblaciones SORE6+ de líneas celulares derivadas de condrosarcomas de pacientes. Análisis representativos de citometrías de flujo de subpoblaciones SORE6+ en las líneas celulares CDS17+SORE6-GFP (panel izquierdo) y T-CDS17-SORE6-GFP (panel derecho) tratadas con las concentraciones indicadas de EC-8042 durante los tiempos señalados. Los niveles de SORE6+ en los respectivos controles de CDS17-minCMV-GFP (recuadro del panel izquierdo) y T-CDS17-minCMV-GFP (recuadro del panel derecho) también se representan.

para así evaluar su efecto sobre las células SORE6+ in vivo. Con la excepción de paclitaxel, todos los fármacos fueron capaces de reducir significativamente el crecimiento tumoral, siendo el EC-8042 el tratamiento más eficaz (**Figura 18 A,B**). En el punto final del experimento, los tumores se extrajeron y se disgregaron en célula única, para poder analizar la actividad de SORE6 mediante citometría de flujo. Encontramos que el EC-8042 fue el único fármaco capaz de reducir el porcentaje y la intensidad de fluorescencia de las

células SORE6+ (**Figura 18 C-E**). Por otro lado, la trabectedina o la doxorubicina produjeron un ligero aumento del porcentaje de células SORE6+ y de la intensidad de la fluorescencia, resultando en diferencias significativas con los niveles detectados en los tumores tratados con EC-8042 (**Figura 18 C-E**).

En conjunto, estos resultados demuestran la utilidad de analizar la actividad de SORE6 para evaluar la efectividad de los fármacos antitumorales dirigidos a las CSCs en sarcomas, tanto *in vitro* como *in vivo*.

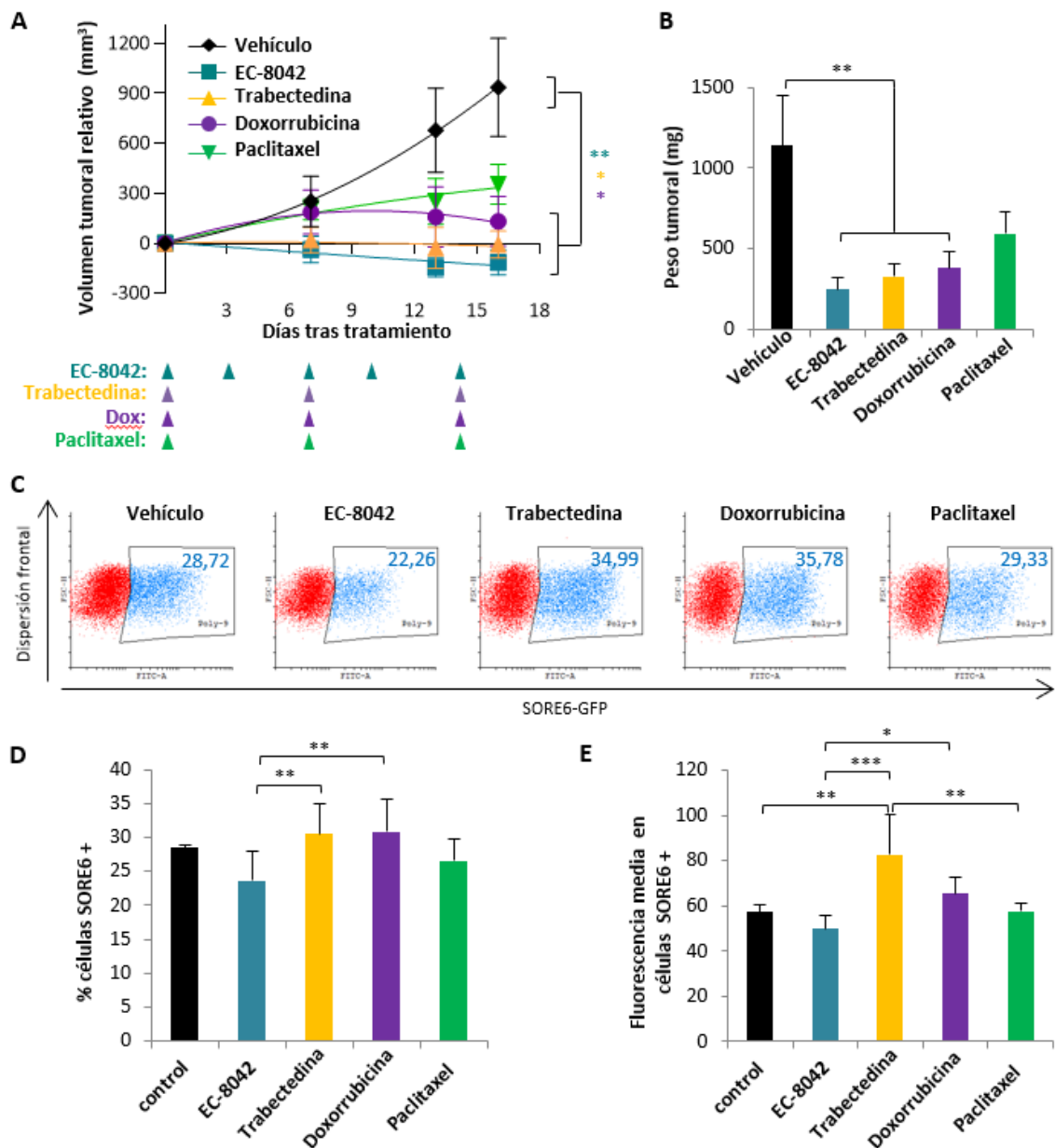


Figura 18. Evaluación de la actividad SORE6 tras los tratamientos *in vivo*. Los ratones con xenoinjertos tumorales establecidos tras la inoculación s.c. de 3×10^6 células T-5H-0-SORE6-GFP fueron asignados

Capítulo I

aleatoriamente en 5 grupos diferentes ($n = 5$ por grupo) y tratados i.v. con solución salina (control), EC-8042 (18 mg/kg cada 3-4 días hasta 5 dosis), trabectedina (0,15 mg/kg cada 7 días hasta 3 dosis), doxorubicina (4 mg/kg cada 7 días hasta 3 dosis) o paclitaxel (20 mg/kg cada 7 días hasta 3 dosis). **(A)** Curvas que representan la media relativa del volumen tumoral (SEM) de los xenoinjertos durante los tratamientos. Se indica el momento de los tratamientos, todos los ratones recibieron el último tratamiento el día 14 y los tumores se extrajeron y analizaron el día 16. **(B)** Media del peso del tumor (SEM) al final del experimento. Los asteriscos indican una cinética significativamente diferente a la de la serie control (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, ANOVA de una vía). **(C,D)**. Análisis por citometría de flujo de la actividad SORE6 en tumores recogidos y disgregados 48 h después de la última dosis de los tratamientos indicados. Se muestran gráficos representativos de la citometría de flujo (C) y gráficos resumen que representan el porcentaje de células SORE6+ (desviación estándar media) (D) y la intensidad de fluorescencia media de SORE6-GFP (E). Los asteriscos indican diferencias significativas entre series (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, ANOVA de una vía).

CAPÍTULO II

Caracterización de líneas primarias derivadas de condrosarcomas y análisis de su utilidad como herramienta para estudiar la deriva genética durante su crecimiento *in vitro* e *in vivo*

Para poder estudiar aquellas vías de señalización que se encuentran alteradas en cáncer, así como para poder establecer un cribado de fármacos que tengan alto rendimiento, es importante establecer líneas celulares derivadas del tumor de cada paciente que mimeticen las características de este y sirvan como plataforma sobre las que realizar estos estudios. Esto se hace especialmente importante en el caso de tumores que son resistentes a las terapias actuales, como es el caso de los condrosarcomas, de los que, además, se disponen de pocos modelos para su estudio. Por ello, en este apartado desarrollaremos cómo hemos establecido y caracterizado nuevas líneas celulares derivadas de distintos subtipos de condrosarcoma, así como un modelo animal de condrosarcoma y cómo han logrado asemejarse al tumor de origen. Veremos qué características invasivas y relacionadas con el fenotipo de célula madre tumoral muestran estos modelos en comparación con el tumor del que proceden. Además, gracias a la secuenciación de exoma completo de un condrosarcoma desdiferenciado de paciente y de la línea celular establecida a partir de él, así como de la línea derivada del xenógrafo tumoral, analizaremos cómo de conservadas están las mutaciones más relevantes del tumor de origen en las líneas celulares para así conocer cómo de fiables son estos modelos en el estudio y búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

1. Establecimiento y caracterización de las líneas primarias de condrosarcoma

Para proceder al establecimiento del cultivo celular primario, tras la resección quirúrgica de los tumores procedentes de once pacientes diagnosticados de condrosarcoma en el Hospital Universitario Central de Asturias (España), las muestras se procesaron siguiendo los métodos detallados en el apartado 2.1. de procedimientos experimentales. Dos de los cultivos celulares derivados de condrosarcomas secundarios (CDS06 – asociado a un osteocondroma previo y CDS11 – que presentaba la enfermedad de Ollier), y uno derivado de un condrosarcoma desdiferenciado (CDS17), crecieron durante un largo periodo de tiempo en cultivo *in vitro* (Tabla 12).

Tabla 12. Información clínica de los pacientes y características de los tumores

Línea celular	Edad*	Género	Tabaco	Localización del tumor	Subtipo de Condrosarcoma (estado previo)	Grado histológico	TMN	Invasión			Pre-tratamiento	Post-tratamiento
								vascular	linfática	Peri-neural		
CDS06	61	mujer	no	pelvis	secundario (OC)	2	pT3N0M0	no	no	no	no	N.A.
CDS11	61	hombre	sí	escápula	secundario (OD)	1	pT2N0M0	no	no	no	no	ninguno
CDS17	49	hombre	no	hemipelvis	desdiferenciado	3	pT1N0M0	no	no	no	no	QT
T-CDS17	-	-	-	derivada del xenógrafo CDS17	desdiferenciado	3	-	-	-	-	-	-

(*)Edad al diagnóstico. OC: osteocondroma. OD: enfermedad de Ollier. N.A: dato no disponible. QT: quimioterapia

Además, estas líneas celulares fueron capaces de formar colonias en agar blando, un ensayo de transformación *in vitro* que permite testar la habilidad de las células de crecer en condiciones independientes de anclaje (Tabla 13). Para seleccionar las poblaciones más tumorigénicas en los cultivos, se recuperaron las colonias capaces de crecer en agar blando y se volvieron a crecer en cultivo adherente para continuar con el desarrollo de la línea celular correspondiente. Las líneas celulares recuperadas pudieron pasarse, al menos, 20 veces (Tabla 13).

Tabla 13. Caracterización funcional de las líneas celulares de condrosarcomas

Línea celular	Crecimiento sin anclaje ^g	Pase*	Formación de tumorosferas		Crecimiento in vivo ^f			Aldehído ^h (%)	Invasión ^k
			Primera generación	Segunda generación	Subcutáneo		Intra-tibia		
					Formación de tumores (tumores/ratones)	Volumen tumoral medio ^l (±SD)	Formación de tumores (tumores/ratones)		
CDS06	sí	20	sí (0,24±0,05)	sí (0,10±0,05)	n/a	n/a	n/a	sí (4,01)	no
CDS11	sí	25	sí (0,28±0,11)	sí (0,16±0,06)	sí (3/3)	77±10,91	n/a	sí (5,05)	sí
CDS17	sí	<35	sí (0,20±0,08)	sí (0,10±0,01)	sí (3/3)	198±5,11	sí (1/2)	sí (2,94)	sí
T-CDS17	sí	<35	sí (0,26±0,08)	sí (0,11±0,01)	sí (3/3)	350±40 ^m	sí (2/2)	sí (14,5)	sí

(^g)Capacidad de crecer formando colonias embebidas en agar blando. (*)Número de pases alcanzados hasta el momento en los cultivos adherentes. (^f)El seguimiento del crecimiento tumoral se hizo de 1 a 2,5 meses en subcutáneo e intratibia, respectivamente. (^k)Capacidad de los esferoides 3D de invadir matrices de colágeno. (^l)El volumen del tumor se expresa en mm³. (^m)Existe una diferencia significativa entre los volúmenes de los tumores generados por las células CDS17 y T-CDS17 ($p=0,043$; prueba t de estudiante de dos colas. SD: Desviación Estándar

La identidad de las líneas celulares respecto al tumor original del que derivaron se confirmó mediante el genotipado de repeticiones cortas en tándem (STR) (**Tabla 14**).

Tabla 14. Análisis STR de las líneas celulares derivadas de paciente y el correspondiente tejido tumoral de origen.

locus	CDS06		CDS11		CDS17		
	Línea celular	Tejido tumoral	Línea celular	Tejido tumoral	Línea celular	T-CDS17	Tejido tumoral
D7S820	8,10	8,10	11,12	11,12	9,10	9,10	9,10
CSF1PO	10,12	10,12	11,11	11,11	11,11	11,11	11,11
TH01	9,9,3	9,9,3	9,3,9,3	9,3,9,3	6,7	6,7	6,7
D13S317	10,12	10,12	11,12	11,12	12,12	12,12	12,12
D16S539	9,12	9,12	9,12	9,12	11,11	11,11	11,11
VWA	16,18	16,18	15,15	15,15	14,16	14,16	14,16
TPOX	11,12	11,12	9,11	9,11	9,9	9,9	9,9
AM	X, X	X, X	X, X	X, X	X, Y	X, Y	X, Y
DS5818	9,11	9,11	11,12	11,12	11,13	11,13	13,13
% identidad	100		100		100		

Dos de las líneas celulares (CDS11 y CDS17) se sometieron a varios ensayos para comprobar su capacidad de iniciar el crecimiento tumoral *in vivo*. Tras inocularse de manera subcutánea en ratones inmunodeficientes, ambas fueron capaces de formar pequeños tumores de crecimiento lento al cabo de un mes (**Figura 19 A y Tabla 13**). A partir del tumor generado tras la inoculación s.c. de CDS17, establecimos una nueva línea celular derivada del xenógrafo, T-CDS17. La posterior inoculación de esta nueva línea celular T-CDS17 dio

lugar a un crecimiento tumoral más agresivo, con una formación de tumores significativamente mayores en periodos de latencia similares, indicando así que el tumor podía propagarse eficazmente *in vivo* (**Tabla 13**).

El análisis histológico mostró que el tumor original del paciente CDS11 era un condrosarcoma maligno que invadía la matriz ósea intra-trabecular y presentaba tanto zonas bien diferenciadas como zonas desdiferenciadas. No había infiltrado inflamatorio y el subcomponente desdiferenciado mostraba un índice mitótico de 15 mitosis por 10 campos de alta potencia (HPF, 40x). La histología de los tumores originados a partir de la inoculación de la línea CDS11 se parecía a la de las zonas más indiferenciadas/desdiferenciadas del tumor original del paciente, con células tumorales distribuidas de manera difusa en una matriz mesenquimal. No se encontraron en estos tumores ni áreas bien diferenciadas, ni zonas de inflamación y el índice de división mitótica en las células tumorales era de 9 mitosis por 10 HPF (**Figura 19 A**).

En la histología del tumor del paciente CDS17, se observó que se trataba de un condrosarcoma de alto grado que mostraba la diferenciación condroide característica, con células tumorales que presentaban matriz pericelular y estaban rodeadas por una matriz extracelular condroide. En este tumor no había inflamación y su índice mitótico era de 18 mitosis por cada 10 HPF. Los tumores derivados de las líneas celulares CDS17 y T-CDS17 mantenían esta diferenciación condroide característica, con células tumorales que presentaban halos perinucleares y estaban embebidas en una matriz extracelular condroide basófila. Al igual que en el tumor original del paciente, no había zonas de infiltrado inflamatorio y su índice mitótico era de 17 y 25 mitosis por 10 HPF en CDS17 y T-CDS17, respectivamente (**Figura 19 A**).

Con el fin de crear modelos animales más fiables, se inocularon las líneas celulares CDS17 y T-CDS17 intratibia en ratones inmunodeficientes. Tanto la línea celular CDS17 (1 de 2 ratones) como la línea T-CDS17 (2 de 2 ratones) fueron capaces de generar crecimiento tumoral de manera ortotópica. El análisis por tomografía computarizada (CT) 50 días después de la inoculación (**Figura 20**) y el análisis por μ CT en el punto final del experimento

(día 80) (**Figura 19 B**) revelaron la formación de tumores que se asemejan con las características radiológicas de los condrosarcomas humanos de los que proceden.

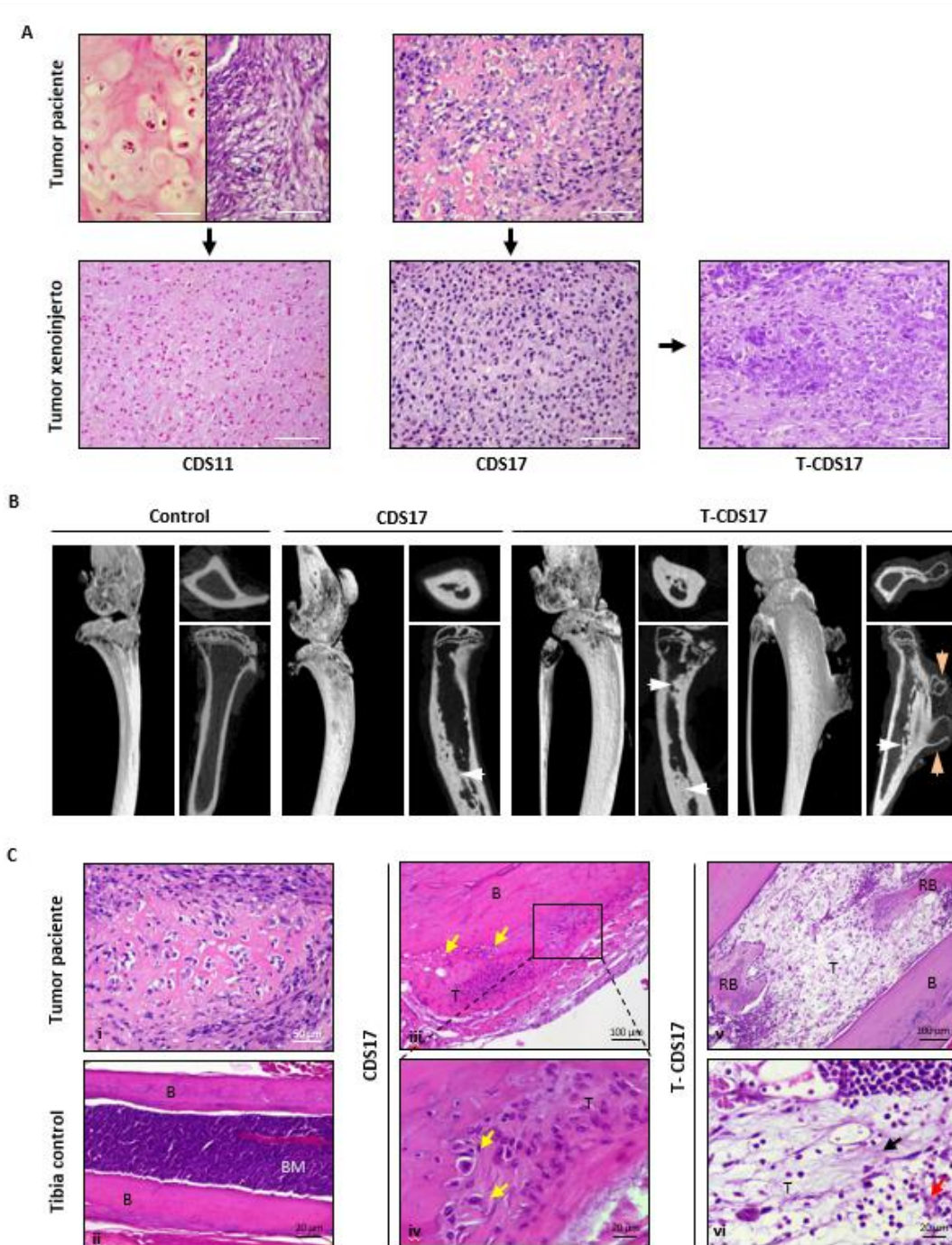


Figura 19. Capacidad tumorigénica *in vivo* de las líneas celulares de condrosarcoma. (A) Análisis histológico (tinción H&E) de los tumores originales de los pacientes y de los tumores desarrollados un mes después de la inoculación subcutánea (s.c.) de las líneas primarias CDS11, CDS17 y T-CDS17 en ratones inmunodeficientes. Se muestran dos áreas diferentes de la muestra del tumor del paciente CDS11. Barras de escala = 150µm. **(B)** Examen radiológico (escáner µCT) de los tumores desarrollados tras la inoculación i.b. de las células CDS17 y T-CDS17 en ratones inmunodeficientes. Se muestran imágenes coronales, sagitales y axiales. En comparación con una pata control, se muestra la formación intramedular de hueso

tumoral/osteoide (flechas blancas) en las tibias inoculadas con ambas líneas celulares. Además, una tibia inoculada con células T-CDS17 presentó una lesión extramedular compatible con las características radiográficas del osteocondroma (flechas naranjas). (C) Tinción H&E de una muestra original del paciente (i), de una pata control (ii) y de los tumores formados tras la inoculación i.b. de las líneas celulares CDS17 (iii y iv) y T-CDS17 (v y vi). Se indican las células condroides (flechas amarillas) y las zonas de matriz osteocondroide fibrilar (flecha negra) y amorfa (flecha naranja). (B: hueso; RB: hueso reactivo).

Estos tumores mostraban una matriz de tipo condroide con patrón punteado dentro de la cavidad de la médula ósea. Además, uno de los tumores generados tras la inoculación de T-CDS17 también mostraba un crecimiento tumoral extra-medular, formando una lesión similar a la exostosis osteocondroide (**Figura 19 B y Figura 20**). Los cortes histológicos de estos tumores crecidos ortotópicamente también se asemejaban a las características principales de la muestra del paciente (**Figura 19 C (i)**), con células tumorales condrogénicas que presentaban halos perinucleares y estaban embebidas en una matriz cartilaginosa (**Figura 19 C (iii,iv)**). Además, las patas inoculadas con células tumorales mostraban cavidades de médula ósea rellenas por células mesenquimales desdiferenciadas que producían matriz osteocondroide fibrilar y amorfa, además de extensas áreas de hueso reactivo (**Figura 19 C (v,vi)**). Ninguno de los tumores presentaba componente inflamatorio y mostraban índices mitóticos entre 7 (CDS17) y 10 (T-CDS17) mitosis por HPF.



Figura 20. Escáner de tomografía computarizada (CT) el día 50 tras la inoculación i.b. de las células CDS17 y T-CDS17 en ratones inmunodeficientes. Se muestran imágenes del eje coronal, sagital y axial. En comparación con la tibia control, en ambas patas inoculadas con las líneas celulares se observa una formación intra-medular de hueso tumoral/osteoide (flechas blancas). Además, la tibia inoculada con las células T-CDS17 presentan una lesión extra-medular compatible con las características radiológicas de un osteocondrosarcoma (flechas naranjas).

2. Caracterización genética de las líneas de condrosarcoma

El análisis de la secuenciación de las mutaciones comunes en condrosarcomas identificó mutaciones puntuales en IDH1 (p.R132L) en la línea celular CDS11 e IDH2 (p.R172G) en las líneas celulares CDS17 y T-CDS17, que también se detectaron en las correspondientes muestras tumorales de los pacientes. Por lo demás, la línea celular CDS06 no mostró ninguna mutación en IDH1 o IDH2. El análisis de TP53 (exones 4 y 6) reveló la presencia de mutaciones homocigotas no sinónimas en todas las líneas celulares. El SNV p.72R se encontró en todas las líneas celulares, así como en las muestras de los pacientes de CDS06 y CDS11, mientras que la variante p.S215R sólo se encontró en las líneas celulares CDS17 y T-CDS17, pero no en la correspondiente muestra de paciente (**Figura 21 A,C**). El análisis adicional de las mutaciones en puntos calientes en la subunidad catalítica alfa del gen fosfatidilinositol-4,5-bifosfato-3-kinasa (PI3KCA) no mostró alteraciones en ninguna de las líneas celulares. Por último, el análisis del número de copias mostró una ganancia significativa de MDM2 en las líneas celulares CDS17 y T-CDS17 que no se detectó en la muestra tumoral y una delección homocigótica de CDKN2A (exón 3) en las células CDS11 y en la muestra correspondiente del paciente (**Figura 21 B,C**).

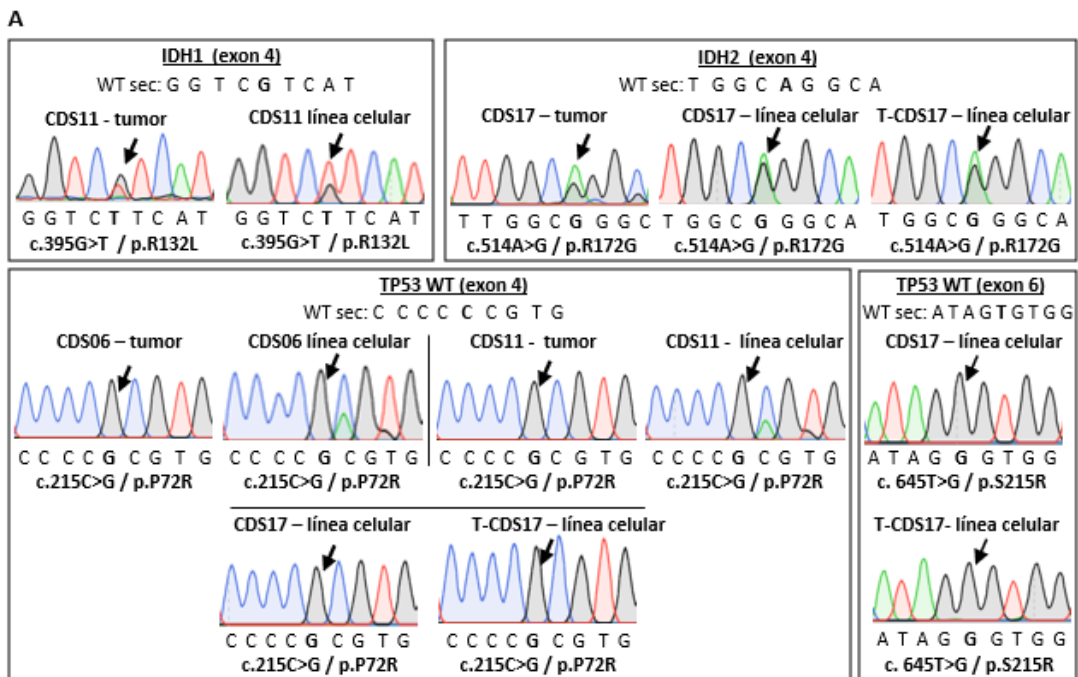


Figura 21. Caracterización genética de las líneas celulares de condrosarcoma. (A) Cromatogramas de secuenciación Sanger que muestran las mutaciones (flechas negras) en los genes IDH1, IDH2 y TP53 presentes en los tumores y en las líneas celulares indicadas. Se muestran las secuencias de referencia WT.

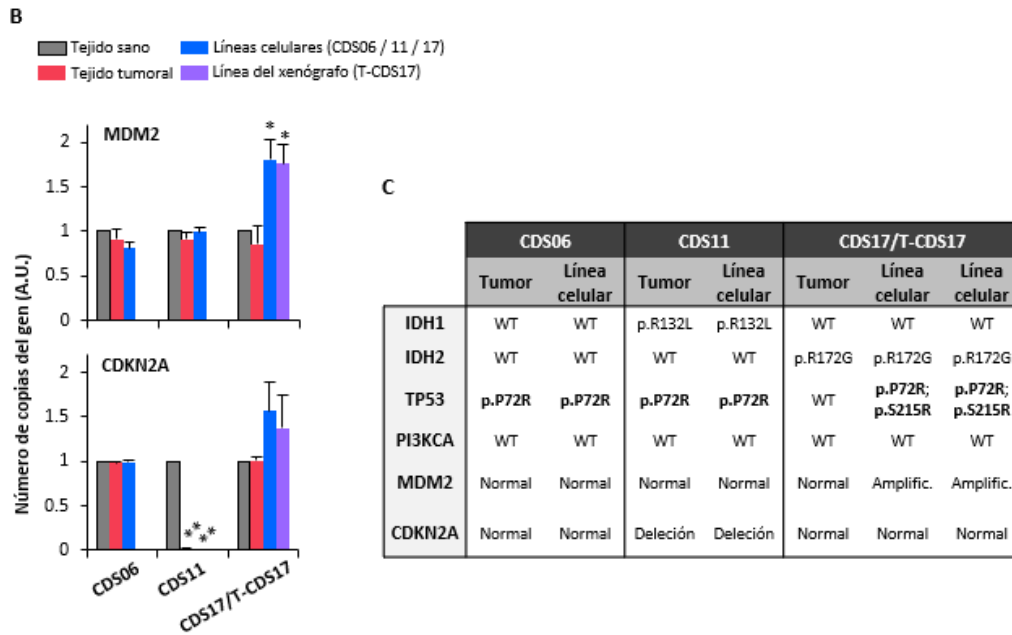


Figura 21 (continuación). (B) El número de copias de los genes indicados se estimó mediante PCR cuantitativa en el ADN genómico. Los resultados se expresan relativizados en relación con la muestra de tejido sano correspondiente y son la media y la desviación estándar de tres experimentos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, prueba *t* de *Student* de dos colas). (C) Resumen de la caracterización genética de las líneas celulares de condrosarcoma y muestras tumorales indicadas. Las mutaciones homocigóticas se destacan en negrita.

3. Secuenciación de exoma completo: evolución clonal de las líneas primarias de condrosarcoma tras el crecimiento *in vitro* e *in vivo*

Para una mejor caracterización de las alteraciones genómicas presentes en estas líneas celulares, realizamos una secuenciación de exoma completo (WES) en la línea celular CDS17 (pase 14), en la línea celular derivada de su xenoinjerto T-CDS17 (pase 5) y en las muestras pareadas del paciente, tanto de tejido sano como tumoral. La cobertura media fue de, aproximadamente, 115X, siendo seleccionadas para los análisis posteriores sólo las variantes que presentaban más de 15 lecturas. Los datos del análisis WES de la muestra tumoral se compararon con los del ADN del tejido normal (sano) para excluir alteraciones de la línea germinal. La muestra de tumor y de la línea celular CDS17 mostraron un número similar de mutaciones somáticas (123 y 121, respectivamente) mientras que la línea celular T-CDS17 mostró un número de mutaciones ligeramente superior (169), correspondiendo la mayoría de ellas a SNV en las tres muestras (**Figura 22 A**). Todas las muestras mostraron un perfil similar de transiciones y transversiones (**Figura 22 B**). Al igual que en otros tipos

tumorales, las transiciones C > T y G > A fueron las mutaciones más comunes encontradas en todas las muestras (**Figura 22 B**). Para analizar la evolución genómica de las células tumorales tras la adaptación al crecimiento *in vitro* e *in vivo*, utilizamos los datos de variaciones en la frecuencia alélica obtenidos de los tumores, las muestras CDS17 y T-CDS17, para perfilar las diferentes poblaciones clonales en cada muestra, utilizando el software PhyloWGS y FishPlot.

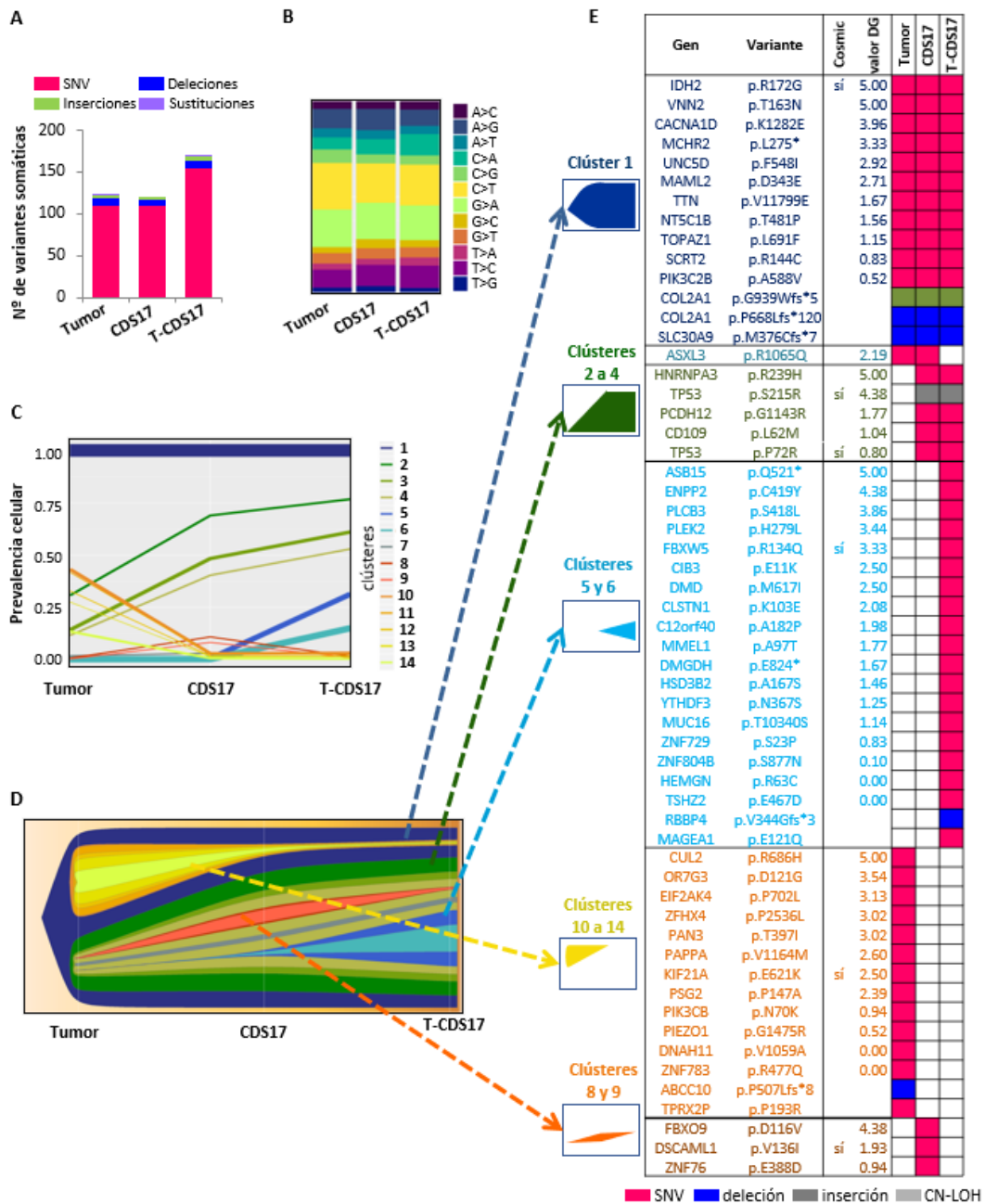


Figura 22. Evolución clonal de las mutaciones somáticas tras el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de las líneas celulares de condrosarcoma. (A,B) Datos de la carga mutacional de la muestra tumoral de paciente y de

Capítulo II

las respectivas líneas celulares derivadas, CDS17 y T-CDS17, obtenido mediante secuenciación de exoma completo (WES). Se muestra el número y tipo de mutaciones somáticas (A) y el perfil de transiciones y transversiones (B) en cada muestra. (C,D) La reconstrucción subclonal se realizó con PhyloWGS utilizando los datos del WES. Se muestran las estimaciones de la prevalencia celular media de los grupos de mutaciones en la muestra tumoral del paciente y en las líneas CDS17 y T-CDS17 derivadas posteriormente. (C) El ancho de las líneas representa la abundancia relativa de las variantes de un solo nucleótido (SNV) en cada grupo de mutaciones. También se muestra la representación, en forma de diagrama *fish plot*, de los diferentes clústeres en cada muestra (D). (E) Lista de mutaciones somáticas no sinónimas detectadas en cada clúster. Se indica el estado en COSMIC (Catálogo de Mutaciones Somáticas en Cáncer), el valor del algoritmo DG (DREAMgenics) y el tipo de mutación.

Este análisis recuperó 14 clústeres que evolucionaron entre las muestras (**Figura 22 C,D**). La muestra del tumor del paciente contiene 9 clústeres que presentan valores de prevalencia celular superior a 0,05. Entre ellos, el clúster 1 es el que incluye un mayor número de SNVs y posiblemente sea el clon fundador, ya que el conjunto de mutaciones que contiene está presente en prácticamente todas las células tumorales (prevalencia celular igual a 1) y los otros clones parecen derivar de él. En particular, la prevalencia celular del clon 1 se mantiene en las muestras CDS17 y T-CDS17, lo que sugiere que la mayoría de las variantes, incluidas las mutaciones conductoras, se mantienen en las líneas celulares. Además, el clúster 7, se mantuvo sin cambios en una pequeña proporción de células en todas las muestras. Por otra parte, los clústeres 2-4 fueron seleccionados positivamente, mientras que los clústeres 10-14 casi desaparecieron durante la adaptación al cultivo *in vitro*, como se observa por su variación en la prevalencia celular en la línea CDS17. Además, los clústeres 5 y 6 surgieron en la línea celular T-CDS17 con una prevalencia celular de 0,25 y 0,15, respectivamente y, probablemente, fueron adquiridos durante el crecimiento *in vitro* de las células tumorales en los ratones inmunodeficientes.

Para seleccionar las mutaciones somáticas más relevantes que presentaban tendencias similares incluidas en cada clúster, comparamos la muestras de tumor frente a la muestra sana, la muestra de CDS17 frente a la muestra de tumor y la muestra de T-CDS17 frente a la muestra de CDS17 y filtramos los resultados para seleccionar las variantes con efecto no sinónimo sobre las proteínas codificadas que presentaban variación de la frecuencia alélica $> 0,035$ en la muestra de tumor, CDS17 o T-CDS17 y frecuencias alélicas máximas $< 0,01$ en las bases de datos poblacionales (dbSNP, ExAC, ESP y 1000 Genomes) (**Figura 22 E**). Utilizando este enfoque, encontramos un grupo de 14 mutaciones incluidas en el clúster 1

que estaban mutadas en todas las muestras. Entre estas mutaciones, sólo la transición c.514A > G (p.R172G) en IDH2, previamente detectada por secuenciación Sanger (**Figura 21 A**) figuraba en el Catálogo de Mutaciones Somáticas en Cáncer (COSMIC). Además, también seleccionamos dos mutaciones diferentes en el gen COL2A1, descritas previamente en condrosarcoma [181, 289]. Las mutaciones en el resto de los genes no se habían descrito previamente en cáncer. En particular, algunas de estas variantes no reportadas, incluyendo SNVs en Vanin2 (VNN2), en la Subunidad 1-alfa-D del Canal de Calcio regulado por voltaje (CACNA1D), en el Receptor de la Hormona Controladora de Melanina (MCHR2), en la Subunidad D del Receptor de Netrina Unc-5 (UNC5D) o en el Coactivador Transcripcional de tipo Maestro 2 (MAML2), mostraron valores elevados en la escala de 0 a 5 asignada por el valor de DREAMgenics (DG) (puntuación integrada de varios algoritmos predictivos [264]) utilizado para predecir mutaciones deletéreas y, por lo tanto, podrían constituir nuevos eventos impulsores en condrosarcomas (**Figura 22 E** y **Figura 23 B**).

Otro grupo de 5 genes mutados se filtró a partir de las variantes incluidas en los clústeres 2-4, enriquecidos en las líneas celulares CDS17 y T-CDS17. Las alteraciones más notables en este grupo fueron las mutaciones p.S215R y p.P72R en el gen TRP53, detectadas previamente por secuenciación Sanger (**Figura 21 A**) y que estaba presente en ambos alelos debido a un evento de CN-LOH en el cromosoma 17. Las variaciones más relevantes que surgieron en las células T-CDS17 (clústeres 5 y 6) incluían mutaciones en 20 genes. Entre ellas, una SNV en F-Box y WD Repeat Domain Containing 5 (FBXW5) y que es la única variación reportada previamente en COSMIC en otros tipos tumorales diferentes al condrosarcoma (**Figura 22 E**). Así mismo, el conjunto de variantes de la muestra tumoral que se perdieron en las líneas celulares CDS17 y T-CDS17 (clústeres 10-14) incluían una mutación en el miembro de la familia Kinesina 21A (KIF21A), previamente reportada en COSMIC para otros tipos de tumor y otras 13 mutaciones no reportadas. Por último, se filtraron 3 mutaciones de las variantes contenidas en los clústeres 8 y 9, que aparecen en una pequeña fracción de las células CDS17 y desaparecen, de nuevo, en las células T-CDS17 (**Figura 22 E**). Además de los cambios descritos anteriormente en las mutaciones somáticas, una de las principales consecuencias del crecimiento in vitro e in vivo de las células tumorales, fue la aparición de alteraciones estructurales y variaciones en el número de

copias (CNV) que dieron lugar a numerosos eventos LOH en muchas de las mutaciones de las líneas celulares CDS17 y T-CDS17 (**Figura 23 A,B**). Las alteraciones estructurales más relevantes detectadas en las células CDS17 y T-CDS17 incluían una CN-LOH que afectaba al cromosoma 17, lo que explicaría las mutaciones homocigóticas del gen TP53 (p.S215R y p.P72R) comentadas anteriormente. El análisis de la frecuencia de variantes en este cromosoma mostró que el CN-LOH afectaba a todo el cromosoma y se detectaba en, prácticamente, todas las células, como indica la desaparición de casi todas las frecuencias intermedias en las células CDS17 y T-CDS17 (**Figura 23 B,C**). Se detectaron eventos CN-LOH similares en el cromosoma 16, aunque en este caso la variación estructural afecta sólo a un subconjunto de las células, como se observa por el cambio en las frecuencias intermedias de las variantes en las líneas celulares en comparación con las muestras sana y tumoral. Cabe destacar que el desplazamiento de las frecuencias intermedias también indicó que la subpoblación que presenta la CN-LOH en el cromosoma 16 aumentó en la línea T-CDS17 en comparación con la CDS17 (**Figura 23 B,C**). Además de estas variaciones de CN, otros eventos de LOH se debieron a CNV en varias cromosomas. Así, se perdió una copia del cromosoma 18 en una subpoblación de células de la línea CDS17 y en toda la población de mutaciones no sinónimas que sufrieron LOH en cada muestra. Por el contrario, se ganó una copia del cromosoma 20 en un subconjunto de células CDS17 y en toda la población de células T-CDS17. Por último, añadir que, otras variaciones del número de copias (CNV) y/o cambios en las frecuencias de las variantes que afectan a subpoblaciones de células CDS17 y/o T-CDS17 también se detectaron en otros cromosomas como 1, 2, 4, 5, 6 o 7.

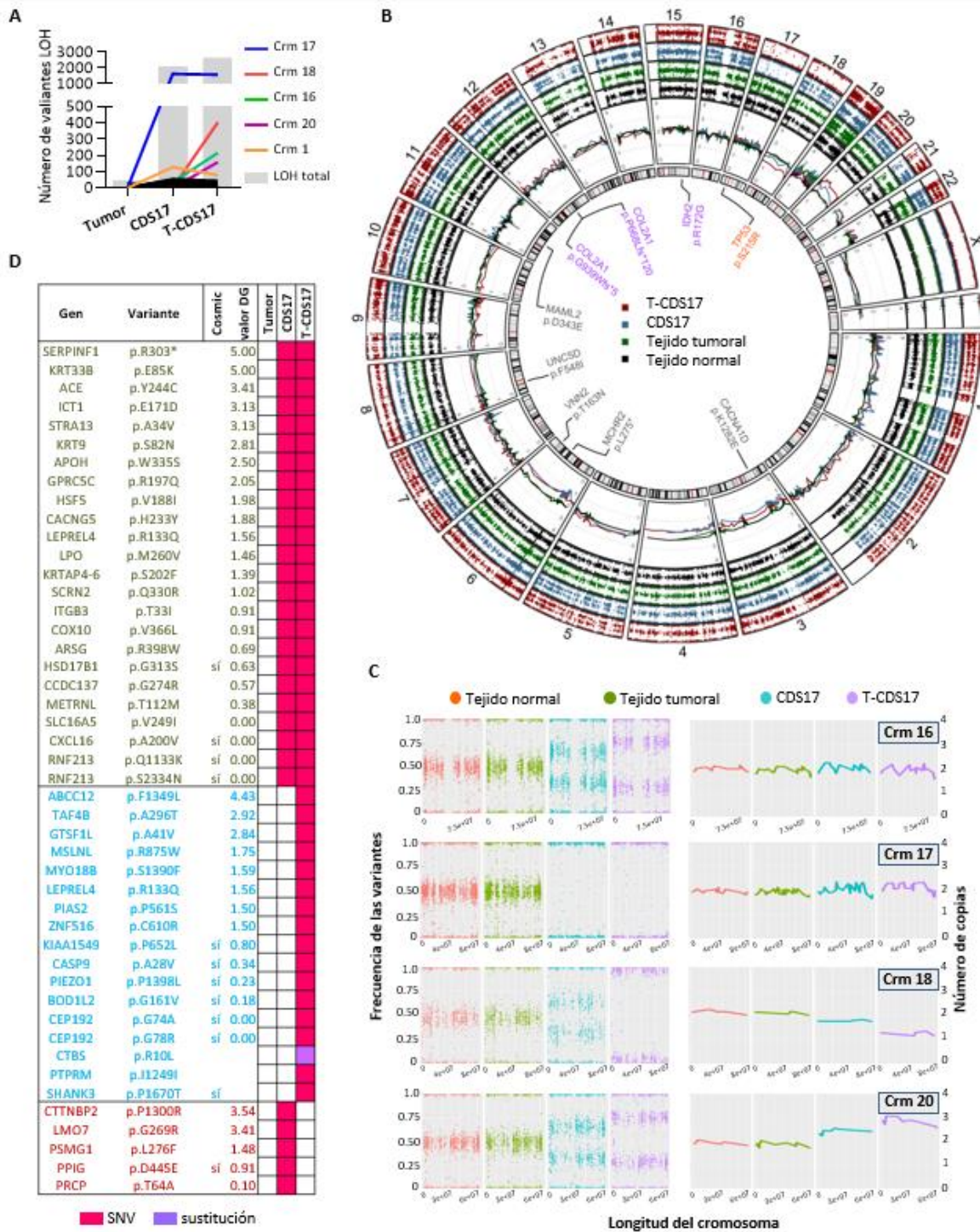


Figura 23. Alteraciones genómicas estructurales tras el crecimiento in vitro e in vivo de las líneas celulares de condrosarcoma. (A) Número de LOH (número total y distribución entre cromosomas) calculado a partir de los datos del WES de las muestras tumorales, CDS17 y T-CDS17. **(B)** Representación circular de las cuatro muestras secuenciadas. En la representación, de dentro hacia afuera: anillo 1 - ideograma cromosómico, resaltando las variantes somáticas relevantes reportadas previamente (púrpura) o no reportadas (gris) compartidas entre el tejido celular, CDS17 y T-CDS17, así como una mutación homocigótica de TP53 compartida por CDS17 y T-CDS17 pero no por el tejido tumoral (naranja); anillo 2 - número de copias cromosómicas (CN) de cada muestra, basado en la normalización en el recuento de lecturas; anillos 3 al 6 - frecuencia de las variantes polimórficas comunes (frecuencia alélica mínima $\geq 0,01$ en, al menos, una población principal de dbSNP) en cada muestra. **(C)** Análisis de las frecuencias de las

variantes (paneles de la izquierda) y número de copias cromosómicas (paneles de la derecha) extraídas de (B) en los cromosomas indicados. Para otros cromosomas, se muestran representaciones similares en la figura 23 B. (D) Lista de mutaciones que sufrieron LOH en las líneas celulares.

Tras filtrar los eventos de LOH utilizando los criterios descritos anteriormente para las variantes somáticas, e incluyendo también otras variantes de LOH con una recurrencia en la base de datos COSMIC superior a 10, seleccionamos 24 mutaciones que sufrieron LOH en CDS17, 17 eventos de LOH que ocurrieron en T-CDS17 y 5 mutaciones que se detectaron como variaciones de LOH en CDS17 pero no en T-CDS17 (**Figura 23 D**). En conjunto, estos datos indican que estas líneas celulares mantuvieron las mutaciones conductoras más relevantes presentes en el clon fundador de la muestra tumoral. Además, la adaptación de las células tumorales al cultivo celular in vitro y el crecimiento in vivo va acompañada de la ganancia/pérdida de mutaciones puntuales adicionales y variantes estructurales que afectan a diferentes subclones de las líneas celulares.

4. Análisis de subpoblaciones de CSCs en las nuevas líneas celulares de condrosarcoma

Todas las líneas celulares (CDS06, CDS11, CDS17 y T-CDS17) pudieron cultivarse como esferas tumorales durante, al menos, dos pases, mostrando frecuencias de formación de esferas entre el 0,20 y el 0,28% en el primer pase y entre el 0,1 y 0,16% en el segundo (**Figura 24 A y Tabla 13**). En cuanto a la expresión de factores relacionados con las células madre tumorales (CSC), las líneas celulares CDS17 y T-CDS17 mostraron niveles alto/medios de SOX2, mientras que no pudimos detectar la expresión de SOX2 en las líneas CDS06 y CDS11 (**Figura 24 B**). Se detectó un patrón de expresión similar para ALDH1A1, mientras que todas las líneas celulares expresaron ALDH1A3 (**Figura 24 B**). De acuerdo con la importante contribución de esta isoforma ALDH1A3 a la actividad del ALDEFLUOR [157], detectamos células positivas al ALDEFLUOR en todas las líneas, en porcentajes que oscilaban entre el 2,94 y el 14,5% de las células (**Figura 24 C**). Como se ha demostrado previamente en otros modelos de sarcoma [157], los cultivos de esferas tumorales de la línea celular CDS11 están enriquecidos en actividad ALDEFLUOR (**Figura 24 D**). Además, para confirmar que el ALDEFLUOR podría utilizarse como marcador de CSC en líneas celulares de condrosarcoma, separamos las células T-CDS17 que mostraban una actividad ALDEFLUOR alta de aquellas que mostraban una actividad ALDEFLUOR baja (**Figura 24 E**) y

las inoculamos en varias dosis celulares bajas (ensayos LDA) por vía s.c. en ratones inmunodeficientes. Encontramos bajas incidencias en el crecimiento tumoral tras la inoculación de estas dosis celulares (detectamos tumores en 4 de 30 ratones). En cualquier caso, las células con actividad ALDEFLUOR baja sólo desarrollaron tumor en la serie en la que se inoculó el mayor número de células, mientras que las células con actividad ALDEFLUOR alta fueron capaces de generar 3 tumores, uno por serie. Utilizando el software ELDA para calcular la frecuencia de iniciación de tumores de cada población, encontramos que la subpoblación con actividad ALDEFLUOR alta está tres veces más enriquecida en células madre tumorales que la subpoblación con actividad ALDEFLUOR baja (**Figura 24 F**). A pesar de que estas células inyectadas a pequeñas dosis celulares muestran baja tumorigenicidad y que estos resultados no son estadísticamente significativos, sí que sugieren claramente que la actividad de ALDH podría ser un marcador de células madre tumorales adecuado en estas líneas celulares.

5. Capacidad de invasión de las líneas celulares de condrosarcoma

Mediante el uso de microscopía de células vivas en tiempo real, descubrimos que los esferoides de CDS11, CDS17 y T-CDS17, pero no de las células CDS06, eran capaces de invadir matrices de colágeno en 3D (**Figura 25 A,B**). De acuerdo con su mayor agresividad, T-CDS17 también mostró un potencial invasivo significativamente mayor en comparación con la línea celular CDS17 parental. Está descrito que la desregulación de la señalización SRC/FAK (Coactivador del Receptor Esteroideo/Quinasa de Adhesión Focal) está relacionada con el aumento de la migración y de la invasión en muchos tipos de tumores. De hecho, anteriormente, descubrimos que varios modelos de sarcoma pueden invadir a través de un mecanismo que depende de la señalización SRC/FAK [166]. En este caso, comprobamos que tanto Dasatinib (inhibidor de SRC) como PF-573228 (inhibidor de FAK), eran capaces de inhibir la invasión celular de forma dosis-dependiente indicando, así, que este mecanismo también está mediando la invasión en las líneas celulares de condrosarcoma (**Figura 25 C-F**).

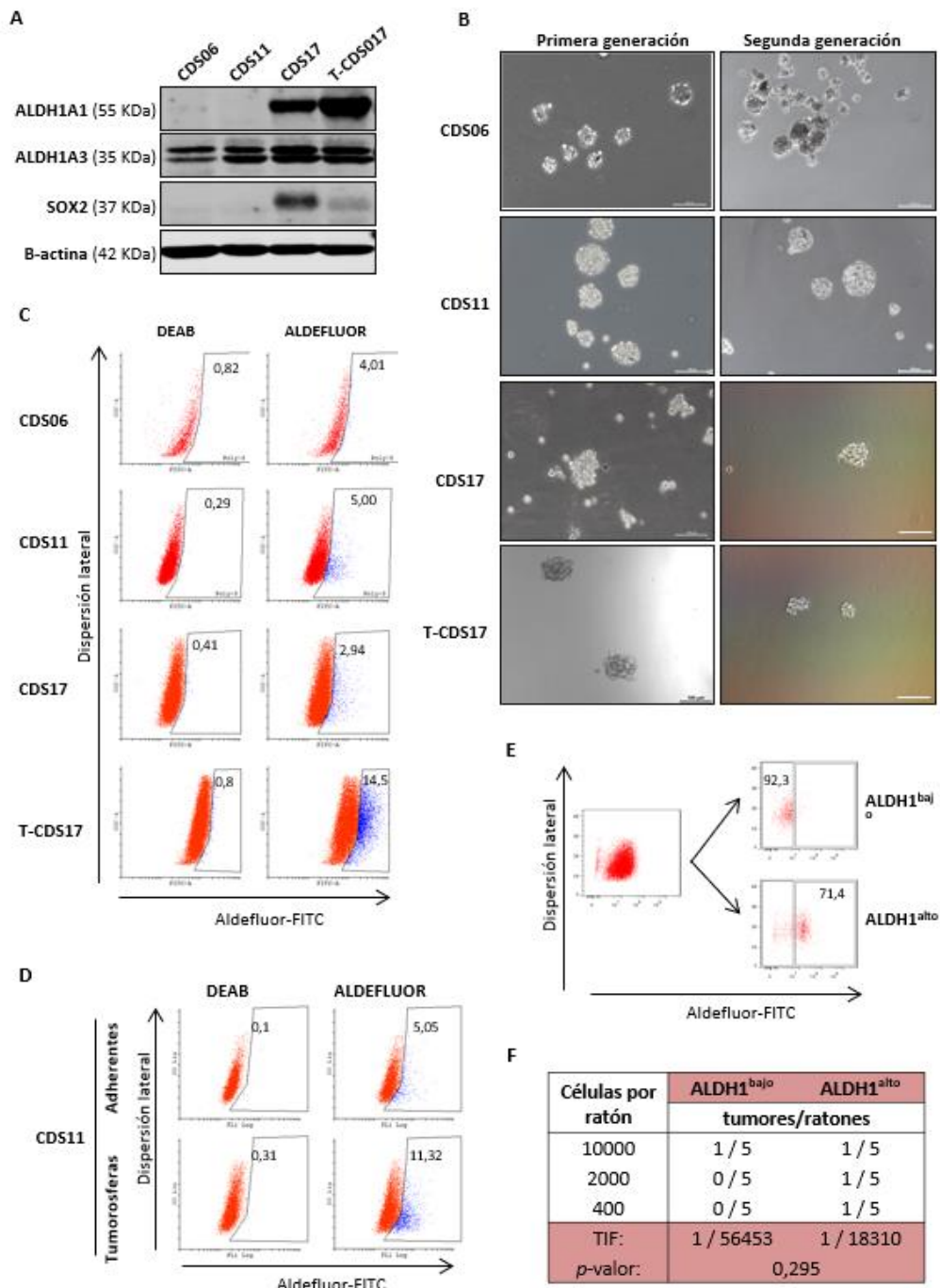


Figura 24. Caracterización de las subpoblaciones de células madre tumorales (CSCs) en las líneas celulares de condrosarcoma. (A) Imágenes representativas de las tumorosferas formadas a partir de las líneas indicadas en dos pases sucesivos. Barra de escala = 100µm. **(B)** Niveles de proteína ALDH1A1, ALDH1A3 y SOX2 en las líneas celulares indicadas. Los niveles de β-actina se usaron como control de carga. **(C)** Ensayo aldefluór que muestra la actividad de ALDH1 en las líneas celulares indicadas. La actividad de ALDH1 se bloqueó con el inhibidor específico N,N-dietilaminobenzaldehído (DAB) para establecer los niveles basales. **(D)** Comparación de la actividad aldefluór en cultivos adherentes y de tumorosferas en la línea CDS11. **(E)** Separación por citometría de flujo de las poblaciones con alta y baja expresión de ALDH1 en células T-CDS17. **(F)** Ensayo de dilución límite para evaluar la frecuencia de iniciación de tumores (TIF) en las células T-CDS17 con alta y baja expresión de ALDH1. Se indica el

Capítulo II

número de ratones que desarrollaron tumores después de cuatro meses y el número total de ratones inoculados para cada condición. El TIF se calculó utilizando el software ELDA.

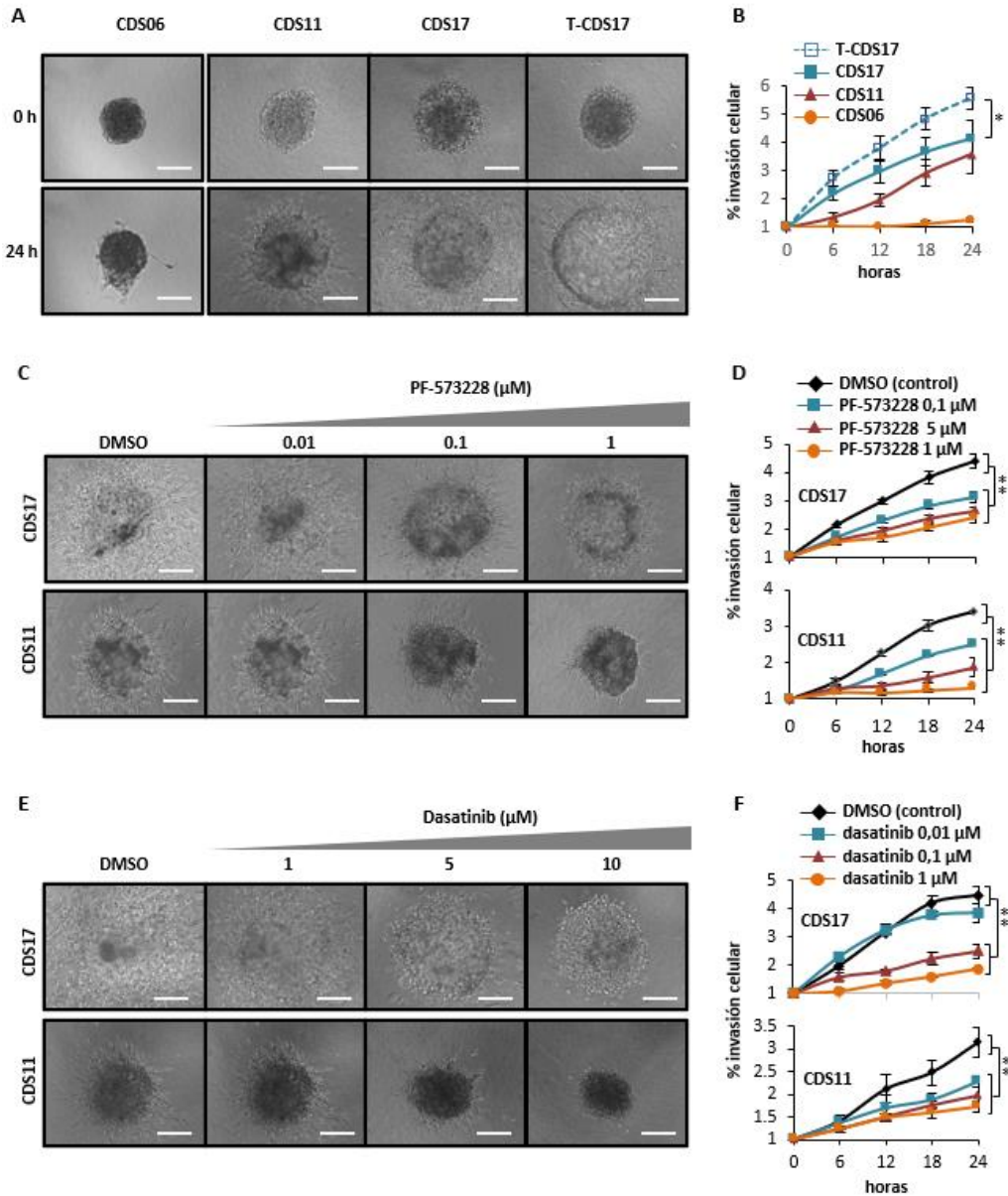


Figura 25. Capacidad invasiva de las líneas celulares de condrosarcoma. (A,B) Análisis de las propiedades invasivas de las líneas celulares indicadas mediante ensayos de invasión de esferoides en 3D. Se muestran imágenes representativas de los esferoides en 3D a tiempo inicial y final (A) y la cuantificación del área de invasión (B). (C-F) Efecto de PF-573228 (C,D) y dasatinib (E) a concentraciones crecientes sobre la capacidad de invasión de las células CDS11 y CDS17. Se muestran imágenes representativas de los esferoides tratados con las concentraciones indicadas de PF-573228 (C) o dasatinib (E) durante 24h y la cuantificación del área de invasión después de cada tratamiento (D,F). Barras de escala = 200 μ m. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las series indicadas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; prueba t de Student de dos colas).

CAPÍTULO III

Efecto de inhibidores específicos de las mutaciones encontradas en los modelos de sarcoma derivados de pacientes

Tras confirmar que nuestros modelos de condrosarcoma mantienen las características más importantes del tumor de origen y que pueden utilizarse para el cribado de fármacos, decidimos testar una serie de inhibidores dirigidos frente a las mutaciones encontradas que nos permitan establecer terapias dirigidas específicas para cada paciente. Las mutaciones en los genes IDH 1 y 2 se encuentran entre las mutaciones más comúnmente detectadas en los condrosarcomas y pueden representar una oportunidad terapéutica. La presencia de enzimas IDH mutadas da lugar a la acumulación del oncometabolito D-2-HG, lo que provoca alteraciones epigenéticas que contribuyen a impulsar el crecimiento del tumor. Entre las alteraciones potencialmente tratables en nuestros modelos de condrosarcoma se encuentra la mutación R132L-IDH1 en CDS11 y R172G-IDH2 en CDS17 y en las respectivas líneas derivadas del xenoinjerto (T-CDS17#1, #3 y #4). Tratamos nuestras líneas primarias con mutación en IDH, así como modelos celulares de condrosarcoma IDH-WT con los inhibidores específicos de IDH mutado ivosidenib (específico de IDH1 mutado), enasidenib (específico de IDH2 mutado) y vorasidenib (dual de IDH1 e IDH2 mutados). Además, ensayamos la eficacia de los inhibidores de la glutaminólisis, metformina y CB-839, de los que se ha reportado que impiden la acumulación de D-2-HG. Veremos la capacidad de estos inhibidores en la reducción de los niveles del oncometabolito y en la eliminación de las células IDH mutadas, así como la capacidad de inhibir las propiedades CSCs. Además, analizaremos el efecto de la administración oral de enasidenib en un modelo animal generado mediante xenoinjertos subcutáneos de T-CDS17. Por último, detallaremos qué alteraciones sobre el paisaje de la metilación y sobre la expresión génica produce el tratamiento *in vitro* con enasidenib en nuestra línea celular derivada de condrosarcoma desdiferenciado con mutación en IDH2.

1. Identificación de mutaciones diana en sarcomas de pacientes

El objetivo de este estudio era encontrar mutaciones accionables en las líneas celulares establecidas en nuestro laboratorio derivadas de sarcomas humanos. Para ello, en este análisis incluimos tanto muestras de tumor como las respectivas líneas celulares derivadas de ellos (CDS11 y CDS17) de dos casos de condrosarcoma, así como varias líneas celulares establecidas a partir de los xenoinjertos formados por CDS17 (T-CDS17#1, #3 y #4) que, como ya hemos visto, teníamos caracterizadas (**Tabla 12** y **Tabla 13**). Además, incluimos dos casos de sarcoma pleomórfico indiferenciado y las respectivas líneas celulares derivadas (SARC06 y SARC20), un sarcoma sinovial y su correspondiente línea establecida (SYN01) y otro caso de condrosarcoma con la línea celular derivada (CDS20) (**Tabla 8**).

En primer lugar, realizamos la secuenciación de nueva generación de un panel de 160 genes implicados en el desarrollo de cáncer, tanto en las muestras tumorales, como en los modelos derivados de ellas (SARC06, SARC20, SYN01 y CDS17). Los datos obtenidos, tanto de la muestra de tumor como de la línea celular, se compararon con el ADN del tejido sano de cada paciente para excluir aquellas alteraciones de la línea germinal. Una vez descartadas, seleccionamos aquellas mutaciones somáticas conductoras en cada uno de los casos, filtrando los resultados para seleccionar las variantes que tuvieran efecto no sinónimo con frecuencias alélicas $> 0,3$ en las muestras tumorales y en las líneas celulares y frecuencias alélicas máximas $< 0,01$ en las bases de datos poblaciones (dbSNP, ExAC, ESP y 1000 Genomes).

Utilizando los criterios descritos, encontramos 3 mutaciones somáticas compartidas por la muestra de tumor y la línea celular: SETD2 (E2089*) y TP53 (V173L) en SARC06 e IDH2 (R172G) en CDS17/T-CDS17#1. Además, encontramos mutaciones en TSC1 (S331R) y TP53 (S215R), que aparecen de nuevo en las líneas celulares SARC20 y CDS17/T-CDS17, respectivamente, reflejando así cierto nivel de deriva genética de las líneas celulares durante su adaptación a las condiciones de crecimiento *in vitro*. Por último, en el caso de SYN01 no encontramos mutaciones relevantes (**Figura 26 A**).

Todas las mutaciones detectadas en este panel de genes se confirmaron mediante secuenciación Sanger (**Figura 26 B**). Además, gracias a esta secuenciación, también se

confirmó la presencia de la mutación IDH2 (R172G) en otras líneas celulares derivadas de los xenoinjertos generados por CDS17 (T-CDS17#3 y T-CDS17#4), así como la mutación oncogénica heterocigótica en IDH1 (R132L) en la línea CDS11 y su respectivo tumor, como ya vimos anteriormente en el capítulo II apartado 2. En la línea celular CDS20 y en el tumor de origen no se encontraron mutaciones ni en IDH1 ni en IDH2.

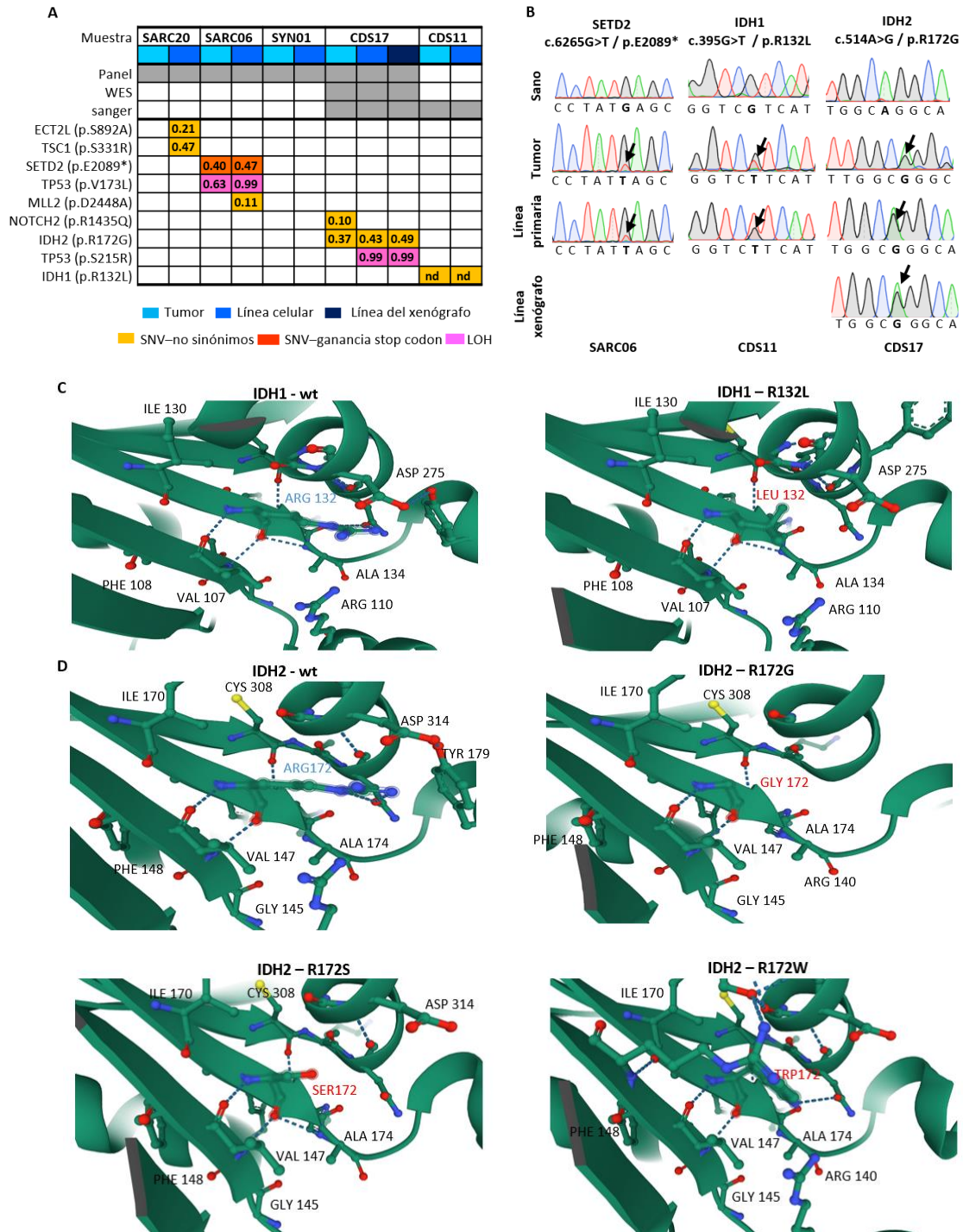


Figura 26. Mutaciones descritas en nuestros modelos derivados de sarcoma. (A) Mutaciones somáticas compartidas entre la muestra tumoral y la línea celular en cinco modelos derivados de sarcomas de pacientes. (B) Validación de las mutaciones por secuenciación Sanger. (C-D) Predicción *in silico* de los cambios conformacionales originados por la mutación en IDH1 (C) e IDH2 (D).

En cuanto a la mutación encontrada en IDH2, en el caso de los condrosarcomas, las más comúnmente reportadas en el residuo R172 incluyen las variantes R172S (50%), R172G (30%), R172W (10%) y R172T (10%) [290]. Es importante destacar que, hasta el momento, sólo se han descrito tres modelos celulares de condrosarcoma con mutación en IDH2, siendo nuestra línea celular CDS17 y las relacionadas con ella, procedentes de los xenoinjertos, el único modelo que presenta la variante R172G.

En lo que respecta a la mutación encontrada en IDH1, en condrosarcomas los SNV reportados en el residuo R132 incluyen R132C (44%), R132G (17%) y R132L (11%), entre otros [290]. En este caso, hasta el momento, sólo se han descrito cuatro modelos celulares de condrosarcoma portadores de mutaciones en IDH1, siendo la línea celular CDS11 el único modelo que presenta la variante IDH R132L.

Como se muestra en la **Figura 26 C,D**, la arginina R172 en IDH2 y la R132 en IDH1 están situadas en la zona de unión al isocitrato, donde estos y otros residuos forman enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofílicas con los grupos carboxilo del isocitrato y activan su conversión catalítica a α -cetoglutarato [291, 292]. La presencia de las variantes R172S/G/W en IDH2 o las variantes R132C/G/L en IDH1 inducen cambios conformacionales similares en la zona de unión del isocitrato a estas enzimas, lo que conduce a la formación del D-2-HG.

2. Mutaciones en IDH como diana terapéutica en condrosarcomas

Dado el importante papel de las mutaciones de IDH en los condrosarcomas y la disponibilidad existente de fármacos dirigidos específicamente contra estas mutaciones, nos centramos en estudiar su efecto en nuestros modelos de condrosarcoma mutados en IDH. Además, en estos análisis también incluimos dos líneas celulares de condrosarcoma con mutaciones en IDH2 que ya han sido reportadas previamente: SW1353 (IDH2-R172S) y L2975 (IDH2-R172W) [293].

En los ensayos de supervivencia celular dosis-respuesta, comprobamos que la línea celular CDS17 y sus líneas celulares asociadas derivadas de xenoinjertos (T-CDS17#1, #3 y #4), todas ellas portadoras de la variante IDH2-R172G, eran sensibles a bajas concentraciones (en el orden μM) del inhibidor específico frente a IDH2 mutado, enasidenib (IC_{50} entre 16,65 y 22,65 μM) (**Figura 27 A, B**). Además, en estos experimentos, la línea SW1353 (IDH2-R172S) mostró una sensibilidad intermedia (IC_{50} de 49,47 μM), mientras que las líneas CDS11 (IDH1-R132L) y L2975 (IDH2-R172W) fueron parcialmente resistentes al efecto de enasidenib (IC_{50} = 63,53 y 73,65 μM , respectivamente) (**Figura 27 A, B**).

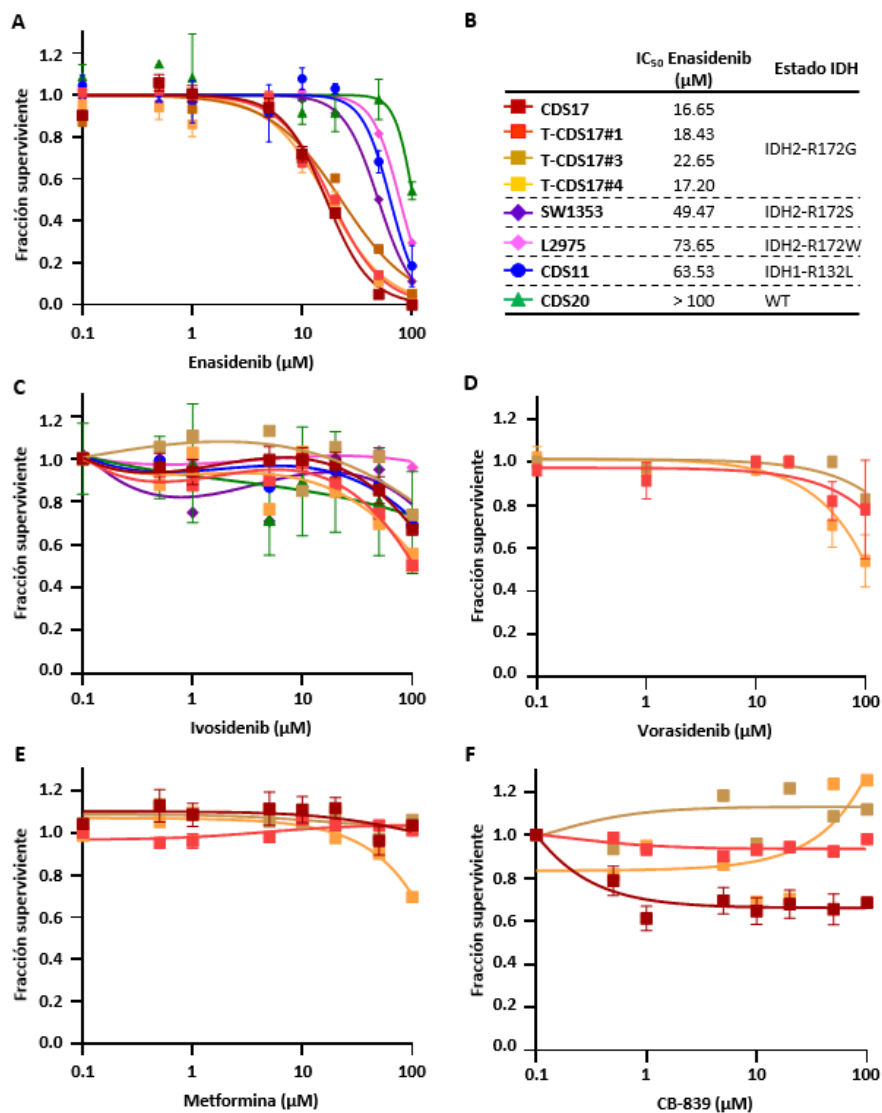


Figura 27. Efecto dosis-respuesta de compuestos inhibitorios en las líneas derivadas de condrosarcomas. (A-F) Viabilidad celular (WST-1) medida tras el tratamiento con concentraciones crecientes de enasidenib (A), ivosidenib (D), metformina (E) y CB-839 (F) durante 72 h en líneas celulares de condrosarcoma con IDH mutado y WT. Se muestran los valores IC_{50} del tratamiento con

enasidenib en cada una de las líneas (B). Las barras de error representan la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Por último, la línea CDS20 (IDH-WT) fue totalmente resistente al efecto del inhibidor ($IC_{50} > 100 \mu M$) (**Figura 27 A, B**). Por otro lado, cuando se trataron las células con el inhibidor específico de IDH1 mutado, ivosidenib (**Figura 27 C**) o con el inhibidor dual de ambas formas mutadas (IDH1 e IDH2), vorasidenib (AG-881) (**Figura 27 D**), ninguna de ellas mostró una respuesta significativa al efecto de estos fármacos.

Otro tipo de terapia anti-IDH mutado que ha sido probada en condrosarcomas se basa en la inhibición de las vías de producción del α -KG, el sustrato que necesitan las enzimas mutantes IDH1 e IDH2 para la producción del oncometabolito D-2-HG. En este contexto, se han probado inhibidores de la glucólisis y de la glutaminólisis, como son la metformina y el CB-839 en diferentes líneas celulares de condrosarcoma[242]. En este trabajo, hemos descubierto que ninguno de estos fármacos fue capaz de reducir la viabilidad celular en los dos modelos mutantes en IDH2 que mejor respuesta habían mostrado a enasidenib, CDS17 y T-CDS17 (**Figura 27 E,F**).

De acuerdo con el gran efecto de enasidenib en el modelo CDS17, confirmamos que el tratamiento de las células T-CDS17#3 con este inhibidor producía una fuerte reducción dosis-respuesta en los niveles intracelulares de D-2-HG (**Figura 28 A**).

Con el fin de continuar estudiando los efectos anti-proliferativos de enasidenib en las líneas mutantes para IDH, realizamos ensayos de formación de colonias en T-CDS17#1, SW1353, CDS11 y CDS20 tras el tratamiento con concentraciones crecientes de enasidenib. De manera similar a nuestros resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular, encontramos que las líneas T-CDS17#1 y SW1353 fueron las más sensibles, mientras que CDS11 fue mucho menos sensible y CDS20 fue completamente resistente al efecto del inhibidor (**Figura 28 B, C**).

Las células derivadas del modelo CDS17 fueron capaces de crecer como esferas tumorales en suspensión, manteniendo las propiedades relacionadas con las CSC, como ya vimos anteriormente en el capítulo II apartado 5. Para comprobar si enasidenib también puede

dirigirse frente a estos modelos 3D, tratamos cultivos de tumosferas generadas a partir de la línea T-CDS17#1 con concentraciones crecientes del inhibidor durante 96 horas. Tras este periodo, las esferas clonales mostraron una morfología alterada e irregular y tanto el número como la viabilidad de estas disminuyeron drásticamente de manera dosis-dependiente (**Figura 28 D-F**).

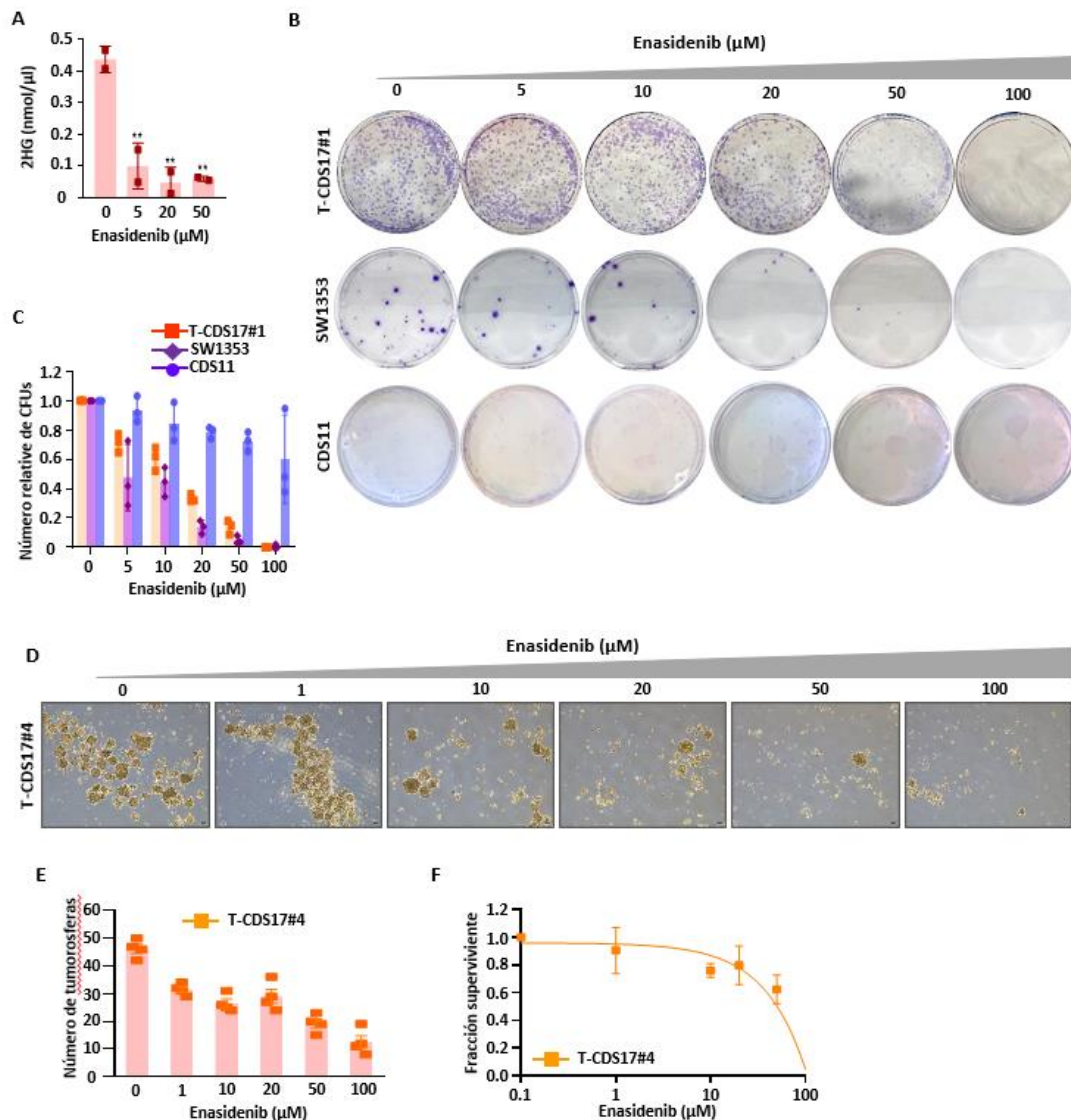


Figura 28. Efecto de enasidenib en las líneas celulares de condrosarcoma con mutación en IDH2. (A) Niveles de D-2-HG después del tratamiento de T-CDS17#3 con concentraciones crecientes de enasidenib. Las barras de error representan la desviación estándar de cada réplica experimental y los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas. (B,C) Ensayo de formación de colonias en células T-CDS17#1, SW1353 y CDS20 tratadas con concentraciones crecientes de enasidenib durante 24 h y dejándolas crecer como colonias durante 10 días. (D-F) Tumosferas de T-CDS17#4 tratadas con concentraciones crecientes de enasidenib durante 96 h después de haber formado esferas flotantes durante 12 días. Se muestran imágenes representativas del cultivo de esferas (D), cuantificación (E) y viabilidad celular (WST-1) (F). Barras de escala = 100 μm. Las barras de error representan la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

3. Efecto de enasidenib en la metilación del ADN y la expresión génica en las células de condrosarcoma

El efecto terapéutico de enasidenib y de otros inhibidores dirigidos contra mutaciones en IDH en patologías tales como LMA y glioma se asoció a una recuperación en la actividad que se encontraba reprimida por el efecto del oncometabolito D-2-HG en las dioxigenasas dependientes de α -KG, con el consiguiente restablecimiento de los niveles normales de metilación del ADN [294, 295].

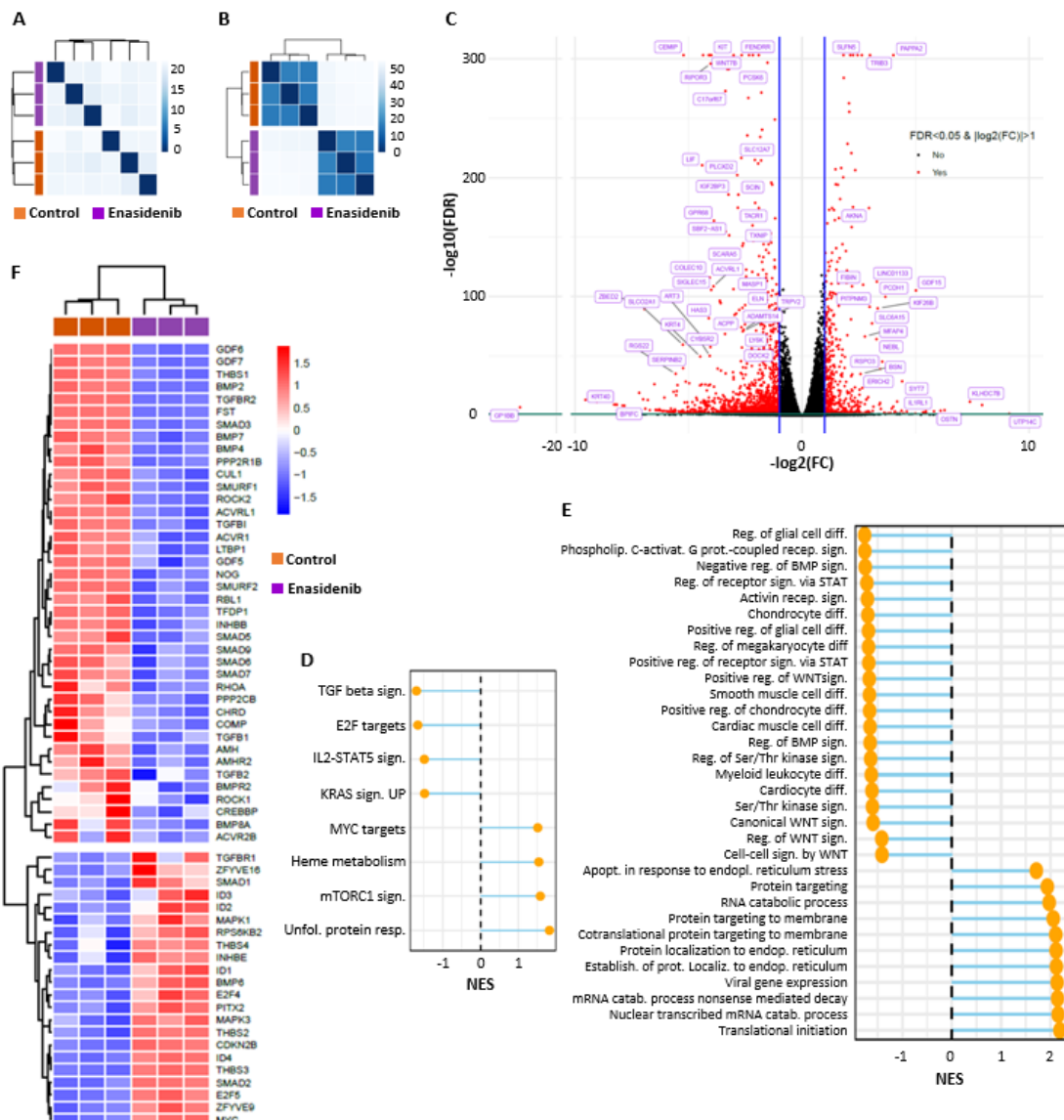


Figura 29. Análisis de metilación y transcriptómica de las células de condrosarcoma tratadas con enasidenib. El tratamiento de T-CDS17 con enasidenib no provoca cambios en el perfil de metilación (A) pero sí que provoca profundos cambios sobre el perfil de expresión génica (B). (C) *Volcano plot* mostrando aquellos genes significativamente sobreexpresados y regulados a la baja. (D,E) Vías de señalización alteradas. (F) Principales factores que controlan la vía de señalización TGF β /BMP.

Sorprendentemente, el análisis del perfil de metilación del ADN en nuestra línea T-CDS17#1 control y tratadas con enasidenib no mostró cambios significativos en los niveles de metilación de 5mC entre ambas condiciones (**Figura 29 A**). En claro contraste con este hallazgo, los análisis de secuenciación de ARN de estas muestras mostraron que enasidenib indujo una profunda remodelación del paisaje transcriptómico de las células T-CDS17#1. A diferencia del efecto de enasidenib sobre la metilación del ADN, los análisis transcriptómicos mostraron diferencias significativas entre las distancias euclidianas de muestra a muestra de las células tumorales tratadas con el fármaco y las células tumorales control (**Figura 29 B**). A continuación, seleccionamos los genes diferencialmente expresados (DEG, por sus siglas en inglés, *Differentially Expressed Genes*) en las muestras tratadas respecto al control (**Figura 29 C**). Encontramos una mayor proporción de genes *down*-regulados (1038) que *up*-regulados (417). Entre los factores relevantes *down*-regulados encontramos genes como LIF, KIT, WNT7B, ACVRL1 o BMP2. Por el contrario, el tratamiento con enasidenib *up*-reguló genes como RSP03, ILRL1, GDF15, BEX2 o DDIT4 (**Figura 29 C**).

El análisis GSEA de los DEGs reveló una regulación al alza de vías de señalización relevantes como la respuesta a las proteínas no plegadas, la señalización mTORC1 o la regulación de las dianas de c-Myc. Por otro lado, las vías de señalización como la de TGF β , dianas de E2F, señalización de IL2-STAT5, señalización de KRAS, diferenciación condrocítica o la regulación positiva de la señalización de WNT se encontraron reguladas a la baja (**Figura 29 D,E**). Entre estas vías, se sabe que la señalización de TGF β /BMP desempeña un papel clave en la regulación tanto del crecimiento tumoral como de la diferenciación osteocondrogénica [296] y se encontró que estaba activa en condrosarcoma [297]. En particular, el tratamiento con enasidenib indujo la desregulación de muchos de los principales factores que controlan estas vías de señalización. Así, la expresión de ligandos como TGFB1, TGFB2, BMP2, BMP4 o BMP7; de receptores como TGFBR2, ACVR1 (ALK2), ACVRL1 (ALK1) o BMPR2; y de reguladores transcripcionales descendentes como SMAD2, SMAD5 o SMAD6 disminuyeron con el tratamiento del fármaco. Además, poniendo de manifiesto la compleja regulación de esta vía, otros factores importantes de la misma, como BMP6, TGFBR1, SMAD1 y SMAD2, fueron *up*-regulados por enasidenib (**Figura 29 F**).

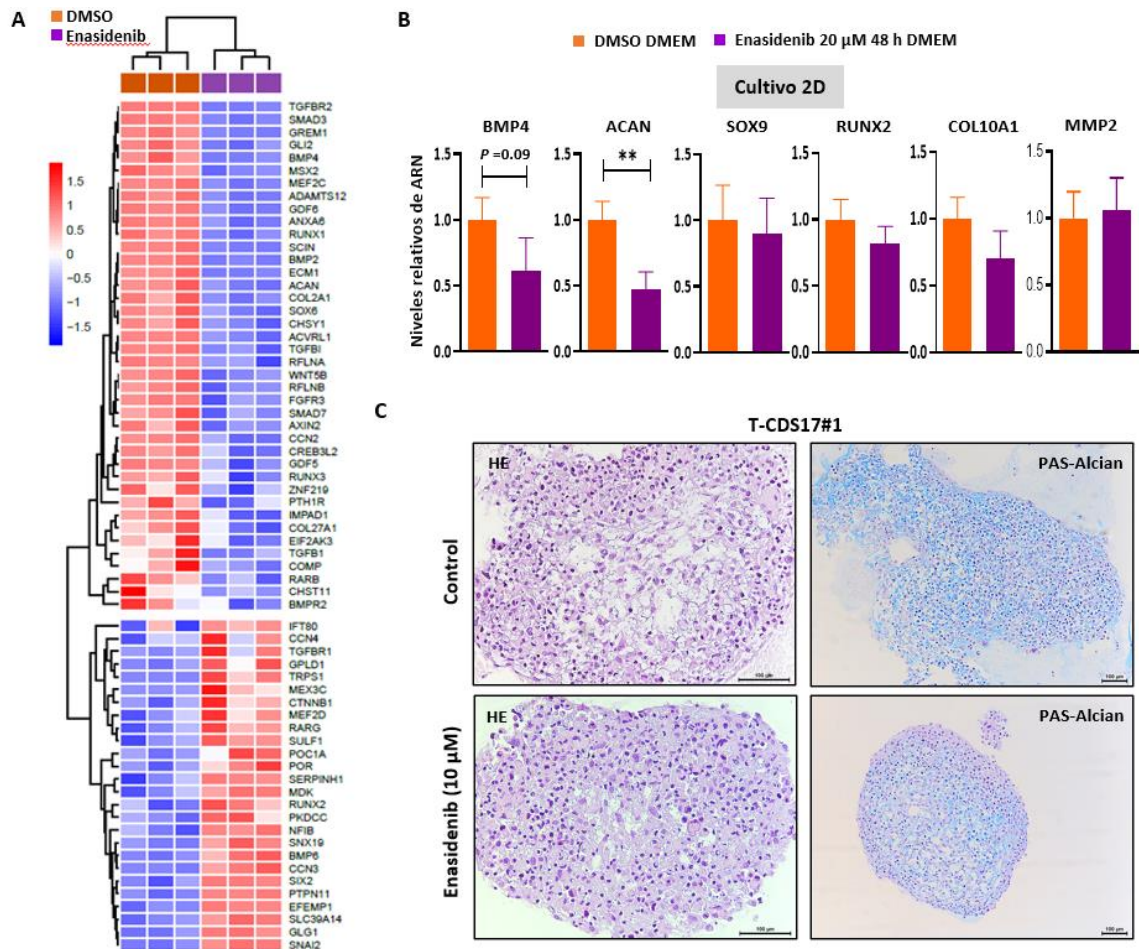


Figura 30. Efecto del tratamiento con enasidenib sobre el proceso de diferenciación condrogénica. (A) Alteración de los genes implicados en el proceso de diferenciación condrogénica en condición control (naranja) y tratamiento (morado). **(B)** Validación por RT-qPCR de los genes aumentados, disminuidos o no alterados tras el tratamiento con 20 μ M de enasidenib durante 48 h. Las barras de error representan la desviación estándar de cada réplica experimental y los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas. **(D)** Imágenes representativas de las tinciones H&E y PAS-alcian de T-CDS17#1 crecida en cultivo no adherente durante 21 días con enasidenib 10 μ M. Barras de escala = 100 μ m.

El tratamiento con enasidenib también indujo una profunda desregulación de los genes implicados en el proceso de diferenciación condrogénica (**Figura 30 A**). La expresión de muchos de estos genes se vio *down*-regulada, incluyendo los relacionados con la señalización de TGF β y otros genes relacionados con la diferenciación osteocondral, como COL2A1, RUNX3, ACAN, MMP13 o SOX6. En cualquier caso, otros factores clave implicados en la diferenciación terminal de los condrocitos, como RUNX2 y SPP1 [298] aumentaron su expresión tras el tratamiento con enasidenib. La regulación de algunos genes disminuidos (BMP4 y ACAN), aumentados (RUNX2) o no regulados (SOX9 y COL10A1) se confirmó mediante RT-qPCR (**Figura 30 B**).

Para comprobar si estos cambios transcripcionales inducidos por enasidenib daban lugar a una alteración funcional del potencial de diferenciación de las células T-CDS17#1, realizamos un ensayo de diferenciación condrogénica en el que esferoides celulares cultivados en medio de diferenciación fueron expuestos o no a una concentración sutil de enasidenib durante 21 días. A pesar de la regulación transcripcional inducida por enasidenib, estos experimentos no mostraron diferencias en la capacidad de diferenciación condrogénica de las células T-CDS17#1 control y tratadas con enasidenib (**Figura 30 C**), pudiendo sugerir que se produce una activación de mecanismos de diferenciación compensatorios.

En resumen, estos análisis sugieren que, más que la modulación de los niveles de metilación, la actividad antitumoral de enasidenib en las células de CDS con mutación en IDH2 está mediada, probablemente, por una regulación transcripcional de las vías clave de señalización.

4. Efecto de enasidenib *in vivo*

Por último, nos propusimos comprobar la eficacia de enasidenib *in vivo*. Por lo tanto, tratamos a ratones inmunodeficientes portadores de xenoinjertos de T-CDS17#1 con el vehículo o con 35 mg/kg de enasidenib dos dosis diarias durante 21 días. Un protocolo similar se utilizó con éxito para tratar modelos *in vivo* de AML [244]. El tratamiento con enasidenib inhibió completamente el crecimiento tumoral e, incluso, provocó regresiones tumorales en el punto final del experimento (**Figura 31 A**). Asimismo, el peso de los tumores en la serie control duplicó el de la serie tratada con enasidenib al final del experimento (**Figura 31 B**). El examen histológico demostró que, de acuerdo con los ensayos *in vitro*, el tratamiento con enasidenib no tiene un impacto en el estado de diferenciación tumoral. Así, tanto los tumores control como los tratados con enasidenib mostraban una proporción similar de áreas con células condrogénicas diferenciadas (PAS-alcian positivo) e indiferenciadas (PAS-alcian negativo) (**Figura 31 C,D**). Por otra parte, los tumores de los ratones tratados con enasidenib mostraron una proporción significativamente menor de células con tinción positiva para el marcador de proliferación Ki67 (**Figura 31 E**).

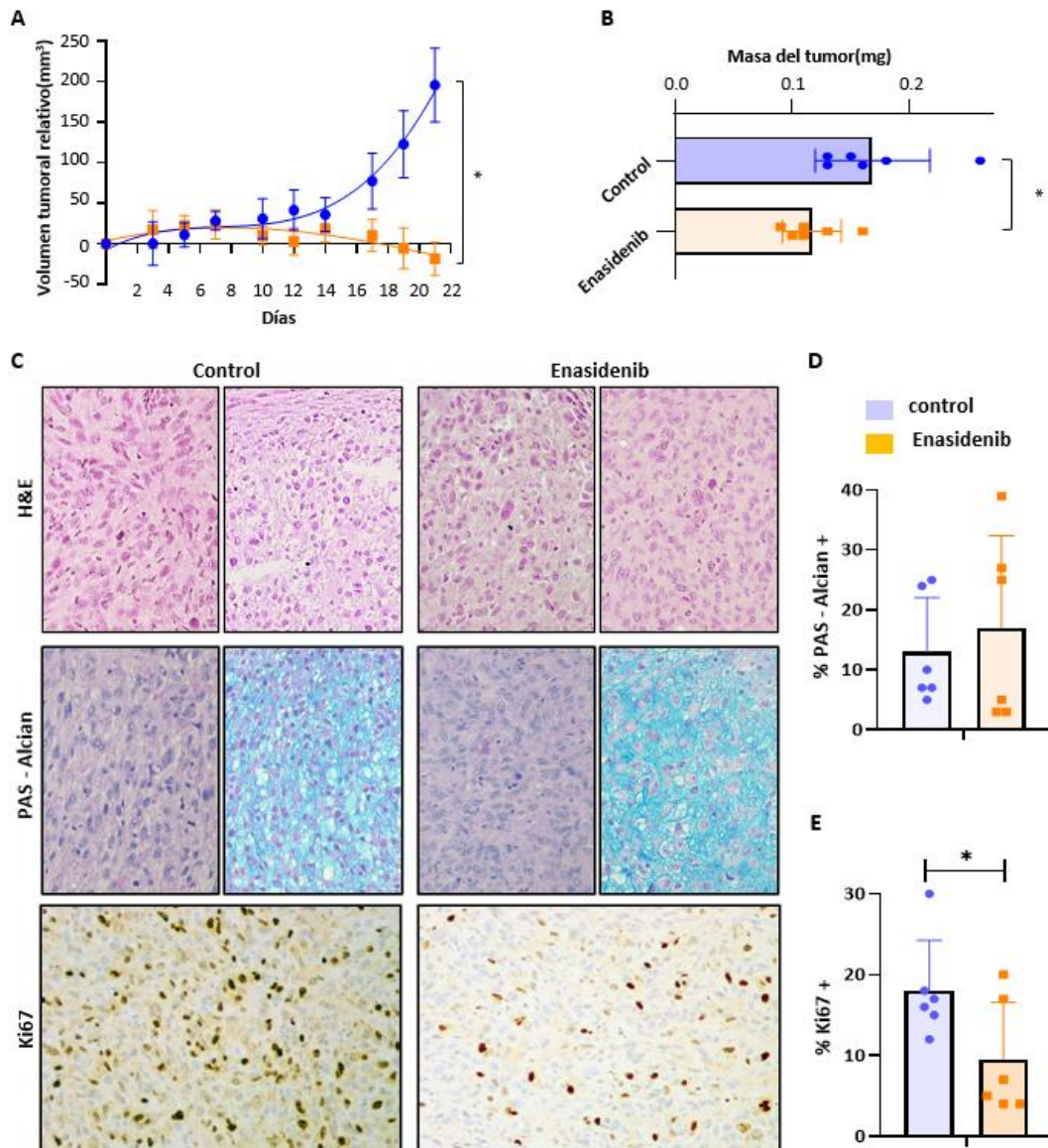


Figura 31. Efecto de enasidenib *in vivo*. Los xenógrafos de T-CDS17#1 fueron aleatoriamente asignados en dos grupos (n=6/grupo) y tratados de manera oral con vehículo (metilcelulosa y tween 80) y 35 mg/kg de enasidenib dos veces al día de manera diaria durante 21 días. **(A)** Curvas representativas de la cinética del crecimiento tumoral. **(B)** Peso medio del tumor al final del experimento. **(C-E)** Análisis histológico de los tumores fijados en formalina y embebidos en parafina al final del experimento. **(C)** Imágenes representativas de las tinciones de H&E, PAS-alcian y Ki67. Tanto los tumores control como los tratados muestran una proporción similar de áreas con células condrogénicas diferenciadas **(D)** e indiferenciadas, mientras que los tratados muestran una proporción menor de Ki67 **(E)**.

DISCUSIÓN

La heterogeneidad intratumoral es una de las causas que explica las altas tasas de recaídas observadas tras el tratamiento con las terapias estándar en los tumores más avanzados. Al igual que las neoplasias hematológicas y otros tumores sólidos, la heterogeneidad intratumoral en los sarcomas puede explicarse, al menos en parte, por la aparición de subpoblaciones de CSCs que guían el crecimiento y la diseminación del tumor. Por tanto, resulta fundamental poder detectar y aislar las subpoblaciones tumorales con mayor capacidad tumorigénica, en las cuales reside la capacidad de propagación del tumor y que poseen propiedades que las hacen resistentes a las terapias existentes (I).

El fenotipo CSC en sarcomas está mantenido por la expresión de factores de pluripotencia tales como OCT3/4, NANOG, KLF4 y SOX2 [82, 147, 151, 299]. Entre ellos, se ha demostrado que SOX2 es un factor común relacionado con las CSCs en diferentes tipos de sarcoma [82, 300]. El papel pro-tumorigénico de SOX2 ha sido particularmente bien descrito en modelos de osteosarcoma, donde la eliminación de este factor en líneas celulares de osteosarcoma o en el linaje osteoblástico de un modelo de ratón de osteosarcoma dio como resultado la pérdida del potencial proliferativo *in vitro* y una drástica reducción de la formación de tumores *in vivo* [301-303]. Además del osteosarcoma, también se han reportado indicios de que SOX2 desempeña un papel en el mantenimiento del fenotipo CSC y/o pro-tumorigénico en sarcoma de Ewing [304, 305] y en rhabdomyosarcoma embrionario [306]. Además, el nivel de expresión de SOX2 en un panel de líneas celulares de sarcoma primario se ha correlacionado positivamente con la capacidad de generar tumores en ratones inmunodeficientes [146].

En línea con estos trabajos anteriores, nuestros experimentos empleando secuencias de ARN de silenciamiento amplían los hallazgos sobre el papel clave de SOX2 en el mantenimiento de la tumorigenicidad en un modelo de UPS. Además, mostramos que la sobreexpresión de SOX2, explorada por primera vez en el sarcoma, también apoya el papel destacado de SOX2 en la sarcomagénesis.

Encontramos que SOX2 se expresa en el 28% de un total de 88 pacientes con sarcoma, siendo los UPS, los sarcomas sinoviales y los sarcomas de Ewing los que presentan un mayor porcentaje de casos positivos en concordancia con los resultados reportados previamente

[307, 308]. En nuestra serie de pacientes, la expresión de SOX2 se correlacionó significativamente con el grado tumoral, la baja diferenciación, el potencial invasivo y la mala supervivencia de los pacientes. Recientemente, se han reportado resultados similares para el sarcoma de Ewing [307], lo que refuerza su papel clave en el desarrollo del sarcoma y la progresión de la enfermedad. Por otro lado, la importancia clínica de la expresión de OCT4 apenas se ha abordado en los sarcomas. En nuestra serie de muestras de pacientes, sólo se detectó una débil expresión de OCT4 en un pequeño subconjunto de muestras (11%), siendo el sarcoma sinovial el subtipo con un mayor porcentaje de muestras positivas (56%). Aunque la expresión de OCT4 no se correlacionó significativamente con ningún parámetro clinicopatológico y no mostró ningún impacto en la supervivencia de los pacientes en nuestra cohorte de sarcomas, no podemos descartar que el análisis de series más amplias de pacientes pueda desvelar un papel clínicamente relevante de OCT4 en algún subtipo específico de sarcoma.

Dado el papel relevante de SOX2 en la tumorigenicidad, en este trabajo analizamos el sistema SORE6 [284] para estudiar si aquellas subpoblaciones que muestran actividad transcripcional SOX2/OCT4 se comportan como CSCs con mayor capacidad de iniciar tumores que otras subpoblaciones. Los sistemas reporteros basados en SOX2 se emplearon previamente para demostrar el fenotipo de CSC de las subpoblaciones que expresan SOX2 en los gliomas [309], cáncer de mama [310], de próstata, de vejiga [311] y de cabeza y cuello [312], aunque esta estrategia quedó sin explorar en los sarcomas. Además, se utilizó un plásmido que contenía el promotor humano de OCT4 que impulsaba la expresión de GFP para demostrar que las células de osteosarcoma que expresaban OCT4 eran mucho más tumorigénicas que las células OCT4 negativas [152]. En consonancia con estos trabajos, encontramos que las células de UPS SORE6+ mostraban un mayor potencial que las células SORE6- para formar esferas tumorales *in vitro* y para desarrollar tumores *in vivo*, confirmando así su fenotipo de CSC. Además, también detectamos un 20% de células SORE6+ en una línea celular de CDS derivada de paciente. Curiosamente, este porcentaje aumentó hasta el 40% al crecer las células en un ratón inmunodeficiente. Teniendo en cuenta que T-CDS17 mostró una mayor agresividad (mayor capacidad de invasión y formación de tumores) que las células CDS-17, el aumento de las células SORE6+ podría

responder a un incremento de la carga de CSCs durante la progresión del tumor y la adaptación a nuevos microambientes. En diferentes tipos de sarcoma también se han descrito hallazgos similares en relación con el aumento de la agresividad tras el crecimiento tumoral *in vivo* asociado a un aumento de los marcadores de CSCs, como la actividad ALDH o la expresión de OCT4 [152, 157, 313]. Estos hallazgos apoyan, por tanto, la idea de que el trasplante en serie podría representar una forma eficiente de enriquecer/seleccionar subpoblaciones de CSCs [82].

Previamente en nuestro laboratorio se ha reportado que fármacos ya aprobados para el tratamiento de sarcomas, como la trabectedina, y compuestos experimentales, como el análogo de la mitramicina EC-8042, eran capaces de dirigirse contra las subpoblaciones de CSC (cultivos de esferas tumorales y/o células positivas para ALDEFLUOR) en sarcomas con una eficacia mayor que la doxorubicina [258, 288]. Por ello, en esta Tesis Doctoral hemos utilizado el sistema SORE6 para analizar, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, la eficacia de estos fármacos y de otros quimioterapéuticos utilizados para tratar los sarcomas, como la doxorubicina o el paclitaxel, eliminando CSC. El EC-8042 fue el fármaco más eficaz para eliminar a las células SORE6+ *in vitro*. Cabe destacar que la reducción de las subpoblaciones SORE6+ tras el tratamiento *in vivo* con EC-8042 no fue tan eficaz como la observada *in vitro*. Podemos especular que esta diferencia podría deberse al comportamiento farmacocinético de los fármacos en las células y en los modelos animales y/o a la influencia de factores del microambiente tumoral. No obstante, el EC-8042 fue el único tratamiento capaz de reducir esta subpoblación *in vivo*. Tras el tratamiento con EC-8042, las células SORE6+ desaparecieron antes de que la apoptosis se hiciera evidente, sugiriendo así que EC-8042 fue capaz de reprimir la expresión de SOX2, tal y como observamos previamente en un modelo de liposarcoma mixoide relacionado [258]. De acuerdo con esto, se reportó que la mitramicina era capaz de reducir la proliferación *in vivo* de las células de glioblastoma a través de la regulación a la baja de expresión de SOX2 y sus genes diana [314]. Del mismo modo, la mitramicina fue capaz de anular el crecimiento del meduloblastoma al dirigirse contra las CSC que expresaban SOX2 [315]. Dado que el EC-8042 es 10 veces menos tóxico que la mitramicina [316], podría representar una opción terapéutica adecuada para eliminar las CSCs en los sarcomas.

Aunque la trabectedina no fue tan selectiva como el EC-8042 para eliminar las células SORE6+, este fármaco demostró ser un inductor apoptótico eficaz tanto en las subpoblaciones SORE6- como en las SORE6+, de forma similar a los hallazgos anteriores que demostraban su capacidad para eliminar las células tumorales y las células positivas a ALDEFLUOR en el mismo modelo de sarcoma [288]. Por lo tanto, nuestro trabajo muestra que diferentes fármacos pueden dirigirse a las CSCs en el sarcoma utilizando diferentes mecanismos y también que el sistema SORE6 es una herramienta valiosa para evaluar de manera dinámica la efectividad de los fármacos antitumorales de dirigirse contra las CSCs en el sarcoma de igual modo que se ha visto en otros tipos de tumores [284, 317].

Una vez evaluada la implicación de los factores de pluripotencia en el mantenimiento del fenotipo CSC en sarcomas y en plena era de la genómica en la que nos encontramos, para poder realizar estudios completos, es necesario establecer nuevas líneas celulares clínicamente registradas y cercanas a los pacientes que permitan investigar qué vías se encuentran alteradas y sirvan como plataformas de cribado de fármacos de alto rendimiento. Esto se hace especialmente importante en el caso de los tumores resistentes a las terapias actuales, como son los condrosarcomas, de los que, además, se disponen de pocos modelos (II). Los CDS son intrínsecamente resistentes a los tratamientos convencionales y, actualmente, se están probando una serie de nuevas terapias dirigidas frente a alteraciones específicas [318-320] con escasos resultados alentadores.

Las líneas celulares son fáciles de cultivar, relativamente baratas y se prestan a modelos de cribado de fármacos de alto rendimiento que han guiado los avances en la investigación del cáncer durante décadas. A pesar de las limitaciones, como la acumulación de nuevas mutaciones tras un cultivo *in vitro* continuo [321], estudios internacionales informaron de que grandes paneles de líneas celulares recapitulaban las alteraciones más relevantes de los tumores de origen y que, además, cuando se utiliza un número considerable de líneas celulares bien caracterizadas de un determinado subtipo de cáncer, éstos eran modelos útiles para predecir la sensibilidad a los fármacos contra el cáncer y sus resultados clínicos [322-325]. Estos estudios han contribuido a recuperar el interés por sustituir las líneas celulares con alto número de pases y reemplazarlas por nuevas líneas celulares derivadas de pacientes que deberían estar etiquetadas con información clínica e incluir la

caracterización genómica tanto de la línea celular como de las muestras de los pacientes. Estos modelos de líneas celulares complementarían modelos más sofisticados como los organoides o los xenoinjertos derivados de pacientes [326].

En esta Tesis Doctoral presentamos cuatro nuevas líneas celulares de condrosarcoma con información clínica relacionada y la caracterización genética de las alteraciones más comunes (mutaciones en IDH1, IDH2, TP53 y PI3KCADA, así como variaciones en el número de copias en MDN2 y CDKN2). Todas las alteraciones detectadas se encontraron también en los tumores originales, con la excepción de las mutaciones en TP53 y la amplificación de MDM2 encontradas en las líneas celulares CDS17 y T-CDS17 pero no en las muestras del tumor original. Este hallazgo sugiere que la pérdida funcional de p53 podría ser un mecanismo de adaptación al cultivo *in vitro* en las células de CDS. Nuestras líneas celulares amplían el panel de líneas celulares de CDS disponibles, destacando el establecimiento de la primera línea celular (CDS06) derivada de un condrosarcoma secundario asociado a un osteocondroma previo. Además, añadimos nuevas líneas celulares de CDS desdiferenciado con mutaciones en IDH2 a una única existente hasta el momento. Curiosamente, ninguna de las líneas desdiferenciadas anteriormente describió mutaciones en IDH2.

De cara a posibles aplicaciones futuras en la investigación del cáncer, tres de las líneas celulares (CDS11, CDS17 y T-CDS17) fueron capaces de iniciar tumores *in vivo* que se asemejan a la histología de la muestra del paciente tras su inoculación heterotópica y/u ortotópica. Algunas de estas líneas celulares también fueron capaces de invadir matrices 3D de colágeno y todas ellas mostraron características relacionadas con las CSCs, como la capacidad de crecer como esferas tumorales o la presencia de subpoblaciones con alta actividad de ALDH. Por lo tanto, los tándems de líneas celulares y xenoinjertos, como el formado por CDS17 y T-CDS17, constituyen modelos valiosos para el estudio/seguimiento de subpoblaciones de células madre tumorales durante la progresión del tumor [157]. Estos estudios señalan a ALDH1 como un factor relevante asociado a las CSCs en diferentes tipos de sarcomas [157, 313]. De forma similar, encontramos que la línea celular T-CDS17 mostraba una mayor expresión y actividad de ALDH1, mayor capacidad invasiva y mayor potencial tumorigénico *in vivo* que su línea celular CDS17 parental. Además, nuestros resultados también sugieren un papel de ALDH1 como marcador de CSCs en CDS.

Esta Tesis Doctoral también incluye un análisis WES de las líneas celulares CDS17 y T-CDS17 junto con muestras sanas y tumorales del paciente (II). Es la primera vez que una línea celular de CDS y las muestras emparejadas del paciente incluyen tal nivel de caracterización genómica. Este análisis nos permitió conocer el parecido de las líneas celulares con la diversidad genómica del tumor original y también seguir la evolución genómica de las células tumorales durante el crecimiento *in vitro* e *in vivo*. Encontramos que el clon fundador putativo, que incluye un mayor número de mutaciones y está presente en todas las células tumorales, permanece inalterado tras el cultivo celular *in vitro* (CDS17) y el crecimiento *in vivo* (T-CDS17). Este clon incluye mutaciones conocidas, como la encontrada previamente por secuenciación Sanger en IDH2 (R172G) [189, 327] o mutaciones en COL2A1 (G939Wfs*5 y P668Lfs*120) [181, 289] así como otras mutaciones no sinónimas no reportadas que presentan altas puntuaciones en los algoritmos de predicción de impacto, como VNN2, CACNA1D, MCHR2, UNC5D o MAML2 y que posiblemente contribuyan a la progresión del CDS.

Otras mutaciones que afectan a diferentes subclones aparecen o desaparecen durante la adaptación de las células al crecimiento *in vitro/in vivo*. Aunque no se ha descrito ampliamente para los sarcomas, esta deriva genómica coincide con estudios anteriores en otros tipos de cáncer [328]. Un fenómeno importante relacionado con la adaptación a las condiciones de crecimiento es la aparición de alteraciones estructurales en varios cromosomas de las células CDS17 y T-CDS17. El cambio más relevante fue el CN-LOH que afecta al cromosoma 17 y que es responsable de la aparición de mutaciones homocigóticas en TP53. Es importante destacar que las alteraciones en TP53 se asociaron con el comportamiento agresivo de los CDS [329] y que una LOH similar que afectaba al cromosoma 17 se detectó en CDS de alto grado [330]. Por lo tanto, a pesar de no estar presente en el tumor original, la LOH en el cromosoma 17 detectada en CDS17 y T-CDS17 se asemeja a un mecanismo natural de aumento de la agresividad en los CDS. Otras variantes estructurales, como las detectadas en los cromosomas 16, 18 o 20, afectaron a una población celular secuencialmente mayor en CDS17 y T-CDS17. Dado que la línea T-CDS17 es más agresiva que la CDS17, algunas de estas alteraciones podrían estar implicadas en esta ganancia de malignidad.

Aunque no pudimos estar completamente seguros de que todas las diferencias genéticas observadas entre las líneas celulares CDS17 y T-CDS17 se debieran al crecimiento *in vivo* en ratones y no a la expansión *ex vivo* de T-CDS17, el hecho de que la deriva genómica observada previamente en líneas celulares derivadas de pacientes se restringiera principalmente a los primeros pases en el cultivo [328], momento en el que se produce la adaptación de las células a las condiciones de crecimiento *in vitro*, sugiere que el nuevo conjunto de alteraciones genéticas detectadas en T-CDS17 muy probablemente surgió durante la fase de crecimiento *in vivo*.

Como mencionamos anteriormente, el rápido desarrollo de técnicas de secuenciación masiva y su aplicación al análisis de alteraciones moleculares en las enfermedades humanas, supondrán un cambio de paradigma en la forma de tratar a los pacientes con cáncer en un futuro no muy lejano. Se espera que los tratamientos oncológicos se basen en el uso de estrategias de medicina personalizadas para cada paciente que combinen la información molecular obtenidas a través de la NGS con el cribado funcional de fármacos utilizando modelos derivados de pacientes, para así encontrar la terapia más eficiente para cada caso. Este enfoque de medicina de precisión beneficiará, especialmente, a aquellos tipos de tumores que presentan una alta tasa de heterogeneidad inter e intratumoral, como es el caso de muchos tipos de sarcomas, como el CDS. Por ello, tras el establecimiento y caracterización de nuevas líneas celulares derivadas de CDS cercanas a los pacientes y dado que este tipo de sarcoma óseo es inherentemente resistente a la quimio y radioterapia convencional, evaluamos el efecto de diversos inhibidores frente a las mutaciones encontradas (III). El descubrimiento de mutaciones en puntos calientes de las enzimas canónicas isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (IDH1 e IDH2) del ciclo de Krebs en diversos tipos de cáncer es, sin duda alguna, uno de los hallazgos más interesantes, y potencialmente accionables desde el punto de vista clínico, que ha surgido de los esfuerzos de la secuenciación de alto rendimiento en las últimas décadas [292]. Está descrito que mutaciones en los genes IDH se han encontrado en más del 50% de los casos de CDS [331], además de ser comunes en lesiones benignas que pueden progresar en CDS como encondromas [332], enfermedad de Ollier [333] y síndrome de Maffucci [334]. Además de en los CDS, mutaciones en los genes IDH juegan también un papel protumorigénico en

otros tipos de tumores, como gliomas (más del 80% de los casos) [182, 183], AML ($\approx 20\%$) [184] y colangiocarcinomas ($\approx 20\%$) [187, 335, 336]. Mutaciones en este gen producen una pérdida en la función de la enzima IDH debido a sustituciones no sinónimas en los residuos de arginina R132 en IDH1 y R172 o R140 en IDH2. En esta Tesis Doctoral, gracias a la caracterización molecular de los principales genes potencialmente accionables implicados en el mantenimiento y desarrollo tumoral, hemos podido conocer que la línea celular CDS17 y sus correspondientes líneas derivadas de xenógrafos tumorales (T-CDS17#1, #3 y #4) son los únicos modelos celulares derivados de CDS de pacientes que presentan la variante IDH2-R172G y que CDS11 es el único modelo celular derivado de CDS de paciente que presenta la variante IDH1-R132L.

En condiciones normales IDH cataliza la conversión del isocitrato en α -KG durante el ciclo de Krebs. Está descrito que mutaciones en la enzima dan lugar a la adquisición de una actividad enzimática nueva en la que las enzimas mutantes de IDH catalizan la conversión de α -KG en el oncometabolito D-2-HG y que su acumulación patológica resulta en la inhibición de dioxigenasas dependientes de α -KG tales como hidroxilasas de metilcitosina e histonas desmetilasas de la familia TET [241].

Gracias a la caracterización del papel oncogénico del metabolito D-2-HG, en los últimos años se han podido desarrollar y testar diversos fármacos potencialmente atractivos frente al tratamiento de diversos tumores con mutaciones en IDH. Recientemente la FDA ha aprobado el uso de dos inhibidores específicos frente a la mutación de IDH1 (ivosidenib, AG-220) e IDH2 (enasidenib, AG-221) en pacientes con AML recurrente [337]. En los experimentos dosis-respuesta, nuestras líneas celulares CDS17, T-CDS17#1, T-CDS17#3 y T-CDS17#4 portadoras de la variante R172G-IDH2 y la línea SW1353 mutada en R172S-IDH2 mostraron mayor sensibilidad a bajas concentraciones de enasidenib que el resto de las células con otras mutaciones en IDH o sin mutación en este gen. Resultados similares se obtuvieron tras llevar a cabo ensayos de formación de colonias y de tumorosferas en suspensión con propiedades de CSCs conservadas, donde el mayor efecto anti-proliferativo de enasidenib lo observamos en nuestras nuevas líneas de CDS con R172G-IDH2 y la línea SW1353 IDH2-R172S. Donde no encontramos una inhibición del crecimiento celular fue tras 72 h de tratamiento con Vorasidenib en nuestras líneas portadoras de IDH2 mutado,

probablemente porque el efecto de este inhibidor dual de mIDH1/IDH2 sea específico de las variantes R140Q y R172K como se ha descrito en gliomas [338]. Ivosidenib, por el contrario, no mostró ningún efecto inhibitorio sobre la viabilidad celular en nuestro modelo de CDS portador de la variante R132L-IDH1, de igual manera que se ha descrito previamente en otras líneas de CDS portadoras de mutaciones endógenas en IDH1 y tratadas con AGI-5198 [253]. Otro tipo de terapia anti-IDH mutado testada en CDS se basa en la inhibición de las rutas de producción del α -KG, el sustrato que necesitan las enzimas mutantes IDH1 e IDH2 para producir D-2-HG. Por lo tanto, inhibidores de la glucólisis y de la glutaminólisis, tales como la metformina y el CB-839 han sido testados en diferentes líneas celulares de CDS [242]. Nosotros encontramos que ninguno de estos fármacos fue capaz de reducir la viabilidad celular en los modelos que mejor respondieron a enasidenib, CDS17 y T-CDS17, por lo que la inhibición de las rutas de producción de α -KG de manera aislada no es suficiente para disminuir la viabilidad celular en estos modelos.

Acorde al fuerte efecto sobre la viabilidad celular producido por enasidenib en nuestro modelo CDS17, analizamos los niveles intracelulares de D-2-HG y pudimos confirmar que el tratamiento de T-CDS17#1 con el inhibidor produce una drástica disminución dosis-respuesta de la cantidad de D-2-HG al igual que ha sido reportado anteriormente en pacientes con AML tratados con enasidenib [244, 245].

Sorprendentemente no hemos encontrado cambios en los niveles de metilación en nuestros modelos de CDS17 tras el tratamiento con enasidenib, a pesar de que existan datos reportados que describen que la actividad terapéutica de este y otros inhibidores frente a IDH mutados en AML y glioma se asocia a una recuperación de la actividad inhibida por D-2-HG sobre las dioxigenasas dependientes de α -KG y el consiguiente restablecimiento de los niveles normales de metilación del ADN. Podemos especular con que en nuestros modelos un tratamiento de 48 h con el inhibidor sí que es suficiente para observar efectos sobre la viabilidad de las células, pero no para conseguir un restablecimiento en el perfil de metilación. Sin embargo, en fuerte contraste, enasidenib induce un profundo remodelado en el paisaje transcriptómico de las células T-CDS17#1. Lo más llamativo es que reprime la diferenciación condrocítica inhibiendo rutas tales como TGF β /BMP. Se sabe que las vías de señalización de BMP y TGF β , principales reguladores de

la condrogénesis normal pueden estar implicadas en el desarrollo y la progresión del condrosarcoma central [297] por lo que podemos presuponer que en nuestro modelo de condrosarcoma desdiferenciado existía una sobre activación de esta ruta que enasidenib ha logrado bloquear e, incluso, disminuir. Además, también hemos visto que enasidenib actúa regulando negativamente las rutas de señalización celular asociadas con múltiples factores de crecimiento y promoviendo una respuesta de estrés relacionada con la síntesis de ARN y de proteínas propia de fenotipos indiferenciados y proliferativos clásicos [339]. Recientemente se han utilizado perfiles moleculares multiómicos de diversos tumores de cartílago, que han permitido establecer una clasificación de ARNm que identifica dos subtipos de condrosarcomas definidos por un equilibrio en la diferenciación del tumor y la activación del ciclo celular [340]. El fenotipo E1 se caracteriza por la sobreexpresión de marcadores de diferenciación condrogénica tales como aggrecan (ACAN), condroadherina (CHAD) o el receptor de la hormona paratiroidea 1 (PTH1R). El fenotipo E2 se caracteriza por ser un fenotipo proliferativo con bloqueo de las rutas de diferenciación y señalización. Observando los genes de la firma E1/E2 en nuestro modelo, podemos hipotetizar con que el inhibidor produce una regulación negativa de aquellos genes vinculados al ciclo, la proliferación y la división celular, lo cual explicaría la represión encontrada en T-CDS17#1 en las dianas de los factores E2F que gobiernan el progreso del ciclo celular. En nuestro modelo, el inhibidor bloquea la diferenciación y parece haber indicios de que tampoco promueve la proliferación. Por lo tanto, podemos pensar que enasidenib produce un bloqueo de las rutas de crecimiento celular, tanto a nivel de regulación genómica, como a nivel de señalización proteica, que dejaría, en último término, a las células en vía de muerte. Esto es difícil saberlo únicamente en condiciones de cultivo celular expuesto a tiempos bajos de tratamiento, pero sí apoya nuestra idea el resultado encontrado tras el tratamiento *in vivo*, donde no observamos diferenciación celular en los tumores, pero sí regresión tumoral, así como una disminución de la proliferación celular. Dado que se trata de resultados muy recientes en nuestra investigación, necesitamos continuar profundizando en el análisis de los datos, apoyándonos de experimentos complementarios, que nos arrojen información del modo de actuación de enasidenib.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

Conclusiones

1. SOX2 es un factor crítico relacionado con la capacidad de crecimiento en sarcomas.
2. La expresión de SOX2 se correlaciona con un estadio avanzado de la enfermedad en pacientes, por lo que puede ser utilizado como factor pronóstico en sarcomas.
3. La actividad transcripcional de SOX2 y/u OCT4, medida mediante el reportero SORE6, es un buen marcador de CSCs en sarcoma, constituyendo una excelente aproximación para testar la eficacia de tratamientos antitumorales dirigidos a las CSCs.
4. Las nuevas líneas celulares derivadas de condrosarcoma proporcionan datos relevantes sobre la información clínica y genética de los pacientes.
5. Las nuevas líneas de condrosarcoma permiten evaluar las subpoblaciones de CSCs y generar modelos animales con los que estudiar esta enfermedad.
6. El análisis genómico del modelo de condrosarcoma confirmó que la línea primaria y la línea derivada del xenógrafo mantienen las mutaciones más relevantes del tumor original, permitiendo describir el proceso de deriva genética que sufren las células tumorales durante la adaptación al crecimiento *in vitro* e *in vivo*.
7. Las líneas celulares derivadas de pacientes pueden ser un modelo útil para encontrar (y descartar) terapias dirigidas adecuadas en programas de medicina de precisión.
8. Enasidenib es capaz de eliminar células tumorales IDH2 mutadas en líneas de condrosarcoma.

Conclusions

1. SOX2 is a critical stemness factor able to increase the tumorigenic properties of sarcoma cells.
2. Sox2 expression correlate with advanced-disease related parameters in patients, suggesting its possible usefulness as prognostic marker in sarcoma.
3. Transcriptional activity of SOX2 and/or OCT4 measured using the SORE6 reporter, is a bona fide CSC marker in sarcoma and constitutes an excellent approach for testing the effectiveness of anti-tumor treatments to target CSCs.
4. New chondrosarcoma-derived cell lines provide relevant clinical and genetic information from patients.
5. New cell lines are suitable to evaluate CSC subpopulations and to generate in vivo models for this disease.
6. Genomic analysis of chondrosarcoma tandem model confirmed that these cell lines kept the most relevant mutations of the original tumor and described the genetic drift process that tumor cells underwent during the adaptation to in vitro and in vivo growth.
7. Sarcoma patient-derived cell lines may be useful model to find (and discard) suitable targeted therapies in precision medicine programs.
8. Enasidenib is able to eliminate IDH2 mutated cells in chondrosarcoma cell lines.

**ARTÍCULOS INCLUIDOS EN
ESTA TESIS DOCTORAL**

1. Menendez ST, **Rey V**, Martinez-Cruzado L, Gonzalez MV, Morales-Molina A, Santos L, et al. *SOX2 Expression and Transcriptional Activity Identifies a Subpopulation of Cancer Stem Cells in Sarcoma with Prognostic Implications*. Cancers (Basel). 2020;12(4). (Posición 1/14).
2. **Rey V**, Menendez ST, Estupinan O, Rodriguez A, Santos L, Tornin J, et al. *New Chondrosarcoma Cell Lines with Preserved Stem Cell Properties to Study the Genomic Drift During In Vitro/In Vivo Growth*. J Clin Med. 2019;8(4). (Posición 1/14).

**OTROS ARTÍCULOS
DERIVADOS DEL PERIODO DE
TESIS DOCTORAL**

1. Gobin M, J; Gao J; **Rey V**; Tornin J; Muradia G; et al. *Proteomics Analysis of Human Mesenchymal Stromal/Stem Cell Sarcomagenesis Model Identifies ALDH1A3 and CD99 as Potential Targets in the Transformation Process.* Stem Cell Research & Therapy. 2022 (en revisión). (Posición 3/12).
2. Tornin J, Mateu-Sanz M, **Rey V** et al. *Cold plasma and inhibition of STAT3 selectively target tumorigenicity in osteosarcoma.* Redox Biology (en revisión). (Posición 2/9).
3. Estupinan O, **Rey V**, Tornin J, Murillo D et al. *Abrogation of stemness in osteosarcoma by the mithramycin analog EC-8042 is mediated by its ability to inhibit NOTCH-1 signaling.* Cell & Bioscience. 2022 (en revision). (Posición 2/15).
4. Gallego B, Murillo D, **Rey V**, Huergo C, Estupinan O, Rodriguez A, et al. *Addressing Doxorubicin Resistance in Bone Sarcomas Using Novel Drug-Resistant Models.* Int J Mol Sci. 2022;23(12). (Posición 3/8).
5. Ortal A, Rodriguez A, Solis-Hernandez MP, de Prado M, **Rey V**, Tornin J, et al. *Proof of concept for the use of trained sniffer dogs to detect osteosarcoma.* Sci Rep. 2022;12(1):6911. (Posición 4/13).
6. Estupinan O, Niza E, Bravo I, **Rey V**, Tornin J, Gallego B, et al. *Mithramycin delivery systems to develop effective therapies in sarcomas.* J Nanobiotechnology. 2021;19(1):267. (Posición 3/17).
7. Estupinan O, Rendueles C, Suarez P, **Rey V**, Murillo D, Moris F, et al. *Nano-Encapsulation of Mithramycin in Transfersomes and Polymeric Micelles for the Treatment of Sarcomas.* J Clin Med. 2021;10(7). (Posición 4/10).
8. Tamargo-Gomez I, Martinez-Garcia GG, Suarez MF, **Rey V**, Fueyo A, Codina-Martinez H, et al. *ATG4D is the main ATG8 delipidating enzyme in mammalian cells and protects against cerebellar neurodegeneration.* Cell Death Differ. 2021;28(9):2651-72. (Posición 4/18).
9. Estupinan O, Santos L, Rodriguez A, Fernandez-Nevado L, Costales P, Perez-Escuredo J, Hermosilla MA, Oro P, **Rey V** et al. *The multikinase inhibitor EC-70124 synergistically increased the antitumor activity of doxorubicin in sarcomas.* Int J Cancer. 2019;145(1):254-66. (Posición 9/18).
10. Tornin J, Hermida-Prado F, Padda RS, Gonzalez MV, Alvarez-Fernandez C, **Rey V**, et al. *FUS-CHOP Promotes Invasion in Myxoid Liposarcoma through a SRC/FAK/RHO/ROCK-Dependent Pathway.* Neoplasia. 2018;20(1):44-56. (Posición 6/17).

REFERENCIAS

Referencias

1. Ganesh, K. and J. Massague, *Targeting metastatic cancer*. Nat Med, 2021. **27**(1): p. 34-44.
2. Prasetyanti, P.R. and J.P. Medema, *Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective*. Mol Cancer, 2017. **16**(1): p. 41.
3. Axelrod, R., D.E. Axelrod, and K.J. Pienta, *Evolution of cooperation among tumor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(36): p. 13474-9.
4. Visvader, J.E., *Cells of origin in cancer*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 314-22.
5. Blackadar, C.B., *Historical review of the causes of cancer*. World J Clin Oncol, 2016. **7**(1): p. 54-86.
6. Campisi, J. and P. Yaswen, *Aging and cancer cell biology, 2009*. Aging Cell, 2009. **8**(3): p. 221-5.
7. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
8. Lytle, N.K., A.G. Barber, and T. Reya, *Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance*. Nat Rev Cancer, 2018. **18**(11): p. 669-680.
9. Rycaj, K. and D.G. Tang, *Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations*. Cancer Res, 2015. **75**(19): p. 4003-11.
10. Bajaj, J., E. Diaz, and T. Reya, *Stem cells in cancer initiation and progression*. J Cell Biol, 2020. **219**(1).
11. Stine, R.R. and E.L. Matunis, *Stem cell competition: finding balance in the niche*. Trends Cell Biol, 2013. **23**(8): p. 357-64.
12. Sottocornola, R. and C. Lo Celso, *Dormancy in the stem cell niche*. Stem Cell Res Ther, 2012. **3**(2): p. 10.
13. Lacina, L., et al., *Cancer Microenvironment: What Can We Learn from the Stem Cell Niche*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(10): p. 24094-110.
14. Yu, Z., et al., *Cancer stem cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(12): p. 2144-51.
15. Visvader, J.E. and G.J. Lindeman, *Cancer stem cells: current status and evolving complexities*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(6): p. 717-728.
16. Plaks, V., N. Kong, and Z. Werb, *The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells?* Cell Stem Cell, 2015. **16**(3): p. 225-38.
17. Nassar, D. and C. Blanpain, *Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications*. Annu Rev Pathol, 2016. **11**: p. 47-76.
18. Kusoglu, A. and C. Biray Avci, *Cancer stem cells: A brief review of the current status*. Gene, 2019. **681**: p. 80-85.
19. Huang, T., et al., *Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance*. Theranostics, 2020. **10**(19): p. 8721-8743.
20. Eun, K., S.W. Ham, and H. Kim, *Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting*. BMB Rep, 2017. **50**(3): p. 117-125.
21. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
22. Nichols, J., et al., *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4*. Cell, 1998. **95**(3): p. 379-91.
23. Jerabek, S., et al., *OCT4: dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(3): p. 138-54.
24. Du, Z., et al., *Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells*. Glia, 2009. **57**(7): p. 724-33.
25. Ponti, D., et al., *Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties*. Cancer Res, 2005. **65**(13): p. 5506-11.
26. Chen, Y.C., et al., *Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2637.

Referencias

27. Hagerstrand, D., et al., *Identification of a SOX2-dependent subset of tumor- and sphere-forming glioblastoma cells with a distinct tyrosine kinase inhibitor sensitivity profile*. *Neuro Oncol*, 2011. **13**(11): p. 1178-91.
28. Gangemi, R.M., et al., *SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity*. *Stem Cells*, 2009. **27**(1): p. 40-8.
29. Chambers, I., et al., *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. *Cell*, 2003. **113**(5): p. 643-55.
30. Nagata, T., et al., *Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer*. *Breast Cancer*, 2014. **21**(1): p. 96-101.
31. Yu, C.C., et al., *MicroRNA let-7a represses chemoresistance and tumourigenicity in head and neck cancer via stem-like properties ablation*. *Oral Oncol*, 2011. **47**(3): p. 202-10.
32. Chiou, S.H., et al., *Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation*. *Cancer Res*, 2010. **70**(24): p. 10433-44.
33. Lin, T., Y.Q. Ding, and J.M. Li, *Overexpression of Nanog protein is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma*. *Med Oncol*, 2012. **29**(2): p. 878-85.
34. Lu, Y., et al., *Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells*. *Cancer Lett*, 2013. **340**(1): p. 113-23.
35. Bretones, G., M.D. Delgado, and J. Leon, *Myc and cell cycle control*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1849**(5): p. 506-16.
36. Dang, C.V., *MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(8).
37. Yang, L., et al., *Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy*. *Signal Transduct Target Ther*, 2020. **5**(1): p. 8.
38. Tien, Y.T., et al., *Downregulation of the KLF4 transcription factor inhibits the proliferation and migration of canine mammary tumor cells*. *Vet J*, 2015. **205**(2): p. 244-53.
39. Yasunaga, J., et al., *Identification of aberrantly methylated genes in association with adult T-cell leukemia*. *Cancer Res*, 2004. **64**(17): p. 6002-9.
40. Rane, S.G. and E.P. Reddy, *Janus kinases: components of multiple signaling pathways*. *Oncogene*, 2000. **19**(49): p. 5662-79.
41. Stine, R.R. and E.L. Matunis, *JAK-STAT signaling in stem cells*. *Adv Exp Med Biol*, 2013. **786**: p. 247-67.
42. Chambers, I., *The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells*. *Cloning Stem Cells*, 2004. **6**(4): p. 386-91.
43. Zhou, J., et al., *Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(41): p. 16158-63.
44. Birnie, R., et al., *Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions*. *Genome Biol*, 2008. **9**(5): p. R83.
45. Cook, A.M., et al., *Role of altered growth factor receptor-mediated JAK2 signaling in growth and maintenance of human acute myeloid leukemia stem cells*. *Blood*, 2014. **123**(18): p. 2826-37.
46. Sherry, M.M., et al., *STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells*. *Stem Cells*, 2009. **27**(10): p. 2383-92.
47. Calon, A., et al., *Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation*. *Cancer Cell*, 2012. **22**(5): p. 571-84.
48. Merchant, A.A. and W. Matsui, *Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(12): p. 3130-40.

Referencias

49. Petrova, R. and A.L. Joyner, *Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair*. Development, 2014. **141**(18): p. 3445-57.
50. Peacock, C.D., et al., *Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 4048-53.
51. Clement, V., et al., *HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity*. Curr Biol, 2007. **17**(2): p. 165-72.
52. Zhao, C., et al., *Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 776-9.
53. Kahn, M., *Can we safely target the WNT pathway?* Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(7): p. 513-32.
54. Polakis, P., *Wnt signaling in cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(5).
55. Jang, G.B., et al., *Blockade of Wnt/beta-catenin signaling suppresses breast cancer metastasis by inhibiting CSC-like phenotype*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12465.
56. Karamboulas, C. and L. Ailles, *Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(2): p. 2481-95.
57. Takebe, N., et al., *Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update*. Nat Rev Clin Oncol, 2015. **12**(8): p. 445-64.
58. Chiba, S., *Notch signaling in stem cell systems*. Stem Cells, 2006. **24**(11): p. 2437-47.
59. Ranganathan, P., K.L. Weaver, and A.J. Capobianco, *Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(5): p. 338-51.
60. Hemmings, B.A. and D.F. Restuccia, *PI3K-PKB/Akt pathway*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a011189.
61. Deng, J., et al., *Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway alleviates ovarian cancer chemoresistance through reversing epithelial-mesenchymal transition and decreasing cancer stem cell marker expression*. BMC Cancer, 2019. **19**(1): p. 618.
62. Chang, L., et al., *Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e875.
63. Fitzgerald, T.L., et al., *Roles of EGFR and KRAS and their downstream signaling pathways in pancreatic cancer and pancreatic cancer stem cells*. Adv Biol Regul, 2015. **59**: p. 65-81.
64. Chen, W.J. and R.S. Huang, *Low-folate stress reprograms cancer stem cell-like potentials and bioenergetics metabolism through activation of mTOR signaling pathway to promote in vitro invasion and in vivo tumorigenicity of lung cancers*. J Nutr Biochem, 2018. **53**: p. 28-38.
65. Weiss, A. and L. Attisano, *The TGFbeta superfamily signaling pathway*. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2013. **2**(1): p. 47-63.
66. Kaowinn, S., et al., *Cancer upregulated gene 2 (CUG2), a novel oncogene, promotes stemness-like properties via the NPM1-TGF-beta signaling axis*. Biochem Biophys Res Commun, 2019. **514**(4): p. 1278-1284.
67. Xia, W., et al., *Smad inhibitor induces CSC differentiation for effective chemosensitization in cyclin D1- and TGF-beta/Smad-regulated liver cancer stem cell-like cells*. Oncotarget, 2017. **8**(24): p. 38811-38824.
68. Jeong, M., et al., *Loss of Dnmt3a immortalizes Hematopoietic Stem Cells In Vivo*. Cell Rep, 2018. **23**(1): p. 1-10.
69. Hajkova, H., et al., *Decreased DNA methylation in acute myeloid leukemia patients with DNMT3A mutations and prognostic implications of DNA methylation*. Leuk Res, 2012. **36**(9): p. 1128-33.
70. Clevers, H., K.M. Loh, and R. Nusse, *Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control*. Science, 2014. **346**(6205): p. 1248012.

Referencias

71. Korkaya, H., S. Liu, and M.S. Wicha, *Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment*. J Clin Invest, 2011. **121**(10): p. 3804-9.
72. Lathia, J.D., et al., *Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(5): p. 482-5.
73. Sato, T., et al., *Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 415-8.
74. Greten, F.R., et al., *IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer*. Cell, 2004. **118**(3): p. 285-96.
75. Baccelli, I., et al., *Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(6): p. 539-44.
76. Magbanua, M.J., et al., *Genomic profiling of isolated circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients*. Cancer Res, 2013. **73**(1): p. 30-40.
77. Tellez-Gabriel, M., et al., *The Challenges of Detecting Circulating Tumor Cells in Sarcoma*. Front Oncol, 2016. **6**: p. 202.
78. Jiang, W.G., et al., *Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives*. Semin Cancer Biol, 2015. **35 Suppl**: p. S244-S275.
79. Bakhoun, S.F., et al., *Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response*. Nature, 2018. **553**(7689): p. 467-472.
80. Birkbak, N.J. and N. McGranahan, *Cancer Genome Evolutionary Trajectories in Metastasis*. Cancer Cell, 2020. **37**(1): p. 8-19.
81. Nagare, R.P., et al., *Cancer Stem Cells - Are Surface Markers Alone Sufficient?* Curr Stem Cell Res Ther, 2017. **12**(1): p. 37-44.
82. Skoda, J. and R. Veselska, *Cancer stem cells in sarcomas: Getting to the stemness core*. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2018. **1862**(10): p. 2134-2139.
83. Medema, J.P., *Cancer stem cells: the challenges ahead*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(4): p. 338-44.
84. Genadry, K.C., et al., *Soft Tissue Sarcoma Cancer Stem Cells: An Overview*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 475.
85. Rodriguez, R.e.a., *Chapter 28 - Cancer stem cells and clonal evolution in bone sarcomas, in Bone Cancer*. Third ed. 2022.
86. Muzio, G., et al., *Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(4): p. 735-46.
87. Moreb, J.S., et al., *The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance*. Chem Biol Interact, 2012. **195**(1): p. 52-60.
88. Douville, J., R. Beaulieu, and D. Balicki, *ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells*. Stem Cells Dev, 2009. **18**(1): p. 17-25.
89. Ma, I. and A.L. Allan, *The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells*. Stem Cell Rev Rep, 2011. **7**(2): p. 292-306.
90. Shimoda, M., M. Ota, and Y. Okada, *Isolation of Cancer Stem Cells by Side Population Method*. Methods Mol Biol, 2018. **1692**: p. 49-59.
91. Murase, M., et al., *Side population cells have the characteristics of cancer stem-like cells/cancer-initiating cells in bone sarcomas*. Br J Cancer, 2009. **101**(8): p. 1425-32.
92. Fujii, H., et al., *Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines*. Int J Oncol, 2009. **34**(5): p. 1381-6.
93. Salerno, M., et al., *Sphere-forming cell subsets with cancer stem cell properties in human musculoskeletal sarcomas*. Int J Oncol, 2013. **43**(1): p. 95-102.

Referencias

94. Dromard, C., et al., *Human adipose derived stroma/stem cells grow in serum-free medium as floating spheres*. *Exp Cell Res*, 2011. **317**(6): p. 770-80.
95. O'Brien, C.A., A. Kreso, and C.H. Jamieson, *Cancer stem cells and self-renewal*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(12): p. 3113-20.
96. Salinas-Jazmin, N., A. Rosas-Cruz, and M. Velasco-Velazquez, *Reporter gene systems for the identification and characterization of cancer stem cells*. *World J Stem Cells*, 2021. **13**(7): p. 861-876.
97. Ceelen, W., P. Pattyn, and M. Mareel, *Surgery, wound healing, and metastasis: recent insights and clinical implications*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014. **89**(1): p. 16-26.
98. Talukdar, S., et al., *Dormancy and cancer stem cells: An enigma for cancer therapeutic targeting*. *Adv Cancer Res*, 2019. **141**: p. 43-84.
99. Mitra, A., L. Mishra, and S. Li, *EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance*. *Oncotarget*, 2015. **6**(13): p. 10697-711.
100. Chi, H.C., et al., *Roles of Long Noncoding RNAs in Recurrence and Metastasis of Radiotherapy-Resistant Cancer Stem Cells*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(9).
101. Phillips, T.M., W.H. McBride, and F. Pajonk, *The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation*. *J Natl Cancer Inst*, 2006. **98**(24): p. 1777-85.
102. Pardoll, D., *Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention*. *Semin Oncol*, 2015. **42**(4): p. 523-38.
103. Wang, J.J., K.F. Lei, and F. Han, *Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018. **22**(12): p. 3855-3864.
104. Maccalli, C., et al., *The role of cancer stem cells in the modulation of anti-tumor immune responses*. *Semin Cancer Biol*, 2018. **53**: p. 189-200.
105. Balkwill, F.R., M. Capasso, and T. Hagemann, *The tumor microenvironment at a glance*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 23): p. 5591-6.
106. Di Sanzo, M., et al., *Clinical Applications of Personalized Medicine: A New Paradigm and Challenge*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2017. **18**(3): p. 194-203.
107. Colella, G., et al., *Sarcoma Spheroids and Organoids-Promising Tools in the Era of Personalized Medicine*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(2).
108. Tu, W. and J. Zheng, *Application of Humanized Mice in Immunological Research*. *Methods Mol Biol*, 2016. **1371**: p. 157-76.
109. Rey, V., et al., *New Chondrosarcoma Cell Lines with Preserved Stem Cell Properties to Study the Genomic Drift During In Vitro/In Vivo Growth*. *J Clin Med*, 2019. **8**(4).
110. Alexandrov, L.B., et al., *Signatures of mutational processes in human cancer*. *Nature*, 2013. **500**(7463): p. 415-21.
111. Vasan, N., J. Baselga, and D.M. Hyman, *A view on drug resistance in cancer*. *Nature*, 2019. **575**(7782): p. 299-309.
112. Shaked, Y., *Balancing efficacy of and host immune responses to cancer therapy: the yin and yang effects*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016. **13**(10): p. 611-26.
113. Kurtova, A.V., et al., *Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance*. *Nature*, 2015. **517**(7533): p. 209-13.
114. Chen, Y., et al., *Quiescence and attenuated DNA damage response promote survival of esophageal cancer stem cells*. *J Cell Biochem*, 2012. **113**(12): p. 3643-52.
115. Takeishi, S., et al., *Ablation of Fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence*. *Cancer Cell*, 2013. **23**(3): p. 347-61.
116. Orienti, I., et al., *A new bioavailable fenretinide formulation with antiproliferative, antimetabolic, and cytotoxic effects on solid tumors*. *Cell Death Dis*, 2019. **10**(7): p. 529.
117. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. *Cell*, 2008. **133**(4): p. 704-15.

Referencias

118. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
119. Gupta, P.B., et al., *Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance*. Cell Stem Cell, 2019. **24**(1): p. 65-78.
120. Chou, M.Y., et al., *Sox2 expression involvement in the oncogenicity and radiochemoresistance of oral cancer stem cells*. Oral Oncol, 2015. **51**(1): p. 31-9.
121. Koo, B.S., et al., *Oct4 is a critical regulator of stemness in head and neck squamous carcinoma cells*. Oncogene, 2015. **34**(18): p. 2317-24.
122. Huang, C.E., et al., *Enhanced chemosensitivity by targeting Nanog in head and neck squamous cell carcinomas*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(9): p. 14935-48.
123. Maugeri-Sacca, M., M. Bartucci, and R. De Maria, *DNA damage repair pathways in cancer stem cells*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(8): p. 1627-36.
124. Schulz, A., et al., *Cancer Stem Cells and Radioresistance: DNA Repair and Beyond*. Cancers (Basel), 2019. **11**(6).
125. Zhou, L., et al., *Identification of cancer-type specific expression patterns for active aldehyde dehydrogenase (ALDH) isoforms in ALDEFLUOR assay*. Cell Biol Toxicol, 2019. **35**(2): p. 161-177.
126. Skvortsova, I., et al., *Radiation resistance: Cancer stem cells (CSCs) and their enigmatic pro-survival signaling*. Semin Cancer Biol, 2015. **35**: p. 39-44.
127. Steinbichler, T.B., et al., *Therapy resistance mediated by cancer stem cells*. Semin Cancer Biol, 2018. **53**: p. 156-167.
128. Begicevic, R.R. and M. Falasca, *ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(11).
129. Hui, J.Y., *Epidemiology and Etiology of Sarcomas*. Surg Clin North Am, 2016. **96**(5): p. 901-14.
130. Stiller, C.A., et al., *Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: report from the RARECARE project*. Eur J Cancer, 2013. **49**(3): p. 684-95.
131. Roberts, R.D., et al., *Provocative questions in osteosarcoma basic and translational biology: A report from the Children's Oncology Group*. Cancer, 2019. **125**(20): p. 3514-3525.
132. Dancsok, A.R., K. Asleh-Aburaya, and T.O. Nielsen, *Advances in sarcoma diagnostics and treatment*. Oncotarget, 2017. **8**(4): p. 7068-7093.
133. Rubio, D., et al., *Human mesenchymal stem cell transformation is associated with a mesenchymal-epithelial transition*. Exp Cell Res, 2008. **314**(4): p. 691-8.
134. Guneta, V., et al., *Comparative study of adipose-derived stem cells and bone marrow-derived stem cells in similar microenvironmental conditions*. Exp Cell Res, 2016. **348**(2): p. 155-164.
135. Meyer, M.B., et al., *Epigenetic Plasticity Drives Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells*. J Biol Chem, 2016. **291**(34): p. 17829-47.
136. Bianco, P. and P.G. Robey, *Skeletal stem cells*. Development, 2015. **142**(6): p. 1023-7.
137. Dinulovic, I., R. Furrer, and C. Handschin, *Plasticity of the Muscle Stem Cell Microenvironment*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1041**: p. 141-169.
138. Shakhova, O. and L. Sommer, *Neural crest-derived stem cells*, in *StemBook*. 2008: Cambridge (MA).
139. Frenette, P.S., et al., *Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 285-316.
140. Schafer, R. and H. Northoff, *Characteristics of Mesenchymal Stem Cells - New Stars in Regenerative Medicine or Unrecognized Old Fellows in Autologous Regeneration?* Transfus Med Hemother, 2008. **35**(3): p. 154-159.
141. Rodriguez, R., R. Rubio, and P. Menendez, *Modeling sarcomagenesis using multipotent mesenchymal stem cells*. Cell Res, 2012. **22**(1): p. 62-77.

Referencias

142. Rubio, R., et al., *The differentiation stage of p53-Rb-deficient bone marrow mesenchymal stem cells imposes the phenotype of in vivo sarcoma development*. *Oncogene*, 2013. **32**(41): p. 4970-80.
143. Quist, T., et al., *The impact of osteoblastic differentiation on osteosarcomagenesis in the mouse*. *Oncogene*, 2015. **34**(32): p. 4278-84.
144. Wuebben, E.L. and A. Rizzino, *The dark side of SOX2: cancer - a comprehensive overview*. *Oncotarget*, 2017. **8**(27): p. 44917-44943.
145. Iglesias, J.M., J. Gumuzio, and A.G. Martin, *Linking Pluripotency Reprogramming and Cancer*. *Stem Cells Transl Med*, 2017. **6**(2): p. 335-339.
146. Skoda, J., et al., *Cancer stem cell markers in pediatric sarcomas: Sox2 is associated with tumorigenicity in immunodeficient mice*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(7): p. 9535-48.
147. Hatina, J., et al., *Sarcoma Stem Cell Heterogeneity*. *Adv Exp Med Biol*, 2019. **1123**: p. 95-118.
148. Brzozowa-Zasada, M., et al., *Notch and its oncogenic activity in human malignancies*. *Eur Surg*, 2017. **49**(5): p. 199-209.
149. Abarrategi, A., et al., *Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer Stem Cells, and Targeted Therapies*. *Stem Cells Int*, 2016. **2016**: p. 3631764.
150. Rodriguez-Nunez, P., et al., *Hippo pathway effectors YAP1/TAZ induce an EWS-FLI1-opposing gene signature and associate with disease progression in Ewing sarcoma*. *J Pathol*, 2020. **250**(4): p. 374-386.
151. Schiavone, K., et al., *The Heterogeneity of Osteosarcoma: The Role Played by Cancer Stem Cells*. *Adv Exp Med Biol*, 2019. **1139**: p. 187-200.
152. Levings, P.P., et al., *Expression of an exogenous human Oct-4 promoter identifies tumor-initiating cells in osteosarcoma*. *Cancer Res*, 2009. **69**(14): p. 5648-55.
153. Tirino, V., et al., *Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo*. *FASEB J*, 2011. **25**(6): p. 2022-30.
154. He, A., et al., *CD133 expression predicts lung metastasis and poor prognosis in osteosarcoma patients: A clinical and experimental study*. *Exp Ther Med*, 2012. **4**(3): p. 435-441.
155. He, A., et al., *CD133(+) CD44(+) Cells Mediate in the Lung Metastasis of Osteosarcoma*. *J Cell Biochem*, 2015. **116**(8): p. 1719-29.
156. Adhikari, A.S., et al., *CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance*. *Cancer Res*, 2010. **70**(11): p. 4602-12.
157. Martinez-Cruzado, L., et al., *Aldh1 Expression and Activity Increase During Tumor Evolution in Sarcoma Cancer Stem Cell Populations*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 27878.
158. Suva, M.L., et al., *Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma*. *Cancer Res*, 2009. **69**(5): p. 1776-81.
159. Tirino, V., et al., *Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours*. *PLoS One*, 2008. **3**(10): p. e3469.
160. Yang, M., et al., *Detection and characterization of side population in Ewing's sarcoma SK-ES-1 cells in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **391**(1): p. 1062-6.
161. Gibbs, C.P., et al., *Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis*. *Neoplasia*, 2005. **7**(11): p. 967-76.
162. Ehnman, M., et al., *The Tumor Microenvironment of Pediatric Sarcoma: Mesenchymal Mechanisms Regulating Cell Migration and Metastasis*. *Curr Oncol Rep*, 2019. **21**(10): p. 90.
163. Pietrovito, L., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote invasiveness and transendothelial migration of osteosarcoma cells via a mesenchymal to amoeboid transition*. *Mol Oncol*, 2018. **12**(5): p. 659-676.

Referencias

164. Jolly, M.K., et al., *E-Cadherin Represses Anchorage-Independent Growth in Sarcomas through Both Signaling and Mechanical Mechanisms*. Mol Cancer Res, 2019. **17**(6): p. 1391-1402.
165. Masia, A., et al., *Notch-mediated induction of N-cadherin and alpha9-integrin confers higher invasive phenotype on rhabdomyosarcoma cells*. Br J Cancer, 2012. **107**(8): p. 1374-83.
166. Tornin, J., et al., *FUS-CHOP Promotes Invasion in Myxoid Liposarcoma through a SRC/FAK/RHO/ROCK-Dependent Pathway*. Neoplasia, 2018. **20**(1): p. 44-56.
167. Clark, A.G. and D.M. Vignjevic, *Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **36**: p. 13-22.
168. Grunewald, T.G., et al., *Sarcoma treatment in the era of molecular medicine*. EMBO Mol Med, 2020. **12**(11): p. e11131.
169. Choi, J.H. and J.Y. Ro, *The 2020 WHO Classification of Tumors of Bone: An Updated Review*. Adv Anat Pathol, 2021. **28**(3): p. 119-138.
170. van Oosterwijk, J.G., et al., *Update on targets and novel treatment options for high-grade osteosarcoma and chondrosarcoma*. Hematol Oncol Clin North Am, 2013. **27**(5): p. 1021-48.
171. Heck, R.K., Jr., T.D. Peabody, and M.A. Simon, *Staging of primary malignancies of bone*. CA Cancer J Clin, 2006. **56**(6): p. 366-75.
172. MacDonald, I.J., et al., *An update on current and future treatment options for chondrosarcoma*. Expert Rev Anticancer Ther, 2019. **19**(9): p. 773-786.
173. Samuel, A.M., J. Costa, and D.M. Lindskog, *Genetic alterations in chondrosarcomas - keys to targeted therapies?* Cell Oncol (Dordr), 2014. **37**(2): p. 95-105.
174. Sekiguchi, K., et al., *Osteochondroma Presenting as a Calcified Mass in the Sellar Region and Review of the Literature*. J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg, 2017. **78**(4): p. 380-385.
175. Boehme, K.A., et al., *Chondrosarcoma: A Rare Misfortune in Aging Human Cartilage? The Role of Stem and Progenitor Cells in Proliferation, Malignant Degeneration and Therapeutic Resistance*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(1).
176. Frezza, A.M., et al., *Mesenchymal chondrosarcoma: prognostic factors and outcome in 113 patients. A European Musculoskeletal Oncology Society study*. Eur J Cancer, 2015. **51**(3): p. 374-81.
177. Drilon, A.D., et al., *Extraskeletal myxoid chondrosarcoma: a retrospective review from 2 referral centers emphasizing long-term outcomes with surgery and chemotherapy*. Cancer, 2008. **113**(12): p. 3364-71.
178. Clark, J., et al., *Fusion of the EWS gene to CHN, a member of the steroid/thyroid receptor gene superfamily, in a human myxoid chondrosarcoma*. Oncogene, 1996. **12**(2): p. 229-35.
179. Sjogren, H., et al., *Fusion of the EWS-related gene TAF2N to TEC in extraskeletal myxoid chondrosarcoma*. Cancer Res, 1999. **59**(20): p. 5064-7.
180. Hisaoka, M., et al., *TFG is a novel fusion partner of NOR1 in extraskeletal myxoid chondrosarcoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2004. **40**(4): p. 325-8.
181. Tarpey, P.S., et al., *Frequent mutation of the major cartilage collagen gene COL2A1 in chondrosarcoma*. Nat Genet, 2013. **45**(8): p. 923-6.
182. Yan, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 765-73.
183. Hartmann, C., et al., *Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas*. Acta Neuropathol, 2009. **118**(4): p. 469-74.
184. Mardis, E.R., et al., *Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome*. N Engl J Med, 2009. **361**(11): p. 1058-66.
185. Cancer Genome Atlas Research, N., et al., *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2013. **368**(22): p. 2059-74.

Referencias

186. Marcucci, G., et al., *IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study*. J Clin Oncol, 2010. **28**(14): p. 2348-55.
187. Borger, D.R., et al., *Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping*. Oncologist, 2012. **17**(1): p. 72-9.
188. Boscoe, A.N., C. Rolland, and R.K. Kelley, *Frequency and prognostic significance of isocitrate dehydrogenase 1 mutations in cholangiocarcinoma: a systematic literature review*. J Gastrointest Oncol, 2019. **10**(4): p. 751-765.
189. Amary, M.F., et al., *IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours*. J Pathol, 2011. **224**(3): p. 334-43.
190. Dogan, S., et al., *Frequent IDH2 R172 mutations in undifferentiated and poorly-differentiated sinonasal carcinomas*. J Pathol, 2017. **242**(4): p. 400-408.
191. Guilmette, J. and P.M. Sadow, *High-Grade Sinonasal Carcinoma: Classification Through Molecular Profiling*. Arch Pathol Lab Med, 2019. **143**(11): p. 1416-1419.
192. Mito, J.K., et al., *Immunohistochemical Detection and Molecular Characterization of IDH-mutant Sinonasal Undifferentiated Carcinomas*. Am J Surg Pathol, 2018. **42**(8): p. 1067-1075.
193. Cairns, R.A., et al., *IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma*. Blood, 2012. **119**(8): p. 1901-3.
194. Wang, C., et al., *IDH2R172 mutations define a unique subgroup of patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma*. Blood, 2015. **126**(15): p. 1741-52.
195. Singh, A., et al., *Diffuse glioma - Rare homozygous IDH point mutation, is it an oncogenetic mechanism?* Neuropathology, 2017. **37**(6): p. 582-585.
196. Stancheva, G., et al., *IDH1/IDH2 but not TP53 mutations predict prognosis in Bulgarian glioblastoma patients*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 654727.
197. Chou, F.J., et al., *D-2-Hydroxyglutarate in Glioma Biology*. Cells, 2021. **10**(9).
198. Yong, C., G.D. Stewart, and C. Frezza, *Oncometabolites in renal cancer*. Nat Rev Nephrol, 2020. **16**(3): p. 156-172.
199. Mukherjee, P.K., et al., *Metabolomic analysis identifies differentially produced oral metabolites, including the oncometabolite 2-hydroxyglutarate, in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. BBA Clin, 2017. **7**: p. 8-15.
200. Rakheja, D., et al., *Papillary thyroid carcinoma shows elevated levels of 2-hydroxyglutarate*. Tumour Biol, 2011. **32**(2): p. 325-33.
201. Xu, W., et al., *Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases*. Cancer Cell, 2011. **19**(1): p. 17-30.
202. Raimondi, V., et al., *2-Hydroxyglutarate in Acute Myeloid Leukemia: A Journey from Pathogenesis to Therapies*. Biomedicines, 2022. **10**(6).
203. Mohammad, N., et al., *Characterisation of isocitrate dehydrogenase 1/isocitrate dehydrogenase 2 gene mutation and the d-2-hydroxyglutarate oncometabolite level in dedifferentiated chondrosarcoma*. Histopathology, 2020. **76**(5): p. 722-730.
204. Lu, C., et al., *Induction of sarcomas by mutant IDH2*. Genes Dev, 2013. **27**(18): p. 1986-98.
205. Seok, J., et al., *The oncometabolite d2hydroxyglutarate induces angiogenic activity through the vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling pathway*. Int J Oncol, 2019. **54**(2): p. 753-763.
206. Reiter-Brennan, C., L. Semmler, and A. Klein, *The effects of 2-hydroxyglutarate on the tumorigenesis of gliomas*. Contemp Oncol (Pozn), 2018. **22**(4): p. 215-222.
207. Wu, F., et al., *Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy*. Cell Chem Biol, 2017. **24**(3): p. 252-280.

Referencias

208. Schrage, Y.M., et al., *Central chondrosarcoma progression is associated with pRb pathway alterations: CDK4 down-regulation and p16 overexpression inhibit cell growth in vitro*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(9A): p. 2843-52.
209. Ropke, M., et al., *Rb-loss is associated with high malignancy in chondrosarcoma*. Oncol Rep, 2006. **15**(1): p. 89-95.
210. Blasenbren, S., et al., *[TP53 gene aberrations in chondromatous neoplasms: correlation with immunohistochemical p53 accumulation and MDM2 expression]*. Verh Dtsch Ges Pathol, 1998. **82**: p. 284-9.
211. Gibbons, J.J., R.T. Abraham, and K. Yu, *Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth*. Semin Oncol, 2009. **36 Suppl 3**: p. S3-S17.
212. Zhang, Y.X., et al., *Functional profiling of receptor tyrosine kinases and downstream signaling in human chondrosarcomas identifies pathways for rational targeted therapy*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(14): p. 3796-807.
213. Asp, J., et al., *Changes of the p16 gene but not the p53 gene in human chondrosarcoma tissues*. Int J Cancer, 2000. **85**(6): p. 782-6.
214. Jin, Z., Y.X. Han, and X.R. Han, *Loss of RUNX3 expression may contribute to poor prognosis in patients with chondrosarcoma*. J Mol Histol, 2013. **44**(6): p. 645-52.
215. Bovee, J.V., et al., *Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(7): p. 481-8.
216. Meijer, D., et al., *Genetic characterization of mesenchymal, clear cell, and dedifferentiated chondrosarcoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2012. **51**(10): p. 899-909.
217. Cleven, A.H., et al., *Periosteal chondrosarcoma: a histopathological and molecular analysis of a rare chondrosarcoma subtype*. Histopathology, 2015. **67**(4): p. 483-90.
218. Amary, M.F., et al., *Isocitrate dehydrogenase 1 mutations (IDH1) and p16/CDKN2A copy number change in conventional chondrosarcomas*. Virchows Arch, 2015. **466**(2): p. 217-22.
219. Morrison, C., et al., *MYC amplification and polysomy 8 in chondrosarcoma: array comparative genomic hybridization, fluorescent in situ hybridization, and association with outcome*. J Clin Oncol, 2005. **23**(36): p. 9369-76.
220. Hallor, K.H., et al., *Genomic profiling of chondrosarcoma: chromosomal patterns in central and peripheral tumors*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(8): p. 2685-94.
221. Schwab, J.H., et al., *Chordoma and chondrosarcoma gene profile: implications for immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(3): p. 339-49.
222. Ahn, J., et al., *Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1)*. Nat Genet, 1995. **11**(2): p. 137-43.
223. Stickens, D., et al., *The EXT2 multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes*. Nat Genet, 1996. **14**(1): p. 25-32.
224. de Andrea, C.E., et al., *Secondary peripheral chondrosarcoma evolving from osteochondroma as a result of outgrowth of cells with functional EXT*. Oncogene, 2012. **31**(9): p. 1095-104.
225. Fiorenza, F., et al., *Risk factors for survival and local control in chondrosarcoma of bone*. J Bone Joint Surg Br, 2002. **84**(1): p. 93-9.
226. Veth, R., et al., *Cryosurgery in aggressive, benign, and low-grade malignant bone tumours*. Lancet Oncol, 2005. **6**(1): p. 25-34.
227. Leerapun, T., et al., *Surgical management of conventional grade I chondrosarcoma of long bones*. Clin Orthop Relat Res, 2007. **463**: p. 166-72.
228. Kattapur, A.K., R.L. Jones, and A. Gulia, *Dedifferentiated chondrosarcoma: current standards of care*. Future Oncol, 2021. **17**(35): p. 4983-4991.

Referencias

229. Weber, D.C., et al., *Results of spot-scanning proton radiation therapy for chordoma and chondrosarcoma of the skull base: the Paul Scherrer Institut experience*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **63**(2): p. 401-9.
230. Lu, V.M., et al., *Carbon ion radiotherapy for skull base chordomas and chondrosarcomas: a systematic review and meta-analysis of local control, survival, and toxicity outcomes*. J Neurooncol, 2020. **147**(3): p. 503-513.
231. Castro, J.R., et al., *Experience in charged particle irradiation of tumors of the skull base: 1977-1992*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1994. **29**(4): p. 647-55.
232. McNaney, D., et al., *Fifteen year radiotherapy experience with chondrosarcoma of bone*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1982. **8**(2): p. 187-90.
233. Wyman, J.J., et al., *Multidrug resistance-1 and p-glycoprotein in human chondrosarcoma cell lines: expression correlates with decreased intracellular doxorubicin and in vitro chemoresistance*. J Orthop Res, 1999. **17**(6): p. 935-40.
234. Nooij, M.A., et al., *Doxorubicin and cisplatin chemotherapy in high-grade spindle cell sarcomas of the bone, other than osteosarcoma or malignant fibrous histiocytoma: a European Osteosarcoma Intergroup Study*. Eur J Cancer, 2005. **41**(2): p. 225-30.
235. Addie, R.D., et al., *Exploration of the chondrosarcoma metabolome; the mTOR pathway as an important pro-survival pathway*. J Bone Oncol, 2019. **15**: p. 100222.
236. Turcan, S., et al., *IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype*. Nature, 2012. **483**(7390): p. 479-83.
237. Lu, C., et al., *IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation*. Nature, 2012. **483**(7390): p. 474-8.
238. Turcan, S., et al., *Mutant-IDH1-dependent chromatin state reprogramming, reversibility, and persistence*. Nat Genet, 2018. **50**(1): p. 62-72.
239. Sasaki, M., et al., *IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics*. Nature, 2012. **488**(7413): p. 656-9.
240. Tahiliani, M., et al., *Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. Science, 2009. **324**(5929): p. 930-5.
241. Figueroa, M.E., et al., *Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation*. Cancer Cell, 2010. **18**(6): p. 553-67.
242. Peterse, E.F.P., et al., *Targeting glutaminolysis in chondrosarcoma in context of the IDH1/2 mutation*. Br J Cancer, 2018. **118**(8): p. 1074-1083.
243. Dao Trong, P., et al., *Large-Scale Drug Screening in Patient-Derived IDH(mut) Glioma Stem Cells Identifies Several Efficient Drugs among FDA-Approved Antineoplastic Agents*. Cells, 2020. **9**(6).
244. Yen, K., et al., *AG-221, a First-in-Class Therapy Targeting Acute Myeloid Leukemia Harboring Oncogenic IDH2 Mutations*. Cancer Discov, 2017. **7**(5): p. 478-493.
245. Stein, E.M., et al., *Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia*. Blood, 2017. **130**(6): p. 722-731.
246. Stein, E.M., et al., *Enasidenib in patients with mutant IDH2 myelodysplastic syndromes: a phase 1 subgroup analysis of the multicentre, AG221-C-001 trial*. Lancet Haematol, 2020. **7**(4): p. e309-e319.
247. Stein, E.M., et al., *Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib*. Blood, 2019. **133**(7): p. 676-687.
248. Popovici-Muller, J., et al., *Discovery of AG-120 (Ivosidenib): A First-in-Class Mutant IDH1 Inhibitor for the Treatment of IDH1 Mutant Cancers*. ACS Med Chem Lett, 2018. **9**(4): p. 300-305.
249. DiNardo, C.D., et al., *Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML*. N Engl J Med, 2018. **378**(25): p. 2386-2398.

Referencias

250. Fan, B., et al., *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of ivosidenib in patients with advanced hematologic malignancies with an IDH1 mutation*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2020. **85**(5): p. 959-968.
251. Tabata, M.M., et al., *Differentiation syndrome during ivosidenib treatment with immunohistochemistry showing isocitrate dehydrogenase R132H mutation*. *J Cutan Pathol*, 2020. **47**(11): p. 1042-1045.
252. Li, L., et al., *Treatment with a Small Molecule Mutant IDH1 Inhibitor Suppresses Tumorigenic Activity and Decreases Production of the Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate in Human Chondrosarcoma Cells*. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0133813.
253. Suijker, J., et al., *Inhibition of mutant IDH1 decreases D-2-HG levels without affecting tumorigenic properties of chondrosarcoma cell lines*. *Oncotarget*, 2015. **6**(14): p. 12505-19.
254. Chuntova, P., et al., *Inhibition of D-2HG leads to upregulation of a proinflammatory gene signature in a novel HLA-A2/HLA-DR1 transgenic mouse model of IDH1R132H-expressing glioma*. *J Immunother Cancer*, 2022. **10**(5).
255. Chen, C., et al., *Increased levels of hypoxia-inducible factor-1alpha are associated with Bcl-xL expression, tumor apoptosis, and clinical outcome in chondrosarcoma*. *J Orthop Res*, 2011. **29**(1): p. 143-51.
256. Rozeman, L.B., et al., *Array-comparative genomic hybridization of central chondrosarcoma: identification of ribosomal protein S6 and cyclin-dependent kinase 4 as candidate target genes for genomic aberrations*. *Cancer*, 2006. **107**(2): p. 380-8.
257. Kim, H., et al., *A system-level approach identifies HIF-2alpha as a critical regulator of chondrosarcoma progression*. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 5023.
258. Tornin, J., et al., *Inhibition of SP1 by the mithramycin analog EC-8042 efficiently targets tumor initiating cells in sarcoma*. *Oncotarget*, 2016. **7**(21): p. 30935-50.
259. Menendez, S.T., et al., *SOX2 Expression and Transcriptional Activity Identifies a Subpopulation of Cancer Stem Cells in Sarcoma with Prognostic Implications*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(4).
260. Spiguel, A., *Soft tissue sarcomas*. *Cancer Treat Res*, 2014. **162**: p. 203-23.
261. Rodriguez, R., et al., *Expression of FUS-CHOP fusion protein in immortalized/transformed human mesenchymal stem cells drives mixoid liposarcoma formation*. *Stem Cells*, 2013. **31**(10): p. 2061-72.
262. Hofvander, J., et al., *Recurrent PRDM10 gene fusions in undifferentiated pleomorphic sarcoma*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(4): p. 864-9.
263. Funes, J.M., et al., *Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(15): p. 6223-8.
264. Cabanillas, R., et al., *A novel molecular diagnostics platform for somatic and germline precision oncology*. *Mol Genet Genomic Med*, 2017. **5**(4): p. 336-359.
265. Kumar, P., S. Henikoff, and P.C. Ng, *Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(7): p. 1073-81.
266. Puente, X.S., et al., *Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia*. *Nature*, 2011. **475**(7354): p. 101-5.
267. Davydov, E.V., et al., *Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++*. *PLoS Comput Biol*, 2010. **6**(12): p. e1001025.
268. Choi, Y., et al., *Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e46688.
269. Reva, B., Y. Antipin, and C. Sander, *Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(17): p. e118.
270. Schwarz, J.M., et al., *MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age*. *Nat Methods*, 2014. **11**(4): p. 361-2.

Referencias

271. Chun, S. and J.C. Fay, *Identification of deleterious mutations within three human genomes*. *Genome Res*, 2009. **19**(9): p. 1553-61.
272. Dong, C., et al., *Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies*. *Hum Mol Genet*, 2015. **24**(8): p. 2125-37.
273. Jagadeesh, K.A., et al., *M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity*. *Nat Genet*, 2016. **48**(12): p. 1581-1586.
274. Deshwar, A.G., et al., *PhyloWGS: reconstructing subclonal composition and evolution from whole-genome sequencing of tumors*. *Genome Biol*, 2015. **16**: p. 35.
275. Miller, C.A., et al., *Visualizing tumor evolution with the fishplot package for R*. *BMC Genomics*, 2016. **17**(1): p. 880.
276. Aryee, M.J., et al., *Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays*. *Bioinformatics*, 2014. **30**(10): p. 1363-9.
277. Chen, Y.A., et al., *Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray*. *Epigenetics*, 2013. **8**(2): p. 203-9.
278. Pidsley, R., et al., *Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling*. *Genome Biol*, 2016. **17**(1): p. 208.
279. Triche, T.J., Jr., et al., *Low-level processing of Illumina Infinium DNA Methylation BeadArrays*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(7): p. e90.
280. Teschendorff, A.E., et al., *A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data*. *Bioinformatics*, 2013. **29**(2): p. 189-96.
281. Tian, Y., et al., *ChAMP: updated methylation analysis pipeline for Illumina BeadChips*. *Bioinformatics*, 2017. **33**(24): p. 3982-3984.
282. Ritchie, M.E., et al., *limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(7): p. e47.
283. Du, P., et al., *Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis*. *BMC Bioinformatics*, 2010. **11**: p. 587.
284. Tang, B., et al., *A flexible reporter system for direct observation and isolation of cancer stem cells*. *Stem Cell Reports*, 2015. **4**(1): p. 155-169.
285. Simoes, B.M., et al., *Effects of estrogen on the proportion of stem cells in the breast*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **129**(1): p. 23-35.
286. Chew, J.L., et al., *Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(14): p. 6031-46.
287. Garofalo, A., et al., *The combination of the tyrosine kinase receptor inhibitor SU6668 with paclitaxel affects ascites formation and tumor spread in ovarian carcinoma xenografts growing orthotopically*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(9): p. 3476-85.
288. Martinez-Cruzado, L., et al., *Trabectedin and Camptothecin Synergistically Eliminate Cancer Stem Cells in Cell-of-Origin Sarcoma Models*. *Neoplasia*, 2017. **19**(6): p. 460-470.
289. Totoki, Y., et al., *Unique mutation portraits and frequent COL2A1 gene alteration in chondrosarcoma*. *Genome Res*, 2014. **24**(9): p. 1411-20.
290. Dogan, S., et al., *Molecular epidemiology of IDH2 hotspot mutations in cancer and immunohistochemical detection of R172K, R172G, and R172M variants*. *Hum Pathol*, 2020. **106**: p. 45-53.
291. Gross, S., et al., *Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations*. *J Exp Med*, 2010. **207**(2): p. 339-44.
292. Dang, L., et al., *Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate*. *Nature*, 2009. **462**(7274): p. 739-44.

Referencias

293. van Oosterwijk, J.G., et al., *Three new chondrosarcoma cell lines: one grade III conventional central chondrosarcoma and two dedifferentiated chondrosarcomas of bone*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 375.
294. Kernytsky, A., et al., *IDH2 mutation-induced histone and DNA hypermethylation is progressively reversed by small-molecule inhibition*. Blood, 2015. **125**(2): p. 296-303.
295. Chaturvedi, A., et al., *Pan-mutant-IDH1 inhibitor BAY1436032 is highly effective against human IDH1 mutant acute myeloid leukemia in vivo*. Leukemia, 2017. **31**(10): p. 2020-2028.
296. Carrillo-Galvez, A.B., et al., *GARP promotes the proliferation and therapeutic resistance of bone sarcoma cancer cells through the activation of TGF-beta*. Cell Death Dis, 2020. **11**(11): p. 985.
297. Boeuf, S., et al., *BMP and TGFbeta pathways in human central chondrosarcoma: enhanced endoglin and Smad 1 signaling in high grade tumors*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 488.
298. Komori, T., *Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation*. Histochem Cell Biol, 2018. **149**(4): p. 313-323.
299. Martins-Neves, S.R., et al., *Osteosarcoma Stem Cells Have Active Wnt/beta-catenin and Overexpress SOX2 and KLF4*. J Cell Physiol, 2016. **231**(4): p. 876-86.
300. Li, J., et al., *The Roles of Sox Family Genes in Sarcoma*. Curr Drug Targets, 2016. **17**(15): p. 1761-1772.
301. Basu-Roy, U., et al., *Sox2 antagonizes the Hippo pathway to maintain stemness in cancer cells*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6411.
302. Maurizi, G., et al., *Sox2 is required for tumor development and cancer cell proliferation in osteosarcoma*. Oncogene, 2018. **37**(33): p. 4626-4632.
303. Basu-Roy, U., et al., *Sox2 maintains self renewal of tumor-initiating cells in osteosarcomas*. Oncogene, 2012. **31**(18): p. 2270-82.
304. Ren, C., et al., *Inhibition of SOX2 induces cell apoptosis and G1/S arrest in Ewing's sarcoma through the PI3K/Akt pathway*. J Exp Clin Cancer Res, 2016. **35**: p. 44.
305. Riggi, N., et al., *EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells*. Genes Dev, 2010. **24**(9): p. 916-32.
306. Slemmons, K.K., et al., *A Novel Notch-YAP Circuit Drives Stemness and Tumorigenesis in Embryonal Rhabdomyosarcoma*. Mol Cancer Res, 2017. **15**(12): p. 1777-1791.
307. Sannino, G., et al., *Gene expression and immunohistochemical analyses identify SOX2 as major risk factor for overall survival and relapse in Ewing sarcoma patients*. EBioMedicine, 2019. **47**: p. 156-162.
308. Zayed, H. and I. Petersen, *Stem cell transcription factor SOX2 in synovial sarcoma and other soft tissue tumors*. Pathol Res Pract, 2018. **214**(7): p. 1000-1007.
309. Stoltz, K., et al., *Development of a Sox2 reporter system modeling cellular heterogeneity in glioma*. Neuro Oncol, 2015. **17**(3): p. 361-71.
310. Leis, O., et al., *Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells*. Oncogene, 2012. **31**(11): p. 1354-65.
311. Zhu, F., et al., *SOX2 Is a Marker for Stem-like Tumor Cells in Bladder Cancer*. Stem Cell Reports, 2017. **9**(2): p. 429-437.
312. Hermida-Prado, F., et al., *The SRC Inhibitor Dasatinib Induces Stem Cell-Like Properties in Head and Neck Cancer Cells that are Effectively Counteracted by the Mithralog EC-8042*. J Clin Med, 2019. **8**(8).
313. Golan, H., et al., *In Vivo Expansion of Cancer Stemness Affords Novel Cancer Stem Cell Targets: Malignant Rhabdoid Tumor as an Example*. Stem Cell Reports, 2018. **11**(3): p. 795-810.
314. Singh, D.K., et al., *Oncogenes Activate an Autonomous Transcriptional Regulatory Circuit That Drives Glioblastoma*. Cell Rep, 2017. **18**(4): p. 961-976.

Referencias

315. Vanner, R.J., et al., *Quiescent sox2(+) cells drive hierarchical growth and relapse in sonic hedgehog subgroup medulloblastoma*. *Cancer Cell*, 2014. **26**(1): p. 33-47.
316. Nunez, L.E., et al., *A novel mithramycin analogue with high antitumor activity and less toxicity generated by combinatorial biosynthesis*. *J Med Chem*, 2012. **55**(12): p. 5813-25.
317. Vaddi, P.K., et al., *Elimination of SOX2/OCT4-Associated Prostate Cancer Stem Cells Blocks Tumor Development and Enhances Therapeutic Response*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(9).
318. Bovee, J.V., et al., *Emerging pathways in the development of chondrosarcoma of bone and implications for targeted treatment*. *Lancet Oncol*, 2005. **6**(8): p. 599-607.
319. David, E., et al., *The Bone Niche of Chondrosarcoma: A Sanctuary for Drug Resistance, Tumour Growth and also a Source of New Therapeutic Targets*. *Sarcoma*, 2011. **2011**: p. 932451.
320. Polychronidou, G., et al., *Novel therapeutic approaches in chondrosarcoma*. *Future Oncol*, 2017. **13**(7): p. 637-648.
321. Wilding, J.L. and W.F. Bodmer, *Cancer cell lines for drug discovery and development*. *Cancer Res*, 2014. **74**(9): p. 2377-84.
322. Goodspeed, A., et al., *Tumor-Derived Cell Lines as Molecular Models of Cancer Pharmacogenomics*. *Mol Cancer Res*, 2016. **14**(1): p. 3-13.
323. Barretina, J., et al., *The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity*. *Nature*, 2012. **483**(7391): p. 603-7.
324. Iorio, F., et al., *A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer*. *Cell*, 2016. **166**(3): p. 740-754.
325. Lee, J.K., et al., *Pharmacogenomic landscape of patient-derived tumor cells informs precision oncology therapy*. *Nat Genet*, 2018. **50**(10): p. 1399-1411.
326. Ledford, H., *US cancer institute to overhaul tumour cell lines*. *Nature*, 2016. **530**(7591): p. 391.
327. Tinoco, G., et al., *The biology and management of cartilaginous tumors: a role for targeting isocitrate dehydrogenase*. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2015: p. e648-55.
328. Ben-David, U., et al., *Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution*. *Nat Genet*, 2017. **49**(11): p. 1567-1575.
329. Oshiro, Y., et al., *Altered p53 is associated with aggressive behavior of chondrosarcoma: a long term follow-up study*. *Cancer*, 1998. **83**(11): p. 2324-34.
330. Yamaguchi, T., et al., *Loss of heterozygosity and tumor suppressor gene mutations in chondrosarcomas*. *Anticancer Res*, 1996. **16**(4A): p. 2009-15.
331. Azzi, G., M. Velez, and M.C. Mathias-Machado, *Isocitrate dehydrogenase mutations in chondrosarcoma: the crossroads between cellular metabolism and oncogenesis*. *Curr Opin Oncol*, 2014. **26**(4): p. 403-7.
332. Saiji, E., et al., *IDH1 immunohistochemistry reactivity and mosaic IDH1 or IDH2 somatic mutations in pediatric sporadic enchondroma and enchondromatosis*. *Virchows Arch*, 2019. **475**(5): p. 625-636.
333. Tan, C.L., et al., *Molecular profiling of different glioma specimens from an Ollier disease patient suggests a multifocal disease process in the setting of IDH mosaicism*. *Brain Tumor Pathol*, 2018. **35**(4): p. 202-208.
334. Velagapudi, S., S.M. Alshammari, and S. Velagapudi, *Maffucci Syndrome with Clival Enchondroma in Nasopharynx: A Case Report*. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2019. **71**(Suppl 1): p. 652-656.
335. Kipp, B.R., et al., *Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cholangiocarcinoma*. *Hum Pathol*, 2012. **43**(10): p. 1552-8.
336. Wang, P., et al., *Mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinomas and share hypermethylation targets with glioblastomas*. *Oncogene*, 2013. **32**(25): p. 3091-100.

Referencias

337. *IDH-Mutated AML: Beyond Enasidenib and Ivosidenib Monotherapy: Highlights From SOHO 2021*. J Adv Pract Oncol, 2022. **13**(Suppl 1): p. 12-14.
338. Ma, T., et al., *Inhibitors of Mutant Isocitrate Dehydrogenases 1 and 2 (mIDH1/2): An Update and Perspective*. J Med Chem, 2018. **61**(20): p. 8981-9003.
339. Aigner, T., et al., *Prognostic relevance of cell biologic and biochemical features in conventional chondrosarcomas*. Cancer, 2002. **94**(8): p. 2273-81.
340. Nicolle, R., et al., *Integrated molecular characterization of chondrosarcoma reveals critical determinants of disease progression*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 4622.