

de MIX en la supervivencia global de los pacientes en etapas tempranas. Estos resultados sugieren su potencial para detectar la agresividad del tumor y complementar la clasificación actual de tumores.

Conclusión

Nuestros resultados demuestran que las CSC identificadas por MIX podrían proporcionar una herramienta pronóstica que permita a los médicos clasificar mejor a los pacientes en etapas tempranas con alto riesgo de recaída para adaptar las decisiones de tratamiento.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es la principal causa de muertes relacionadas con el cáncer en todo el mundo, donde el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNM) sigue siendo el subtipo más común. A pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento, la quimioterapia y las terapias dirigidas tienen una eficacia reducida debido a los mecanismos de resistencia heterogéneos. Se observan células madre del cáncer de pulmón (CSC) y una heterogeneidad significativa incluso en las etapas tempranas del CPNM. Después de la cirugía de pulmón, la falta de tratamientos dirigidos requiere un seguimiento a largo plazo para prevenir la recaída. La resistencia terapéutica sigue siendo una preocupación importante, lo que conduce a altas tasas de recurrencia y malos resultados de supervivencia dentro de 2 años y malos resultados de supervivencia a los 5 años (15% y 20%, respectivamente).

Cada vez hay más evidencia que sugiere la presencia de CSC en y por grupos de tumores incluso después del tratamiento, y contribuyen a la resistencia a la terapia y a la recaída de la enfermedad. Estas CSC comparten características con las células madre normales, incluida la auto renovación, pero también desempeñan un papel distinto en la iniciación y progresión del tumor, agresividad y recaída(7). Los posibles marcadores de CSC en el pulmón incluyen marcadores de superficie (CD133, EpCAM), factores de transcripción nucleares (Nanog, Oct4, Sox2) y la enzima ALDH1A1(8). La identificación y cuantificación de CSC en tumores promete avanzar en la terapia y mejorar la evaluación pronóstica en pacientes con cáncer de pulmón.

Los marcadores de CSC existentes carecen de especificidad y confiabilidad, y las técnicas actuales de detección y aislamiento tienen limitaciones(9, 10). Existe una demanda de marcadores específicos de CSC compatibles con técnicas clínicas como la inmunohistoquímica, para mejorar los diagnósticos y estrategias de tratamiento basadas en CSC.

Además, se ha reconocido durante muchos años que los cambios post-traduccionales podrían ser marcadores relevantes de células madre que desaparecen durante el proceso de diferenciación (11, 12). Por lo tanto, ya se ha destacado la importancia de los cambios en la glicosilación en el marcador de células madre CD133 durante la diferenciación de las CSC. Mientras que la proteína CD133 está presente tanto en las CSC como en las células tumorales diferenciadas, el epítipo AC133 está selectivamente enmascarado y expresado solo en las CSC(12). Sin embargo, la implementación de métodos convencionales para caracterizar los biomarcadores de glicosilación de las CSC en la práctica clínica sigue siendo un desafío.

Previamente desarrollamos un nuevo enfoque para detectar CSC a partir de una población heterogénea de células tumorales. Esta metodología original utiliza una combinación de lectinas vegetales biotiniladas (UEA-1 y GSL-I) que reconocen selectivamente patrones de glicanos expresados exclusivamente por las CSC. La importancia de este nuevo método para detectar CSC se ha demostrado por primera vez en el cáncer de colon(13). En este último, los pacientes con una alta tinción de ColoSTEM tienen un mal pronóstico, con una reducción significativa en la supervivencia global (SG) a los 5 años incluso en las primeras etapas de la enfermedad. La tinción de ColoSTEM supera al marcador estándar Oct-4 en la distinción entre CSC y células

ActB (Hs01064291, Thermo Fisher, Francia) y GAPDH (Hs02786624, Thermo Fisher, Francia), y se cuantificó mediante el método $\Delta\Delta Ct$.

Western-Blot

Las células se lisaron utilizando un tampón RIPA (Thermo Scientific™, Francia), se centrifugaron y se determinó la concentración de proteína utilizando un ensayo de proteína Bradford (BioRad). Las muestras se separaron en geles de SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF (GE Healthcare) y se bloquearon durante 1 hora en 5% de BSA-PBS antes de ser incubadas con anticuerpos primarios, incluyendo anti-CD133 (130-113-107; Miltenyi Biotec, Francia), anti-EpCAM (130-110-997; Miltenyi Biotec, Francia), anti-Oct4 (130-109-764; Miltenyi Biotec, Francia), anti-SLUG (C19G7; Ozyme, Francia), anti-Snail (C15D3; Ozyme, Francia) y anti-ZEB1 (3396; Ozyme, Francia), durante la noche a 4°C. Luego, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios (Dako Cytomation) durante 1 hora y se revelaron utilizando un G-Box (Syngene, Fisher Scientific, Francia).

Ensayo de Migración

Las células separadas se sembraron para alcanzar la confluencia completa en 24 horas. Al día siguiente, se crearon heridas con un WoundMaker™ (Sartorius, Gotinga, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, se añadieron 100 µl de medio de cultivo a los pocillos. La migración celular se monitoreó con Incucyte (Sartorius, Gotinga, Alemania) cada 2 horas durante 48 horas con Rapid Read NuLight (NC1404054, Sartorius, Gotinga, Alemania). La cicatrización de las heridas se midió con el software IncuCyte (software Incucyte 2022 Rev1, Sartorius).

Ensayo de Invasión

Los esferoides se incrustaron en 100 µl de Matrigel® (Corning 35625, EE. UU.) a 100 µg/mL en una placa de 96 pocillos y se añadieron 100 µL de medio de cultivo. Los esferoides se examinaron diariamente con un microscopio óptico (Olympus CKX53) a una magnificación de x100. La invasión en Matrigel® se midió con el programa de análisis de macros Fiji con el software ImageJ(14).

Inmunohistoquímica

La tinción de inmunohistoquímica se realizó en secciones histológicas de parafina de 4 µm utilizando la plataforma de tinción automática Leica Bond Max (Leica, Francia). Las secciones se tiñeron con una mezcla pre-diluida en diluyente y se detectaron con el kit de Detección Bond Intense R y el kit de Detección Bond Polymer Refine Red (Leica, Francia). Los núcleos se tiñeron con hematoxilina, y las diapositivas se examinaron con el NanoZoomer RS 2.0 Hamamatsu (Hamamatsu Photonics, Massy, Francia)(13). La tinción con MIX resultó en una tinción marrón de las membranas y/o citoplasma. Un método de puntuación basado en un umbral de tinción del 30% categorizó a los pacientes como "Tinción baja" o "Tinción alta".

La tinción con MIX y su correlación con diferentes parámetros clínicos se llevaron a cabo en tumores pulmonares obtenidos de HCL y AMSBIO (Tabla 1). Además, para evaluar la eficacia de MIX en reconocer solo las CSCs, utilizamos 62 tejidos pulmonares no tumorales de Tissue Microarray (TMA) como controles MIX negativos, que fueron proporcionados por AMSBIO. De esta manera, se evaluó la sensibilidad y especificidad comparando la tinción con MIX en 62 muestras de tejido no tumoral con muestras de NSCLC utilizando la curva ROC (Característica Operativa del Receptor).

La tasa de proliferación se evaluó con el anticuerpo Ki67 (clon 30-9, Ventana-Roche Medical Systems) siguiendo los protocolos proporcionados por los fabricantes de anticuerpos en los departamentos de patología del Hospital Universitario de Limoges. Se calculó una relación de células positivas y negativas para Ki67 respecto al recuento total de células.

Figure 5.

A.

		Univariate Cox analysis			Multivariate Cox analysis		
		HR	95% CI of HR	P Value	HR	95% CI of HR	P Value
Sex	Male (ref.)						
	Female	0.8012	0.5534 - 1.16	0.24	/	/	/
Age	≤ 60 yrs (ref.)						
	> 60 yrs	1.148	0.7976 - 1.654	0.457	/	/	/
Stage	Early (ref.)						
	Late	2.791	1.923 - 4.051	6.57e-08	2.838	1.942 - 4.146	7.01e-08
MIX staining	Low (ref.)						
	High	1.334	0.9133 - 1.948	0.136	1.382	0.933 - 2.047	0.107

B.

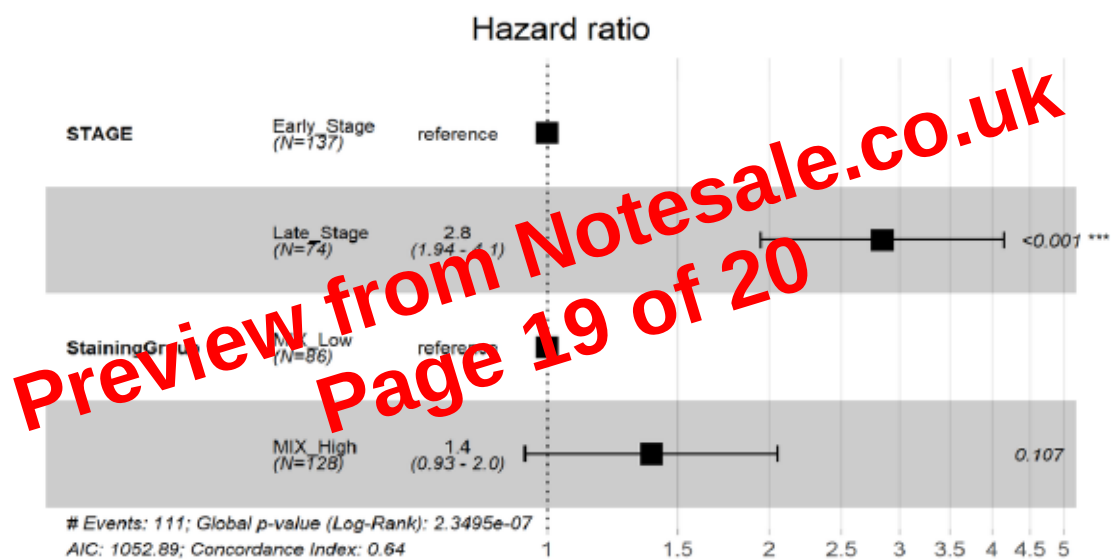


Figura 5

Valores pronósticos de características clínico-patológicas (género, edad, etapa y tinción MIX) en el seguimiento de pacientes con adenocarcinoma de pulmón.

- A. Resultados de los análisis de regresión de Cox invariados y multivariados con respecto a la supervivencia global (OS) en la cohorte. El análisis multivariado se realizó con las características que tenían un valor de p inferior a 0.2 en el análisis invariado. B. Gráfico de bosque del riesgo (HR) para la supervivencia global mediante análisis multivariado de Cox. HR, riesgo; C.I., intervalo de confianza.