



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

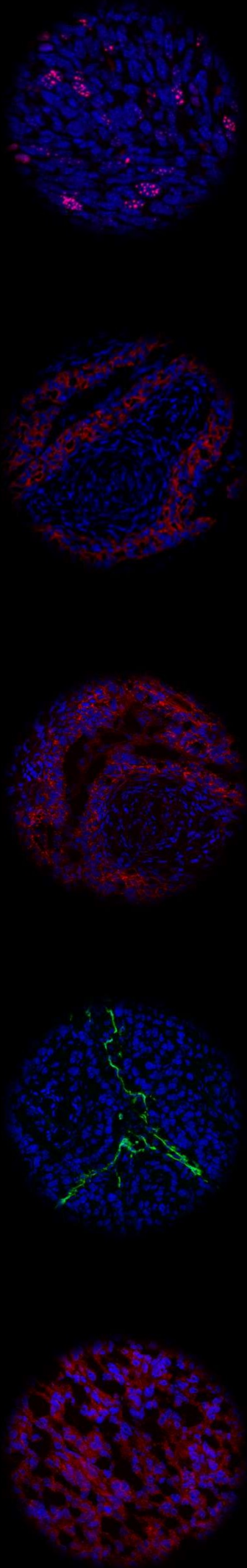
Estudio de los mecanismos moleculares que promueven la progresión del carcinoma escamoso de piel

Pilar Simón Extremera

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Estudio de los mecanismos moleculares que promueven la progresión del carcinoma escamoso de piel

Pilar Simón Extremera
Memoria de tesis doctoral

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

Estudio de los mecanismos moleculares que promueven la progresión del carcinoma escamoso de piel

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORADO BIOMEDICINA

**Estudio de los mecanismos moleculares que promueven la progresión del
carcinoma escamoso de piel**

Memoria presentada por Pilar Simón Extremera para optar al título de doctor por la
Universitat de Barcelona

Dra. Purificación Muñoz Moruno
Director

Dra. Isabel Fabregat Romero
Tutor

Pilar Simón Extremera
Doctorando

Pilar Simón Extremera
2017

Caminante no hay camino, se hace camino al andar

Antonio Machado

Agradecimientos

Parece que fue ayer cuando llegaba a Barcelona a embarcarme en este proyecto y ya han pasado cinco años. Cinco años en los que no sólo se ha construido este trabajo, si no también una vida, una familia. Han sido muchas las personas que han hecho posible que haya conseguido llegar hasta aquí y a todas ellas quiero darles las gracias.

En primer lugar, a la Dra. Purificación Muñoz. Gracias por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de formar parte de tu equipo. Quiero agradecerte todo el apoyo que me has prestado siempre a nivel científico, toda la ayuda que siempre has estado dispuesta a darme durante el desarrollo de este trabajo, pero sobretodo, quería agradecerte el apoyo, la comprensión y el cariño en los momentos difíciles. Sin todo esto el desarrollo de esta tesis no habría sido posible. De todo corazón, gracias.

Durante estos años he contado con los mejores compañeros de laboratorio. Quiero dar las gracias a todos los que habéis formado parte del Grupo de envejecimiento y Cáncer, porque todos formáis parte de este trabajo. Quería agradecer a Vicky, por la ayuda prestada desde los primeros días que empecé en el laboratorio y porque, junto a Adriá, su contribución en este trabajo ha sido enorme. A María Urpí y a Adriá, gracias por estar ahí cada día, por hacer que las cosas sean más fáciles cuando parece que no van bien, porque sin darnos cuenta hemos construido una amistad y sin vosotros no habría sido capaz de llegar hasta aquí. Laura, hace poco más de un año que nos conocemos y durante este año has sido un apoyo muy importante para mí. Gracias por todo, por ser como eres, por nuestras conversaciones, por las risas fuera del labo, te voy a echar mucho de menos!

Quería dar las gracias también a todas las personas que forman y han formado parte del grupo de Transformación y Metástasis, porque siempre que he necesitado ayuda habéis estado ahí sin dudar, por las risas, por vuestra amistad. A Sandra y a Eva, porque además de ser unas maravillosas compañeras de laboratorio, os habéis convertido en unas buenas amigas.

Me siento muy afortunada de haber formado parte del Pebc6, estoy segura de que no podría haber pasado estos 5 años con mejores personas, sois todos increíbles!!

Gracias a todas las personas que forman parte del Pebc, porque todos habéis contribuido de alguna manera al desarrollo de esta tesis y porque trabajar a vuestro lado ha sido un privilegio.

A mis niñas de Málaga, Mlo, Anni y Bea, gracias por estar ahí siempre y apoyarme! Os quiero!

Juan, gracias por formar parte de mi vida y por su puesto de este trabajo, por los 5 minutillos en el parc y porque siempre siempre estás ahí!

A mi familia de Jaén, crecimos juntos en la universidad, cuando éramos proyectos de biólogos y proyectos de las personas que somos ahora, y quien nos iba a decir que después de más de 10 años

íbamos a seguir siendo una gran familia! Gracias a todos por haber estado apoyándome siempre, aunque haya sido desde la distancia! sois muy importantes en mi vida.

Chicos! Que no me olvido de vosotros!!... a mi familia catalana, Martí, Sergi, Nuri, Rubén, Alejo, Anne, Andrea, Sinje, Lolo y María, a las Darlings y el miembro,... a todos, gracias!! Porque habéis sufrido esta tesis casi tanto como yo... qué pesada puedo llegar a ser!! Y porque hay un trocito de cada uno de vosotros en este trabajo. Sin vosotros mi vida aquí no sería lo mismo! Sois los mejores!!

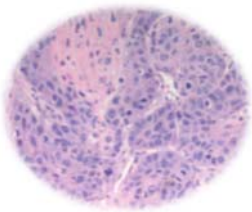
A mi hermano y a mis Primis! Gracias por estar ahí siempre.

Quería dar especialmente las gracias a mis padres, Miguel y Pilar, por haber confiado siempre en mí, por apoyarme en mis decisiones, porque gracias a vosotros soy la persona que soy ahora y porque gracias a vosotros seguiré creciendo. Papa, porque en gran parte tú eres el responsable de que haya llegado hasta aquí, porque desde pequeña me descubriste el mundo de la biología, que era tu pasión, y desde entonces siempre me has apoyado en todos mis pasos. Os quiero mucho!

Por último, quiero dar las gracias a Quique y a Lucas, nunca hubiera imaginado tener una familia más bonita! Lucas, gracias por la paciencia mientras mamá trabajaba, gracias por tu sonrisa, por tus carcajadas, por tus abrazos y tus besos. Quique, GRACIAS por la paciencia, por el apoyo, por las conversaciones, por comprender este trabajo, que a veces no es fácil, por estar a mi lado, por animarme a seguir y por cuidar de Lucas mientras yo daba forma a este proyecto. Sin ti a mi lado me habría sido imposible llegar hasta aquí. TE QUIERO.

Gracias de todo corazón a todas y cada una de las personas que han contribuido en este trabajo que también es vuestro.

Abreviaturas



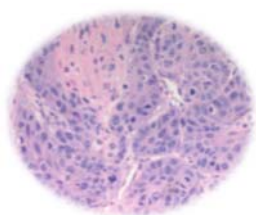
BCC	Carcinoma de célula basal
BMPs	Proteínas morfogenéticas óseas
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAF	Fibroblastos asociados al cáncer
CLC	<i>Cardiotrophin-like cytokine</i>
CNTF	Factor neutrofílico ciliar
CSC	<i>Cancer stem cell</i>
CSF	Factor estimulador de colonias
CT-1	Cardiotrofina-1
DAG	<i>D-1,2-Diacilglicerol</i>
DMBA	7,12-dimetilbenz(a) antraceno
DMSO	Dimetilsulfóxido
E-CSCs	<i>Early cancer stem cell</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMT	Transición epitelio-mesénquima
EPU _s	<i>Epidermal proliferative units</i>
FDR	<i>Benjamini-Hochberg false discovery rate</i>
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FRS2	<i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>

GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GO	Ontología del Gen
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
Grb2	Proteína de unión a receptor de factores de crecimiento 2
HF	Folículo piloso
HNSCC	Carcinoma escamoso de cabeza y cuello
HPV	Papilomavirus humano
IFE	Epidermis interfolicular
IL	Interleuquina
IP3	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
K1	Queratina 1
K10	Queratina 10
K14	Queratina 14
K5	Queratina 5
L-CSCs	<i>Late cancer stem cell</i>
Lgr5	<i>Leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor 5</i>
LHX2	<i>LIM homeobox 2</i>
LIF	Factor de inhibición de leucemia
MD	Moderadamente diferenciado
MET	Transición mesénquima-epitelio
MMPs	Metaloproteinasas de matriz extracelular

MSCs	Células madre mesenquimales
NFATc1	<i>Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1</i>
NMSC	Cáncer de piel no-melanoma
NRGs	Neuregulinas
NSLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
OSM	Oncostatin M
OT	Ortotópico
PD/S	Pobremente diferenciado/fusocelular
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PFA	Paraformaldehído
PIP2	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PTB	<i>Phosphotyrosine-binding domain</i>
Rb	Retinoblastoma
RTK	Receptores tirosina quinasa
RTK	Receptores tirosina quinasa
SC	Célula madre
SCC	Carcinoma de célula escamosa
SCR	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>

SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
SG	Glándula sebácea
SH2	<i>Src Homology 2</i>
SOS1/SOS2	<i>Son of sevenless 1/2</i>
SOX9	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
Src	Proto-oncogen tirosina quinasa del sarcoma Rous
STAT	Factores activadores y transductores de la señal
TA	<i>Transit amplifying</i>
TAN	Neutrófilos asociados a cáncer
TCF	<i>Transcription factor</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TICs	Células iniciadoras de tumores
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WD	Bien diferenciado
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

Índice



ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
-------------------	---

INTRODUCCIÓN

1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA EPIDERMIS	25
2. LAS CÉLULAS MADRE DE LA EPIDERMIS.....	26
2.1. Características de las células madre.....	26
2.2. Identificación de las células madre mediante ensayos de trazado de linaje	28
2.3. Poblaciones de células madre epidérmicas	29
2.3.1. Células madre de la epidermis interfolicular.....	29
2.3.2. Células madre del folículo piloso.....	30
3. CARCINOMAS DE PIEL	31
3.1. Carcinoma de célula escamosa de piel	32
3.2 Origen celular del carcinoma de célula escamosa de piel	33
4. CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER.....	34
4.1. Heterogeneidad tumoral y el modelo de las células madre del cáncer.....	34
4.2. Identificación y caracterización de las CSCs en SCCs de piel	36
5. PROGRAMA DE TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (EMT) Y PROGRESIÓN TUMORAL.....	37
5.1. Relación entre el programa de EMT y la adquisición de las características CSCs.....	38
5.2. Vías de señalización reguladoras del programa de EMT y de la progresión tumoral	39
5.2.1.Vía de señalización mediada por EGF.....	40
5.2.1.1. EGFR, ligandos y vías de transducción de señales	40
5.2.1.2. Implicación de la vía de EGFR en cáncer.....	41

5.2.2. Vía de señalización mediada por FGF	42
5.2.2.1. FGFR, ligandos y vías de transducción de señales.....	42
5.2.2.2. Alteraciones de la vía de FGFR en cáncer	43
5.2.3. Vía de señalización mediada por PDGF	44
5.2.3.1. PDGFR, ligandos y vías de transducción de señales.....	44
5.2.3.2. Alteraciones de la vía de PDGFR en cáncer	46
5.2.3.3. La vía de PDGFR y el microambiente tumoral	46
6. EL MICROAMBIENTE TUMORAL	47
6.1. Componentes del microambiente tumoral	47
6.2. Citoquinas.....	48
6.2.1. Implicación de las citoquinas en cáncer	49
6.3. Quimioquinas	50
6.3.1. Implicación de las quimioquinas en cáncer	52
6.3.1.1. Quimioquinas y desarrollo de metástasis	53
6.3.2. La vía de señalización mediada por SDF-1 α	54
6.3.2.1. Señalización SDF-1 α /CXCR4.....	55
6.3.2.2. Señalización SDF-1 α /CXCR7	56
6.3.2.3. Señalización de SDF-1 α mediante heterodímeros CXCR4-CXCR7	57
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	61
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. MODELOS DE RATÓN.....	65
1.1. Modelos de ratón de trazado de linaje.....	65

1.2. Modelo de progresión tumoral.....	65
2. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS DE LAS MUESTRAS TUMORALES	66
2.1. Diagnóstico histopatológico. Tinción hematoxilina-eosina.....	67
2.2. Tinción LacZ.....	67
2.3. Ensayos de inmunohistoquímica.....	68
2.4. Ensayos de inmunofluorescencia	69
3. AISLAMIENTO DE CÉLULAS DE SCCS Y ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	70
3.1. Aislamiento de células de SCCs.....	70
3.2. Análisis y separación celular mediante citometría de flujo	70
4. CULTIVOS CELULARES Y TRATAMIENTOS	71
4.1. Cultivos celulares	71
4.2. Tratamientos de estimulación/inhibición y ensayos de proliferación <i>in vitro</i>	71
4.3. Ensayos de invasión celular	72
5. TRANSDUCCIONES LENTIVIRALES	73
6. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	73
6.1. Extracción de proteínas de células tumorales	73
6.2. Extracción de proteínas de muestras tumorales	74
7. WESTERN BLOT	74
8. ENSAYO ELISA (<i>ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i>)	75
9. RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (QRT-PCR)	75
9.1. Retrotranscripción	75
9.2. qRT-PCR	76

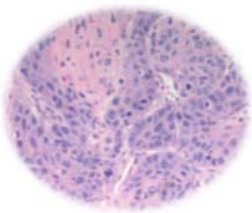
9.2.1. qRT-PCR mediante SYBR Green	76
9.2.2. qRT-PCR mediante TaqMan	78
10. INYECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES Y TRATAMIENTOS <i>IN VIVO</i>	79
10.1. Inyección de células tumorales	79
10.2. Tratamientos <i>in vivo</i>	79
11. AMPLIFICACIÓN DE ADN Y ANÁLISIS DE MICROARRAYS.....	80

RESULTADOS

1. IMPACTO DEL ORIGEN DE LAS SCs EPIDÉRMICAS EN EL DESARROLLO DE PD/S-SCCs Y EN PROGRESIÓN TUMORAL.....	83
2. ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES Y FUNCIONALES DE LAS CSCs DURANTE LA PROGRESIÓN DE LOS SCCs DE PIEL.....	86
2.1. Análisis de la frecuencia de CSCs y de la inducción del programa de EMT durante la progresión de SCCs de piel	87
2.2. Las características de las CSCs cambian durante la progresión de los SCCs de piel.....	92
2.3. Caracterización de los cultivos primarios de células tumorales aisladas de WD-SCCs y PD/S-SCCs.....	94
2.4. La vía de señalización de WNT/ β -catenina está atenuada en los SCCs de piel avanzados.....	95
2.5. La activación autocrina y paracrina de la vía de EGFR promueve la proliferación y supervivencia de las E-CSCs.....	97
2.6. La activación autocrina de la vía de PDGFR α en las L-CSCs promueve su migración y la metástasis en los PD/S-SCCs	100
2.7. La activación autocrina de la vía mediada por FGFR1 promueve el crecimiento de los SCCs avanzados	106
3. CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL DURANTE LA PROGRESIÓN DE LOS SCCs DE PIEL.....	110

3.1 Análisis de la expresión de citoquinas y receptores durante la progresión de los SCCs de piel	110
3.2 Las poblaciones celulares del estroma cambian durante la progresión de los SCCs	111
3.3 La expresión de citoquinas/receptores cambia en las células tumorales durante la progresión de SCCs de piel	113
4. IMPACTO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR SDF-1 α EN EL CRECIMIENTO DE LOS PD/S-SCCs Y EN EL DESARROLLO DE METÁSTASIS.....	115
4.1. La activación de la vía de PDGFR α induce la expresión de SDF-1 α en las CSCs de SCCs avanzados.....	115
4.2 La vía de señalización mediada por SDF-1 α se induce de forma autocrina en las CSCs de los SCC avanzados	116
4.3. La activación autocrina de la vía de SDF-1 α promueve la proliferación y migración de las L-CSCs	118
4.4. La activación de la vía de SDF-1 α promueve el crecimiento de los PD/S-SCCs y el desarrollo de metástasis	120
DISCUSIÓN	125
CONCLUSIONES	143
BIBLIOGRAFÍA	147
ANEXO	173

Introducción



1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA EPIDERMIS

La piel ejerce una función esencial como barrera protectora contra agresiones ambientales externas, como la radiación ultravioleta, agresiones físicas, la pérdida de agua o infecciones por microorganismos. Este tejido está en constante regeneración, proporcionando protección a lo largo de la vida de los animales (Cedric Blanpain and Fuchs 2009).

Las principales capas de la piel, ordenadas desde la más interna a la más externa, son la hipodermis o tejido subcutáneo, la dermis y la epidermis.

La hipodermis es la capa más gruesa de la piel, unida a la dermis por fibras de elastina y de colágeno. Su principal componente celular son los adipocitos, que desempeñan una función aislante y participan en la termorregulación de la piel y en la síntesis de moléculas implicadas en la reacción inflamatoria (Lanigan & Zaidi 2010).

Subyacente a la epidermis, se encuentra la dermis. Está formada por un tejido conjuntivo laxo, compuesto de una red de fibras de colágeno, elastina y reticulina. Esta red proporciona la flexibilidad y elasticidad características de la piel. Los fibroblastos son el principal componente celular de la dermis, además de las células inmunes que infiltran este tejido (revisado en Lanigan & Zaidi, 2010).

La epidermis es la capa más externa de la piel. Está formada por la epidermis interfolicular (IFE) y estructuras asociadas, como son los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y, en humanos, las glándulas sudoríparas (Fuchs and Raghavan 2002). La IFE es la región de la epidermis que queda flanqueada por los folículos pilosos y está constituida por varias capas de células organizadas siguiendo un gradiente de diferenciación. En la capa basal, en contacto directo con la lámina basal, que separa la epidermis y la dermis, se localizan las células más indiferenciadas y proliferativas. A continuación, se distribuyen las capas suprabasales, que engloban la capa espinosa, la capa granular y el estrato cornificado. Estas capas contienen queratinocitos en diferentes estadios de diferenciación. Así, a medida que las células de la capa basal se diferencian se desplazan progresivamente a través de las capas suprabasales hacia la superficie de la epidermis, donde finalmente se desprenden (Blanpain & Simons 2013).

Las células de las distintas capas de la IFE se pueden distinguir por su morfología y por la expresión de diferentes queratinas y proteínas específicas. Las células de la capa basal expresan queratina 5 (K5) y queratina 14 (K14), así como p63, el cual está implicado en el proceso de estratificación (Mills et al. 1999; Yang et al. 1999). Las células de la capa espinosa expresan queratina 1 (K1) y queratina (K10) (Santos et al. 2002), y las de la capa granular se caracterizan por la expresión de filagrina y loricrina (Solanas & Benitah 2013) (Figura 1). Finalmente, las células de la capa granular pierden los núcleos y

sufren un proceso de queratinización dando lugar a las células cornificadas, que activan el proceso de muerte celular programada. Las queratinas producidas por las células cornificadas se acumulan formando la capa más externa de la epidermis, generando una barrera protectora frente a la desecación, los patógenos y daños físicos y químicos (Henry et al. 2012).

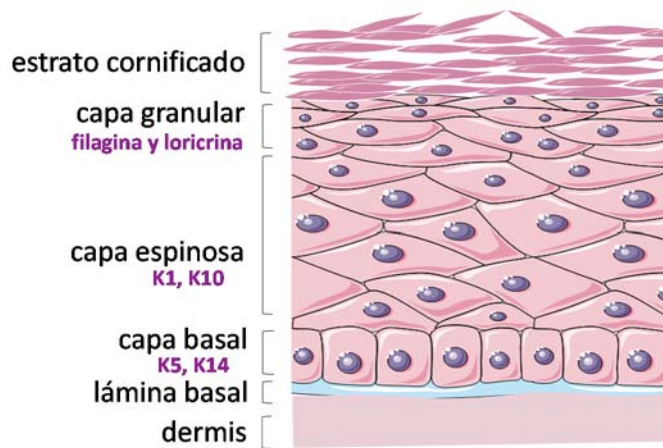


Figura 1. Estructura de la epidermis interfolicular de la piel. (Adaptado de Solanas and Benitah 2013).

La mayoría de los mamíferos presentan la piel cubierta de pelo que los protege de la temperatura y el ambiente exterior. El pelo es una estructura queratinizada que se genera a partir de los folículos. En ratones, la morfogénesis de los folículos se completa en las 2 semanas siguientes al nacimiento, cuando las células de la matriz epitelial, que proliferan rápidamente, rodean casi completamente el componente mesenquimal del folículo, conocido como papila dermal (Choi et al. 2013). La papila dermal está constituida por fibroblastos dermales, cuya señalización es crucial para las interacciones epitelio-mesenquima que se producen durante la morfogénesis y el ciclo del pelo (Watt & Jensen 2009).

En la región superior del folículo piloso se distinguen: el infundíbulo, situado por encima de la glándula sebácea; la región del isthmus, localizada entre el *bulge* y la glándula sebácea; y las glándulas sebáceas, cuya función es lubricar la piel a través de la secreción de sebo. En la parte inferior de los folículos, situado por debajo de la glándula sebácea, se localiza el *bulge* (Figura 4) (Watt & Jensen 2009).

2. LAS CÉLULAS MADRE DE LA EPIDERMIS

2.1. Características de las células madre

Durante la vida adulta, la mayoría de los tejidos están sometidos a una renovación constante, mediante la cual el número de divisiones celulares en el tejido compensa al número de células que se pierden (C. Blanpain and Simons 2013). La renovación de los tejidos adultos está garantizada por la

existencia de poblaciones específicas de células madre (SCs) (Joseph & Morrison 2016). Además, estas SCs adultas se activan después de la inducción de lesiones, dividiéndose y diferenciándose para contribuir activamente en la reparación tisular (Nassar & Blanpain 2016).

Las SCs se definen generalmente por sus propiedades funcionales, como son su capacidad de auto-renovación a largo plazo y su capacidad de diferenciación en uno o varios linajes celulares. En este sentido, las SCs unipotentes se diferencian en un solo linaje, mientras que los SCs multipotentes se diferencian en múltiples linajes celulares (Nassar & Blanpain 2016).

Las SCs tienen la capacidad de realizar divisiones mitóticas simétricas o asimétricas. Durante la división simétrica, una SC puede dar lugar a dos células hijas idénticas que conservan las características de la célula madre, o bien dar lugar a dos células hijas que pierden estas características y acabarán diferenciándose. En cambio, durante la división asimétrica, una de las células hijas mantiene las características de la célula madre, mientras que la otra célula hija puede proliferar más activamente, dando lugar finalmente a células más diferenciadas (Pastushenko et al. 2015) (Figura 2). La división de las SCs da lugar a una población de células indiferenciadas, llamadas *transit amplifying* (TA). Estas células presentan un ritmo de división más rápido que las SCs, pero un menor potencial proliferativo a largo plazo, permitiendo generar de forma rápida los diferentes tipos celulares diferenciados necesarios para la reparación/regeneración del tejido de origen, mientras que las SCs permanecen en estado quiescente (Hsu et al. 2014). El equilibrio entre las divisiones simétricas y asimétricas permite regular el tamaño de la población de las SCs y de las células diferenciadas en los tejidos adultos (Wu et al. 2008).

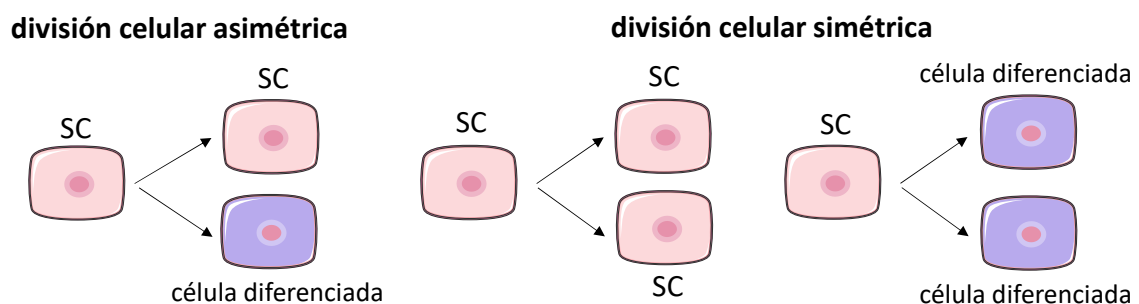


Figura 2. Auto-renovación de las células madre. La figura muestra el concepto de la división celular simétrica y asimétrica. Adaptada de Pastushenko et al. 2015.

Las SCs se encuentran rodeadas por un microambiente especializado, conocido como nicho, que regula la actividad de estas células (Morrison & Spradling 2008). Concretamente en la piel existen diferentes nichos que alojan las SCs epidérmicas. Estos se localizan en la región del bulge y el germen del pelo (Alonso and Fuchs 2003), la glándula sebácea, la zona del isthmus y la IFE (Cedric Blanpain and Fuchs 2009).

2.2. Identificación de las células madre mediante ensayos de trazado de linaje

El marcaje selectivo de una población de SCs permite investigar su implicación en la regeneración/reparación de un tejido y estudiar el destino de su progenie. Ésta, es un técnica que se ha utilizado durante mucho tiempo en biología del desarrollo y, desde hace algunos años, se ha aplicado al estudio de las SCs de la epidermis (Kretzschmar and Watt 2012).

En los primeros ensayos realizados para identificar SCs, se utilizaban nucleótidos modificados, como timidina tritiada o bromodesoxiuridina (BrdU). Éstos son incorporados en el ADN de las células en proliferación durante la fase S del ciclo celular (Taylor et al. 2000; Braun et al. 2003). Para marcar las células proliferativas de la epidermis, se inyectan ratones neonatos con BrdU (Bickenbach et al. 1986; Braun et al. 2003). El marcaje de BrdU se diluye en las células que han estado en división continua, pero se mantiene en aquellas que se han dividido más lentamente o infrecuentemente, como sería el caso de las SCs. Estos ensayos son útiles para determinar la localización de las poblaciones de SCs, pero no permiten el aislamiento de esta población de células ni su caracterización molecular (Braun et al. 2003).

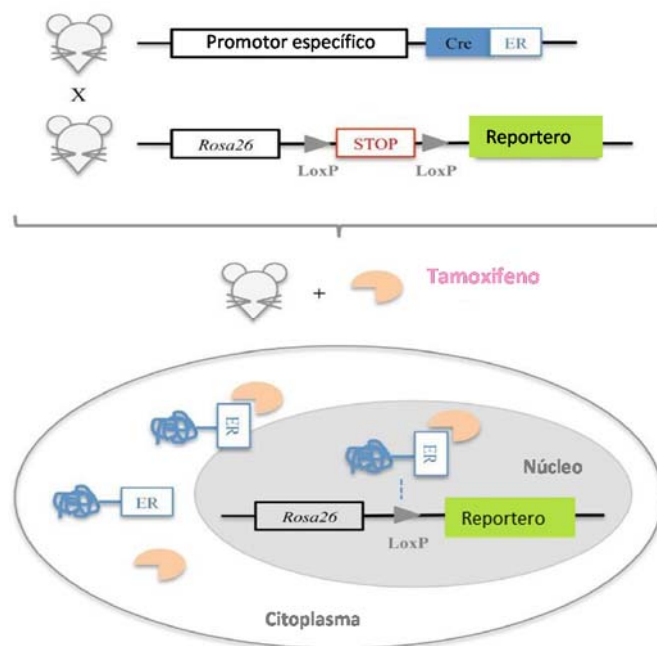


Figura 3. Sistema de trazado de linaje Cre-LoxP inducible por tamoxifeno. La recombinasa Cre está fusionada con un receptor de estrógenos mutado inducible por tamoxifeno (Cre^{ER}). En condiciones basales la Cre permanece inactiva en el citoplasma. La administración de tamoxifeno activa la Cre y la trasloca al núcleo, donde escinde el codón de STOP mediante la recombinación de los sitios LoxP, permitiendo la expresión del gen reportero. Adaptado de (Osório et al. 2016)

Más tarde, estos métodos fueron sustituidos por técnicas de marcaje genético permanente o trazado de linaje, que permiten marcar poblaciones específicas de SCs y su progenie. Para ello, se utilizan ratones transgénicos en los que la expresión de la enzima recombinasa Cre se regula bajo el control de un promotor que está activo específicamente en un tipo celular o tejido. Estos ratones contienen además un gen reportero (β -galactosidasa o la proteína GFP) insertado bajo un promotor ubicuo y que presenta un codón STOP al inicio del gen, el cual está flanqueado por dos regiones LoxP, (LoxP-

STOP-LoxP), secuencias dianas de la recombinasa Cre. La presencia de este codón de STOP bloquea la expresión del gen reportero. La expresión de Cre induce la escisión del codón STOP y permite la expresión del gen reportero en esta población de células y en su progenie (Soriano 1999). También se utiliza una forma de Cre inducible para marcar poblaciones concretas de células en un período de tiempo determinado. En este caso, la Cre está fusionada con un receptor mutado de estrógenos (Cre^{ER}) o de progesterona (Cre^{PR}). En ausencia de ligandos (tamoxifeno o RU468, respectivamente) la Cre se encuentra inactiva en el citoplasma. El tratamiento con estos ligandos induce la translocación de Cre al núcleo y con ello la expresión del gen reportero (Osório et al. 2016) (Figura 3).

2.3. Poblaciones de células madre epidérmicas

La piel es un órgano particularmente útil para estudiar la actividad de las SCs, debido a su gran capacidad de regeneración y a la existencia de diferentes poblaciones de SCs que mantienen y regeneran su estructura. La IFE contiene su propia población de SCs, que asegura la renovación de esta región de la epidermis, aun en ausencia de lesiones. Además, los folículos contienen SCs multipotentes que se activan al inicio del ciclo del pelo, permitiendo la regeneración del pelo (Cédric Blanpain and Fuchs 2006).

2.3.1. Células madre de la epidermis interfolicular

La capa basal de la IFE es heterogénea y contiene un reservorio de células basales quiescentes e indiferenciadas que participan en la regeneración y homeostasis de esta región de la epidermis.

Estudios realizados en los años 80 por Potten et al., describieron que la IFE está organizada formando un mosaico de unidades celulares proliferativas llamadas EPU (del inglés *epidermal proliferative units*). Estas EPU, están compuestas por SCs de división lenta que dan soporte a una población de células *transit-amplifying* (Potten & Morris 1988). Estudios más recientes, realizados mediante trazado de linaje, han demostrado la existencia de dos compartimentos celulares proliferativos distintos en la IFE, formados por SCs con ciclos de división lentos, y por células progenitoras “*committed*” un poco más diferenciadas. Ambas poblaciones expresan K14, pero se diferencian por su perfil de expresión génica, su modo de división y su habilidad para responder a daños en el tejido (Mascre et al. 2012). En este sentido, las SCs K14⁺, expresan niveles más elevados de α 6-integrina y β 1-integrina, así como de genes implicados en la regulación del ciclo celular. Por el contrario, la población de células progenitoras presentan inducida la expresión de genes que controlan diferenciación (Mascre et al. 2012). Tras la generación de una herida, las SCs contribuyen sustancialmente a la reparación y regeneración del tejido a largo plazo, mientras que las células progenitoras contribuyen de manera limitada a este proceso (Mascre et al. 2012). Estas observaciones sugieren que en la IFE, las células

progenitoras son las responsables del mantenimiento constante del tejido, mientras que las SCs permanecen quiescentes, movilizándose después de una lesión (Blanpain & Simons 2013).

2.3.2. Células madre del folículo piloso

Las SCs del folículo piloso tienen la función de regenerar el pelo, siguiendo ciclos que son regulados por señales provenientes de la dermis, y concretamente de la papila dermal (Alonso & Fuchs 2006) (Figura 4).

El ciclo de regeneración del pelo sigue 3 fases: la fase de crecimiento o anagen, la fase de regresión o catagen y la fase de reposo o telogen. Durante la fase de anagen, las SC se activan y generan células progenitoras y *transit-amplifying* que, tras la diferenciación producen el pelo. Durante la fase de catagen, las estructuras y poblaciones celulares generadas en anagen degeneran para dar lugar a un folículo en reposo (telogen), donde las SCs están en estado quiescente, preparadas para recibir señales externas y comenzar un nuevo ciclo de regeneración del pelo (Alonso & Fuchs 2006). Las poblaciones de SCs responsables de la regeneración del folículo piloso se localizan en el bulge y en el germen del pelo. Mediante experimentos de trasplante de SCs foliculares en ratones inmunodeficientes desnudos (nude), se demostró que las SCs del bulge son multipotentes. Esta población celular es capaz de generar todos los linajes celulares epidérmicos, incluyendo el folículo piloso, la glándula sebácea y la IFE (Oshima et al. 2001; Morris et al. 2004; Cedric Blanpain et al. 2004; Jaks et al. 2008). Más tarde, mediante estudios de trazado de linaje se demostró que las SCs del bulge contribuyen a todos los linajes celulares del folículo, pero no a la homeostasis de la IFE (Morris et al. 2004; Nowak et al. 2008; Jaks et al. 2008; Youssef et al. 2010). Por lo tanto, diferentes poblaciones de SCs serían responsables de la regeneración del folículo piloso y de la regeneración de la IFE durante la homeostasis. Sin embargo, tras la inducción de heridas, las SCs del bulge se activan y pueden movilizarse a la región de la IFE dañada para participar en la reparación de esta zona, junto con la población de SCs de la IFE (Tumbar et al. 2004; Ito et al. 2005; Levy et al. 2007).

En la piel de ratón, las SCs del bulge se caracterizan por la expresión de los marcadores CD34, LGR5 (*Leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor 5*), una elevada expresión de citoqueratinas K5, K14, K15 y de integrinas $\alpha 6 \beta 4$ and $\alpha 3 \beta 1$ (Lyle et al. 1998; Trempus et al. 2003; Jaks et al. 2008). Además, las SCs del bulge expresan factores de transcripción que permiten mantener las características de estas células, como son: SOX9 (SRY (*sex determining region Y*)-box 9), LHX2 (LIM *homeobox 2*), NFATc1 (*nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1*), TCF3 (*transcription factor 3*) y TCF4 (*transcription factor 4*) (Morris et al. 2004; Rhee, Polak, and Fuchs 2006; Nowak et al. 2008).

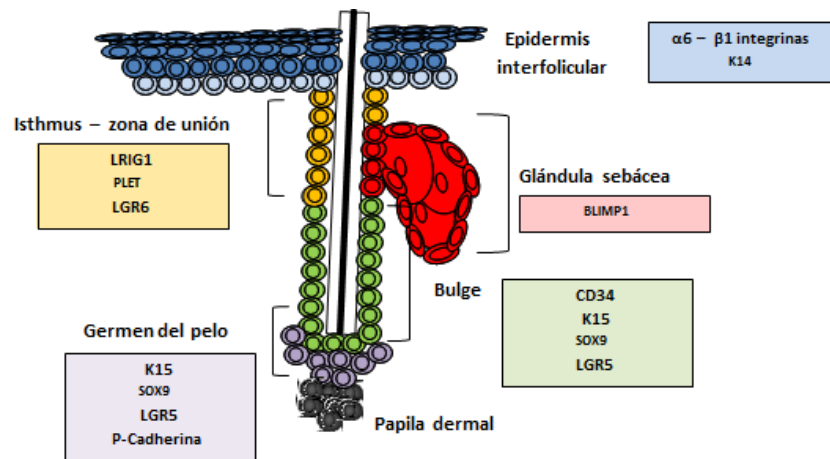


Figura 4. Poblaciones de SCs y células progenitoras de la epidermis. En los recuadros se indican los marcadores característicos de cada población de SCs. Adaptado de Arwert et al. 2012.

En la parte inferior del bulge, en el germen del pelo, se localiza un pequeño grupo de células progenitoras con características similares a las SCs del bulge, que conservan algunos de los marcadores de las SCs del bulge, a excepción de NFATc1 y CD34, pero que inducen además la expresión de P-cadherina (Greco et al. 2009; Woo & Oro 2011).

Más recientemente, se han identificado otros 2 tipos de SCs en el folículo: las localizadas en las glándulas sebáceas y en el isthmus. Las glándulas sebáceas se generan a partir de una población de SCs BLIMP1⁺, que se localiza en la zona de unión entre el bulge y la glándula (Woo & Oro 2011). Estas células, son mantenidas por las SCs LGR6⁺. Las células LGR6⁺ no sólo participan en el mantenimiento de las glándulas sebáceas, sino también de la IFE y el isthmus (Füllgrabe et al. 2015).

Las SCs del isthmus se caracterizan por expresar los marcadores LRIG1 y MTS234 (Nijhof et al. 2006). Estas SCs serían responsables de regenerar las poblaciones celulares del isthmus y pueden contribuir a la homeostasis de las glándulas sebáceas (Nijhof et al. 2006; Jensen et al. 2008). Además, estas células son capaces de regenerar la IFE, el folículo y la glándula sebácea, cuando son implantadas en la piel de ratones nude, lo que sugiere que puede tratarse de SCs multipotentes (Jensen et al. 2008).

3. CARCINOMAS DE PIEL

Los carcinomas de piel son el grupo de tumores con mayor incidencia en humanos (Madan, et al 2010). El desarrollo de esta patología está principalmente asociado a los efectos mutagénicos producidos por una exposición continuada a la radiación ultravioleta, aunque factores genéticos, epigenéticos y ambientales pueden incidir en su desarrollo (Burton et al. 2016).

Alrededor del 80% de los carcinomas de piel son carcinoma de célula basal (BCC). Aunque el carcinoma de célula escamosa (SCC) sólo representa alrededor de un 20% del total de carcinomas de

piel, estos son los más agresivos, ya que muestran una mayor capacidad invasiva y metastásica (Burton et al. 2016).

3.1. Carcinoma de célula escamosa de piel

El SCC se asocia con la tasa de mortalidad por cáncer de piel más alta en adultos caucásicos de edades avanzadas (Phillips et al. 2011). Su incidencia ha aumentado durante las últimas décadas, siendo mayor en las zonas cercanas al ecuador (Samarasinghe et al. 2011). En la mayoría de los casos, los SCCs aparecen en áreas de la piel expuestas al sol y se considera que la radiación UV sería el principal factor que contribuye al desarrollo de esta patología. La radiación UV induce la formación de dímeros de timidina, los cuales producen mutaciones en múltiples genes, entre ellos el gen supresor tumoral p53. En este sentido, se han identificado mutaciones en p53 derivadas de la radiación UV en lesiones precursoras del SCC de piel, como es la queratosis actínica (Kauvar et al. 2015). Otros factores de riesgo relacionados con el desarrollo de SCC de piel son la exposición a la radiación ionizante, a carcinógenos químicos como el arsénico o hidrocarburos aromáticos, o la inmunosupresión derivada del trasplante de órganos, así como la presencia de heridas crónicas (Alam and Ratner 2001). El desarrollo de SCCs cutáneos también se ha asociado con la infección con algunos papilomavirus humanos (HPV), concretamente con el subgrupo de alto riesgo HPV16, el cual codifica las oncoproteínas virales E6 y E7. Estas proteínas inactivan las proteínas de la familia de retinoblastoma (Rb) y conducen a la pérdida de función de p53, estando ambas pérdidas de función íntimamente ligadas a la carcinogénesis (Ghittoni et al. 2010; Moody and Laimins 2010).

La mayoría de los pacientes con SCC de piel son tratados mediante escisión quirúrgica. Estos tumores primarios presentan una tasa de recurrencia a los 5 años de un 8%, y alrededor del 5% generan metástasis. En el caso de los SCCs recurrentes, el porcentaje de tumores que metastatizan se triplica, siendo los principales órganos diana los nódulos linfáticos, seguidos de los pulmones, el hígado, el cerebro y otras regiones de la piel. Los pacientes que presentan este tipo tumoral agresivo, tienen un mal pronóstico y una tasa de supervivencia en torno al 20% (Alam and Ratner 2001). Los pacientes con SCC cutáneo reciben tratamientos en base al grado que presenta el tumor. Así, los tumores primarios bien localizados se escinden mediante criocirugía o electrodesecación, mientras que los pacientes con SCCs altamente invasivos, recurrentes o metastásicos suelen ser tratados mediante cirugía seguida de radioterapia o quimioterapia (Kauvar et al. 2015). Sin embargo, la respuesta a este tipo de tratamientos es limitada (L. V Nguyen et al. 2012). Por lo tanto, es importante conocer los mecanismos que controlan el crecimiento agresivo y la capacidad de diseminación de los SCC avanzados, así como los factores que promueven la progresión tumoral, con el fin de identificar posibles dianas terapéuticas que permitan el diseño de tratamientos más efectivos para este tipo de tumores.

Estudios realizados en modelos de ratón han demostrado que la generación y el desarrollo de SCCs de piel sigue un proceso secuencial, el cual se puede dividir en tres estadios: (i) la etapa de iniciación, (ii) la etapa de promoción y (iii) la etapa de progresión. Como consecuencia de alteraciones genéticas y epigenéticas, las células basales del epitelio empiezan a hiperproliferar, generando lesiones pre-neoplásicas como displasias. Mutaciones en genes como Ras o p53 (Cherpelis, Marcusen, and Lang 2002), entre otros, promueven la formación de carcinomas *in situ*, los cuales finalmente podrían progresar a carcinomas invasivos. La mayoría de los SCCs invasivos desarrollados en la piel humana y de ratón conservan características de diferenciación epitelial, donde las células se organizan en forma de nidos y producen un alto contenido de queratinas. Este tipo de tumores se clasifican como WD-SCCs. Sin embargo, un porcentaje de SCCs pierden estas características de diferenciación epitelial, y en ocasiones pueden alcanzar un estadio fusocelular sarcomatoide, siendo clasificados como pobremente diferenciados (PD/S-SCCs). Estos últimos tumores son los que presentan mayor frecuencia de recurrencias y capacidad metastásica (Franco et al. 2013).

3.2 Origen celular del carcinoma de célula escamosa de piel

En los últimos años, los modelos de ratón de Cre inducible han permitido identificar el origen celular de algunos tumores sólidos, como carcinomas de piel, tumores de cerebro, intestino, pulmón, próstata y mama (Visvader 2011; Blanpain 2013). Concretamente, en el caso de los SCCs de piel, la utilización de los ratones K14-Cre, K19-Cre y K15-Cre, que permiten inducir la expresión de una forma mutada de KRas (KRas^{G12D}) y la supresión de la función de p53 en los queratinocitos de la IFE (K14-Cre) y en las SCs del bulge (K19-Cre y K15Cre) y su progenie inmediata, permitió demostrar que estos eventos genéticos promueven la generación de SCCs a partir de las SCs de la IFE y de las SCs de los folículos pilosos, respectivamente (Lapouge et al. 2011; White et al. 2011). Por lo tanto, estos estudios demostraron que estas poblaciones de SCs mutadas eran el origen de los SCCs de piel de ratón.

En paralelo, en nuestro laboratorio utilizamos los ratones K14-HPV16, que expresan las proteínas E6 y E7 del papilomavirus humano 16 en los queratinocitos basales de la piel (Coussens et al. 1996), incluyendo las SCs de la IFE y del folículo. Estos ratones se cruzaron con los ratones Lgr5Cre^{ER}/Rosa26^{LSL}LacZ, que permiten trazar las SCs del bulge que expresan LGR5 (LGR5⁺-SCs) y su progenie (Jaks et al. 2008). El 30% de los ratones K14-HPV16/ Lgr5Cre^{ER}/Rosa26^{LSL}LacZ desarrollaron espontáneamente SCCs de piel un año después del nacimiento. El análisis de la piel y de los tumores generados de forma espontánea o inducidos tras el tratamiento con carcinógenos en estos ratones demostró que la expresión de E6 y E7 induce la proliferación de las LGR5⁺-SCs y CD34⁺-SCs del bulge y una expansión de la progenie de las LGR5⁺-SCs, la cual se acumula en los folículos y se moviliza a la IFE, donde en esta nueva localización contribuye al desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y de SCCs (da Silva-Diz et al. 2012).

4. CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER

En los años 90, Dick y colaboradores aislaron por primera vez una población de células tumorales de leucemia mieloide aguda, utilizando marcadores de superficie que permitían identificar células madre hematopoyéticas (CD34⁺/CD38⁻). A diferencia del resto de células tumorales, esta población de células CD34⁺ tenían la capacidad de regenerar un tumor con características similares al tumor de origen, cuando eran inyectadas en ratones inmunodeficientes, demostrando que tenían capacidad iniciadora de tumores (Bonnet & Dick 1997).

Estudios posteriores, realizados en diferentes tipos de tumores sólidos demostraron que el crecimiento tumoral es mantenido por una población de células indiferenciadas que presentan características similares a las de las SCs adultas. Así, presentan capacidad de auto-renovación y diferenciación y son responsables de propagación del tumor (Visvader 2011). Estas propiedades concretas llevaron a denominar a esta población de células, células madre tumorales o *cancer stem cells* (CSCs) (Visvader 2011).

Las CSCs son además más resistentes a la radioterapia y quimioterapia que el resto de células tumorales y actualmente se considera que serían responsables de las recidivas observadas en algunos tumores tras los tratamientos (Nassar & Blanpain 2016). Por otra parte, el hecho de que las lesiones metastásicas se produzcan a partir de una población de células tumorales con gran capacidad para diseminar, iniciar el crecimiento tumoral y con plasticidad para adaptarse a nuevos microambientes en tejidos distantes, indica que las CSCs serían responsables, no solo de la iniciación del tumor y su crecimiento a largo plazo, sino también de la generación de metástasis (L. V Nguyen et al. 2012; Wang et al. 2013) (ver sección 5).

4.1. Heterogeneidad tumoral y el modelo de las células madre del cáncer

La heterogeneidad celular en los tumores fue observada y descrita por los patólogos hace más de un siglo (Heppner 1984). Así, el análisis de la mayoría de los tumores indica la existencia de una heterogeneidad histológica intratumoral, donde pueden coexistir células proliferativas indiferenciadas y células diferenciadas que presentan una expresión heterogénea de diferentes marcadores. Además, el análisis de muestras de diferentes pacientes de un mismo tipo de cáncer indica que existe una gran heterogeneidad entre ellas, la cual se conoce como heterogeneidad intertumoral (Almendo et al. 2012; De Sousa E Melo et al. 2013). Actualmente, se considera que la heterogeneidad intratumoral podría ser responsable de la progresión del tumor, el desarrollo de metástasis y la resistencia a la quimioterapia (Almendo et al. 2012; De Sousa E Melo et al. 2013).

El modelo estocástico postula que todas las células tumorales son equipotentes y pueden auto-renovarse o dar lugar a células no proliferativas y diferenciadas de una manera aleatoria. La heterogeneidad morfológica y funcional que se observa en un tumor es debida a eventos estocásticos, donde las combinaciones de mutaciones, su deriva génica y la supervivencia de determinados clones bajo una presión selectiva, podrían seleccionar las células más agresivas y con mayor capacidad de crecimiento, que serían las que dirigirían finalmente la progresión tumoral (Visvader & Lindeman 2008).

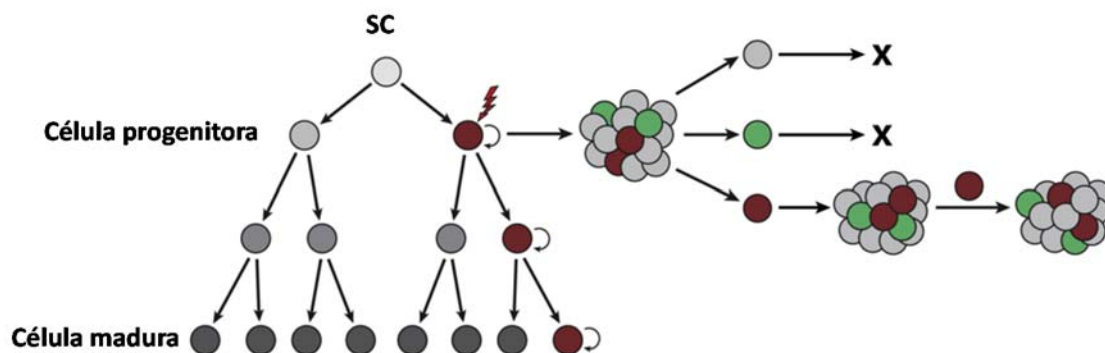


Figura 5. Modelo jerárquico o de las células madre del cáncer. Mutaciones en una célula progenitora (representada en marrón) puede dotar a la célula tumoral de propiedades similares a las SCs. Estas células tienen capacidad de auto-renovación y de dar lugar a un rango de células tumorales más diferenciadas cuando son inyectadas en ratones inmunodeficientes (representadas en gris y verde), dando lugar a la heterogeneidad tumoral. Adaptado de Visvader and Lindeman 2012.

Más recientemente, se ha confirmado la existencia de CSCs en diferentes tipos de tumores sólidos primarios, incluyendo los carcinoma escamosos de piel, mediante ensayos de trazado de linaje (Driessens et al. 2012). Estos experimentos han demostrado que las SCs adultas que sufren mutaciones específicas son las células de origen de tumores de piel, colon y cerebro (Alcantara Llaguno et al. 2009; Lapouge et al. 2011; White et al. 2011; Schepers et al. 2012) y estas SCs mutadas pueden actuar como CSCs, promoviendo el crecimiento tumoral (Chen et al. 2012; Driessens et al. 2012; Schepers et al. 2012).

Debido al papel relevante que juegan las CSCs en el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis, es importante investigar qué mecanismos controlan su proliferación y supervivencia, con el fin de facilitar el diseño de terapias que eliminen esta población de células tumorales.

4.2. Identificación y caracterización de las CSCs en SCCs de piel

Malanchi y colaboradores, identificaron y aislaron por primera vez las CSCs de SCCs de piel de ratón utilizando la expresión de CD34, un marcador de SCs del bulge. Este grupo demostró que las células CD34⁺ aisladas de papilomas y WD-SCCs, inducidos mediante carcinogénesis química, mostraban un mayor potencial para generar tumores que el resto de células tumorales epiteliales. Estas células tumorales tenían la capacidad de auto-renovarse y diferenciarse, dando lugar a tumores con la misma organización jerárquica que los tumores parentales, después de la inyección en ratones inmunodeficientes (Malanchi et al. 2008). Estas CSCs se localizan preferentemente en la periferia del tumor y en los frentes de invasión de los SCCs, sugiriendo que las CSCs podrían estar respondiendo a señales procedentes del estroma circundante (Malanchi et al. 2008; Schober & Fuchs 2011; Beck et al. 2011). Además, se demostró que en SCCs de estadios tempranos, la señalización de β -catenina era esencial para mantener el fenotipo y la función de las CSCs. Así, la ablación de β -catenina en las células tumorales provocaba la pérdida de las CD34⁺-CSCs y la regresión completa del tumor (Malanchi et al. 2008).

En los últimos años, otros grupos han investigado qué mecanismos o vías controlan la auto-renovación y función de las CSCs de piel. La vía de TGF- β está frecuentemente desregulada en tumores humanos, actuando inicialmente como un supresor tumoral, pero promoviendo la metástasis en estadios tardíos de progresión (Massagué 2008). La delección del receptor II de TGF- β en las células epiteliales, acelera el desarrollo de SCCs de piel agresivos tras un tratamiento con el carcinógeno DMBA (Guasch et al. 2007). En este sentido, estudios realizados en el laboratorio de E. Fusch demostraron que los tumores agresivos y pobremente diferenciados que se desarrollaban en los ratones deficientes en T β RII, presentaban una importante expansión de la población de las células tumorales CD34⁺ (Schober & Fuchs 2011). De acuerdo con estos resultados, la sobreexpresión de KRas mutado y la pérdida de p53 en las SCs de la IFE o de los folículos, conducía al desarrollo de

PD-SCCs, los cuales mostraban una fuerte expansión de CD34⁺-CSCs comparados con los WD-SCCs. Estas observaciones indicaban que el crecimiento agresivo de estos tumores podría estar relacionado con una mayor auto-renovación y supervivencia de estas CSCs (Lapouge et al. 2012).

Por otro lado, estudios más recientes demostraron que la expresión de *Sox2*, ausente en la piel normal, se induce en un grupo de células basales al inicio del desarrollo de los SCCs. SOX2 es fundamental para promover la iniciación y el crecimiento tumoral (Boumahdi et al. 2014), y actualmente es considerado un marcador de CSCs en SCCs de piel en ratón y humanos (Boumahdi et al. 2014; Siegle et al. 2014).

Por último, estudios previos demostraron que la angiogénesis juega un papel importante promoviendo la iniciación y progresión de SCCs (Coussens et al. 1999). En este sentido, se ha demostrado que las CSCs de WD-SCCs producen VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), estimulando de forma paracrina la angiogénesis y por tanto el crecimiento tumoral, pero además, actúa de forma autocrina induciendo la auto-renovación de las CSCs y la expansión de esta población durante los estadios iniciales de la progresión tumoral (Beck et al. 2011).

5. PROGRAMA DE TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (EMT) Y PROGRESIÓN TUMORAL

El programa de transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso fundamental en embriogénesis y desarrollo, así como en la cicatrización de heridas. Sin embargo, en los últimos años se ha relacionado además con la progresión tumoral y la metástasis (Smit and Peeper 2010; Talbot, Bhattacharya, and Kuo 2012).

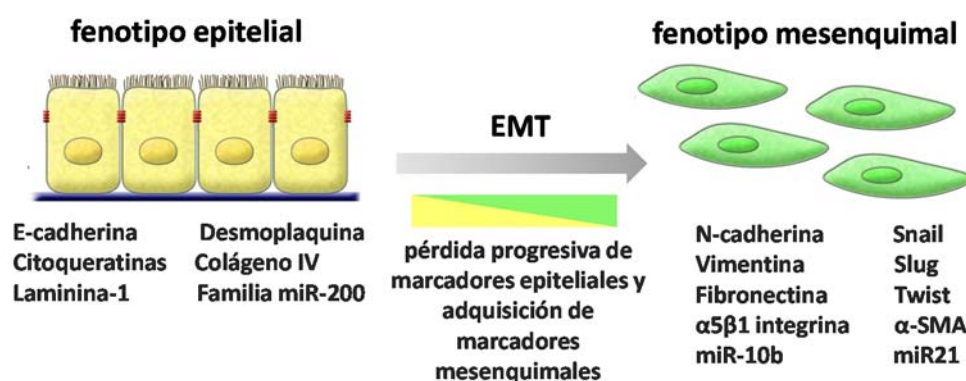


Figura 6. Cambios en la célula epitelial asociados al proceso de transición epitelio-mesénquima. El proceso de EMT implica una serie de cambios moleculares y funcionales que resultan en la conversión de una célula epitelial polarizada en una célula con características mesenquimales y con mayor capacidad de diseminación. En la figura se indican algunos de los marcadores epiteliales y mesenquimales que caracterizan cada fenotipo. Adaptado de Kalluri and Weinberg 2009b.

El programa de EMT es un proceso reversible (Savagner 2010), que permite que una célula epitelial adquiera un fenotipo de célula mesenquimal, caracterizado por una mayor capacidad migratoria e invasiva, así como por una mayor resistencia a la apoptosis (Kalluri and Weinberg 2009; Thiery et al. 2016). Durante este proceso, las células epiteliales pierden sus uniones célula-célula, mediadas por E-cadherina, así como por otras proteínas como claudinas y desmoplaquinas. Además, se produce una desregulación en la expresión de proteínas implicadas en el mantenimiento de la polaridad y la organización del citoesqueleto, induciéndose la expresión de fibronectina, vimentina y N-cadherina (Revisado en Du and Shim 2016). El potencial metastásico de los tumores se ha relacionado con la pérdida de marcadores epiteliales como E-cadherina, y la adquisición de marcadores mesenquimales, como Vimentina, N-cadherina y Fibronectina (Acloque et al. 2009). Estos procesos están mediados por la activación de distintos factores de transcripción, como SNAIL, ZEB1, ZEB2 y TWIST y por cambios en la expresión de determinados miRNAs (Peinado, Olmeda, and Cano 2007; Acloque et al. 2009) (Figura 6). Además, las células con el programa EMT activado producen una mayor cantidad de enzimas que degradan la matriz extracelular, facilitando así la migración e invasión de estas células (Nieto & Cano 2012).

Estudios previos demostraron que tras la diseminación, las células tumorales deben reversibilizar su estado mesenquimal para facilitar la colonización y la generación de la lesión metastásica en el órgano distante (Celià-Terrassa et al. 2012; Ocaña Oscar et al. 2012; Tsai Jeff et al. 2012; Stankic et al. 2013). Así, las células pierden marcadores mesenquimales y vuelven a adquirir marcadores epiteliales, como la expresión de E-cadherina, mediante un proceso conocido como transición mesénquima-epitelio (MET) (Steinestel et al. 2014).

5.1. Relación entre el programa de EMT y la adquisición de características CSCs

Varios estudios sugieren que existe una relación directa entre la inducción del programa de EMT y la adquisición de las características de las CSCs, y viceversa. Por una parte, se demostró que la expresión de los factores SNAIL, SLUG o TWIST en células epiteliales induce EMT, así como algunas características de SCs (Mani et al. 2008), como la expresión de marcadores específicos o la resistencia a la quimioterapia y radioterapia (Kurrey et al. 2009). Además, la caracterización de las CSCs de tumores de mama mostró que, a diferencia del resto de células tumorales, estas células presentaban inducido el programa de EMT (Mani et al. 2008). En este sentido, TWIST1 activa la expresión de BMI1, y ambas proteínas actúan de forma conjunta promoviendo auto-renovación, *stemness* y EMT (M.-H. Yang et al. 2010). Además, ZEB1 induce características de SCs a través de la inhibición de microRNAs, como la familia de miRNA200, que a su vez inhiben este proceso (Wellner et al. 2009). Finalmente, se ha descrito que diferentes vías de señalización relacionadas con *stemness*, como la vía de WNT, también están implicadas en la inducción del programa EMT (Sánchez-Tilló et al. 2011).

Sin embargo, estudios recientes demuestran que el programa EMT y la adquisición del fenotipo SC son procesos independientes (Sarrío et al. 2012; Celià-Terrassa et al. 2012). Así, TWIST1 ejerce diferentes funciones durante la tumorigénesis en piel, induciendo stemness en las CSCs y el programa EMT de forma dosis dependiente, sugiriendo que ambos procesos no están necesariamente vinculados funcionalmente (Beck et al. 2015).

5.2. Vías de señalización reguladoras del programa de EMT y de la progresión tumoral

En los últimos años, se han descrito diferentes vías de señalización que inducen el programa de EMT (Thiery & Sleeman 2006) (Figura 7).

La vía de señalización de TGF β es una de las vías inductoras de EMT más caracterizada (Padua & Massague 2009). Esta vía se activa tras la unión de los ligandos de la superfamilia TGF β , entre los que se incluyen las proteínas morfogénicas (BMPs), a sus receptores, desencadenando una señalización que puede ser dependiente o independiente de SMAD. En el primer caso, la unión de TGF- β a sus receptores activa a SMAD2 y SMAD3 formando un complejo con SMAD4, el cual transloca al núcleo y promueve la expresión de factores de transcripción inductores de EMT (Kaimori et al. 2007). Sin embargo, TGF β puede inducir EMT a través de las vías de GTPasas, PI3K and MAPK, independientemente de SMADs (Moustakas & Heldin 2005).

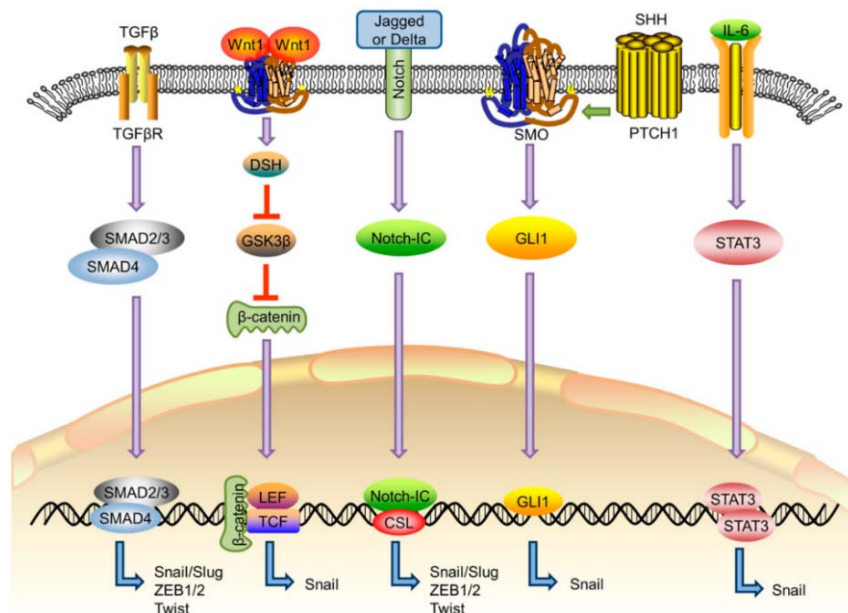


Figura 7. Vías de señalización que promueven la transición epitelio-mesénquima (EMT). En la figura se resume el papel de alguna de las vías de señalización identificadas como activadoras del programa de EMT, mediante la inducción de la expresión de los factores de transcripción que regulan este proceso. Adaptado de Du and Shim 2016.

Además, la unión de WNT con su receptor induce la acumulación de β -catenina en el citoplasma y su entrada al núcleo, donde induce la expresión de *Snail* (Du and Shim 2016). Esta vía de señalización puede estar desregulada en numerosos tipos de cáncer, contribuyendo a la expansión y el mantenimiento de las CSCs (Clevers 2006). La activación de la vía Notch, Sonic Hedgehog (SHH) y de la Interleuquina-6 (IL-6) también puede inducir la expresión de *Snail*, así como de otros factores inductores de EMT (Du and Shim 2016) (Figura 7).

Por otra parte, se ha descrito que las vías de señalización mediadas por factores de crecimiento tales como EGF (factor de crecimiento epidérmico), FGF (factor de crecimiento fibroblástico) y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), activan la expresión de factores de transcripción inductores de EMT (SNAIL, SLUG, ZEB1 y TWIST) en diferentes tipos de células tumorales (Thiery 2002). Estas vías de señalización se describen con más detalle a continuación.

5.2.1. Vía de señalización mediada por EGF

5.2.1.1. EGFR, ligandos y vías de transducción de señales

EGFR pertenece a la familia de los receptores tirosina quinasa (RTK) ErbB. Esta familia de proteínas incluye cuatro tipo de receptores: EGFR (también llamado ErbB-1/HER1), ErbB-2 (neu, HER2), ErbB-3 (HER3) y ErbB-4 (HER 4) (Yarden 2001; Ferguson et al. 2003). Estos receptores presentan un dominio extracelular de unión al ligando y un dominio citoplasmático con actividad tirosina-quinasa (Olayioye et al. 2000) que está altamente conservado (Guy et al. 1994). En cambio, los dominios extracelulares de estos cuatro receptores presentan una mayor divergencia, lo que confiere una especificidad distinta de unión al ligando (Olayioye et al. 2000; Yarden 2001; Yarden and Sliwkowski 2001). La activación de los receptores ErbB se puede producir de manera autocrina, cuando el receptor y el ligando son sintetizados por la misma célula, o de forma paracrina si los ligandos son sintetizados por células vecinas (Olayioye et al. 2000; Yarden and Sliwkowski 2001).

Los ligandos de esta familia de receptores se dividen en tres grupos, en base a su afinidad por el receptor (Yarden and Sliwkowski 2001; N. Normanno et al. 2003). El primer grupo incluye EGF, TGF- α (*transforming growth factor alpha*) y Anfirregulina, los cuales se unen específicamente a EGFR. En el segundo grupo se incluyen Betacelulina, HB-EGF y Epirregulina que presentan una especificidad dual de unión a EGFR y ErbB-4. El tercer grupo está compuesto por las Neuregulinas (NRGs), las cuales a su vez pueden subdividirse en dos subgrupos, las que se unen a ErbB-3 y ErbB-4 (NRG-1 y NRG-2) y las que sólo se unen a ErbB-4 (NRG-3 y NRG-4) (Carraway III et al. 1997; H. Chang et al. 1997; D. Zhang et al. 1997). ErbB-2 no se une a ningún ligando, pero dimeriza con otros miembros de la familia ErbB participando en su activación, por lo que se ha propuesto que esta proteína actúa como un co-receptor (Nicola Normanno et al. 2006)

La unión de los ligandos a los receptores ErbB induce la formación de homo o heterodímeros (Nicola Normanno et al. 2006) y la activación de la quinasa del receptor, la cual induce la auto-fosforilación de residuos de tirosina, que sirven como lugar de unión de proteínas adaptadoras y transductoras de señal. Estas proteínas poseen dominios específicos, llamados SH2 (*Src Homology 2*) y PTB (*phosphotyrosine-binding domain*). Entre ellas, se encuentran las proteínas Src (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*), Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) y SOS1/SOS2 (*Son of sevenless 1/2*).

La activación de la tirosina quinasa del receptor es clave para iniciar la cascada de transducción de señales intracelulares (Olayioye et al. 2000; Stern 2000) que finalmente regulan la proliferación, apoptosis, invasión, angiogénesis y metástasis (S. S. Chang and Califano 2008; Sahu and Grandis 2011). Las dos vías principales son las mediadas por Ras-Raf-MAPK, que inducen la proliferación celular, y la ruta PI3K-PTEN-AKT que controla la motilidad y la supervivencia celular (Seshacharyulu et al. 2013). Otras vías importantes en la señalización de ErbB son las mediadas por las proteínas STATs que promueve proliferación, angiogénesis, migración, supervivencia y adhesión celular (Yu & Jove 2004).

La actividad de EGFR es necesaria para el correcto desarrollo de los tejidos y para su homeostasis. En la epidermis de ratón, la expresión de EGFR y ErbB2 es elevada en las células de la capa basal y disminuye en las células diferenciadas de las capas suprabasales, donde el principal receptor expresado es ErbB3. La deficiencia de EGFR tiene como consecuencia defectos en la proliferación y diferenciación celular, disminuye la capacidad de cicatrización de heridas e induce alteraciones funcionales y estructurales en los folículos pilosos. La desregulación de esta vía se ha asociado además con el desarrollo de lesiones similares a la psoriasis y tumorigénesis (Schneider et al. 2008).

5.2.1.2. Implicación de la vía de EGFR en cáncer

Numerosos estudios han demostrado el impacto de la activación aberrante de estos receptores, así como de alteraciones en la expresión de los receptores y ligandos, en el desarrollo de diferentes tumores sólidos en humanos, entre los que se incluyen cáncer de mama, cerebro, próstata, estómago, pulmón, esófago o carcinoma de cabeza y cuello (Seshacharyulu et al. 2012). Estas alteraciones, producidas por mutaciones o amplificaciones de los genes que codifican para los diferentes receptores o ligandos (Tabla 1), se han asociado con formas agresivas de diferentes tipos tumorales y una reducida supervivencia de los pacientes (Carlos L. Arteaga & Engelman 2014).

MOLÉCULA	TIPO DE ALTERACIÓN	TIPO DE CÁNCER
EGFR	Mutación, inserción	Adenocarcinoma de célula escamosa de pulmón
EGFR	vIII	Glioma
EGFR	Amplificación	Adenocarcinoma de célula escamosa de pulmón Cabeza y cuello Glioma Esófago Colorrectal
HER2	Amplificación	Mama Gástrico Esófago
HER2	Mutación	Mama (lobular) Pulmón Vejiga Endometrio Gástrico
HER3	Mutación	Mama Gástrico
HER4	Mutación	Melanoma Adenocarcinoma de célula escamosa de pulmón Meduloblastoma
TGF α	Sobreexpresión	Próstata Pulmón Páncreas Ovario Colon Cabeza y cuello
Neuregulina-1	Sobreexpresión	Colorrectal Cabeza y cuello

Tabla 1. Alteraciones genéticas de los receptores ErbB y ligandos en tumores sólidos humanos. Adaptada de Arteaga and Engelman 2014.

En este sentido, la expresión de EGFR en tumores correlaciona con un mal pronóstico y un mayor riesgo de recurrencia. En estadios avanzados, se asocia con un elevado riesgo de metástasis (Scaltriti & Baselga 2006). En la epidermis de ratón, la sobreexpresión de TGF- α promueve la formación de hiperplasias, papilomas y SCCs, tras la administración de DMBA (Schneider et al. 2008).

5.2.2. Vía de señalización mediada por FGF

5.2.2.1. FGFR, ligandos y vías de transducción de señales

La vía de FGFR está implicada en el control de diferentes procesos biológicos, regulando la proliferación, la supervivencia, la migración y la diferenciación celular (Turner and Grose 2010). Además, esta vía de señalización desempeña un papel clave en la proliferación y la supervivencia de las células tumorales.

La familia de receptores de FGF está formada por FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4. Además, se han descrito 18 ligandos (FGF1-FGF10 y FGF16-FGF23) que se agrupan en 6 subfamilias. Cada receptor contiene un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad tirosina quinasa. La región extracelular contiene tres dominios similares a los presentes en las inmunoglobulinas, los dominios IgI, IgII e IgIII. Los dominios IgII y la IgIII constituyen el sitio de unión al ligando (Haugsten et al. 2010). El dominio IgIII de los receptores FGFR1-3 puede

sufrir *splicing* alternativo, creándose las isoformas IIIb y IIIc, que presentan diferente especificidad de sustrato. Las isoformas IIIb se expresan predominantemente en células epiteliales, mientras que las isoformas IIIc se asocian principalmente a células mesenquimales (Wesche et al. 2011).

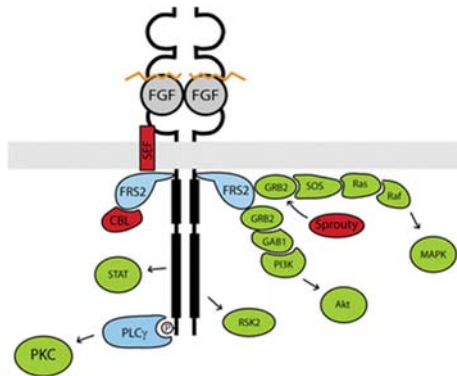


Figura 8. Vías de señalización intracelulares dependientes de FGFR. Después de la activación de FGFR inducida por el ligando, se activan varias cascadas de señalización. FRS2 activa las vías Ras/MAPK y PI3K/Akt. PLCγ produce la activación de PKC. Se indican algunos reguladores negativos (en rojo) asociados con la señalización de FGFR. Adaptado de (Wesche et al. 2011).

La unión de los ligandos a los FGFRs conduce a la dimerización del receptor y a la transfosforilación de tirosinas en la región de activación del dominio quinasa. Una vez el receptor está activado, fosforila a sustratos intracelulares, principalmente a FRS2 (*fibroblast growth factor receptor substrate 2*) y a la PLC (*phospholipase C*). FRS2 promueve la activación de vías de señalización involucradas en el crecimiento y la supervivencia celular, como son la vía de las MAPK y PI3K-AKT. Por otro lado, PLCγ hidroliza PIP2 (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) para producir DAG (*D-1,2-Diacilglicerol*) e IP3 (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) que desencadena la liberación de calcio y la subsiguiente activación de PKC (*protein kinase C*) (Wesche et al. 2011).

En la piel de ratón, los queratinocitos expresan principalmente las isoformas IIIb de los receptores FGFR1 y FGFR2, mientras que las células de la dermis expresan las isoformas IIIc del FGFR1 (Wesche et al. 2011).

5.2.2.2. Alteraciones de la vía de FGFR en cáncer

La desregulación de la actividad FGF/FGFR ha sido descrita en muchos tumores sólidos, así como en neoplasias hematológicas malignas (Tabla 2). La activación aberrante de la señalización de FGFR puede producirse como consecuencia de la inducción de la expresión de ligandos o por la hiperactivación de los receptores, debido a mutaciones, translocaciones cromosómicas o a la amplificación de estos genes (Dienstmann et al. 2014).

Además, se puede inducir la señalización aberrante de esta vía mediante la producción autocrina del ligando por la célula tumoral, o por un aumento de la secreción de los ligandos por las células del estroma (Hallinan et al. 2016).

GEN	TIPO DE ALTERACIÓN	TUMOR	PREVALENCIA (%)
FGFR1	Amplificación	Mama (receptor hormonal positivo)	10
		Pulmón (SCC)	10-20
		Pulmón (de células pequeñas)	6
		Cabeza y cuello (SCC)	10-17
		Esófago (SCC)	9
		Ovario	5
FGFR2	Amplificación	Mama (triple negativo)	4
		Gástrico	5-10
	Mutación	Endometrio	12
FGFR3	Mutación	Vejiga (no invasivo)	50-60
	Translocación	Vejiga (invasivo)	6
		Glioblastoma	3-7
FGFR4	Amplificación	Colorectal	5
	Mutación	Rabdomiosarcoma	8

Tabla 2. Alteraciones genéticas de los FGFRs en tumores sólidos humanos. Adaptada de Dienstmann et al. 2014

Varios estudios demuestran la importancia de la desregulación de la vía FGFR en la homeostasis de la piel y el desarrollo de tumores. Así, los ratones deficientes en FGFR2 presentan deficiencias en el desarrollo de la epidermis y en la morfogénesis de folículos (Petiot 2003). La ablación de FGFR2-IIIb en la epidermis da lugar a la atrofia de glándulas sebáceas, así como a un engrosamiento de la epidermis, displasia y acantosis, presentando estos ratones una mayor incidencia de SCCs tras tratamientos con DMBA-TPA (Turner & Grose 2010).

Finalmente, se ha descrito una asociación entre la activación de la vía de FGFR y EMT. Así, la activación de FGFR1 en el epitelio de la próstata induce el desarrollo de adenocarcinomas en ratón, y este proceso está asociado a la inducción de EMT y el desarrollo de metástasis (Acevedo et al. 2007). De forma similar, la inducción de la vía de FGFR induce *in vitro* EMT en células epiteliales mamarias y en células del epitelio renal (Strutz et al. 2002; Xian et al. 2005) y favorece significativamente la inducción de EMT mediada por TGF- β , jugando este proceso un papel crítico en crecimiento tumoral y la metástasis (Wendt et al. 2014).

5.2.3. Vía de señalización mediada por PDGF

5.2.3.1. PDGFR, ligandos y vías de transducción de señales

La vía de señalización dependiente de PDGF juega un papel esencial en diversos procesos fisiológicos, y alteraciones en esta vía se han asociado a determinadas patologías, como angioplastia, aterosclerosis, glomerulonefritis y cáncer (Hombach et al. 1995; Ostendorf 2003; Ricci & Ferri 2015; Appiah-Kubi et al. 2016).

La familia de ligandos de PDGFR se sintetizan como formas monoméricas inactivas, las cuales se unen mediante puentes disulfuro para formar cinco formas activas, cuatro homodiméricas (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD) y una heterodimérica (PDGF-AB) (Appiah-Kubi et al. 2016). Estos ligandos ejercen sus efectos a través de su unión a los receptores tirosina quinasa PDGFR α y PDGFR β . La estructura de los PDGFRs comprende un dominio extracelular, un dominio transmembrana, el cual tiene un segmento juxtamembrana, y un dominio tirosina quinasa citoplasmático (P.-H. Chen, et al. 2013). Estos receptores pueden ser homodiméricos PDGFR $\alpha\alpha$ o PDGFR $\beta\beta$, o heterodiméricos PDGFR $\alpha\beta$ (P.-H. Chen, et al. 2013). El homodímero PDGFR $\alpha\alpha$ se une a todos los ligandos, excepto PDGF-DD. PDGFR $\beta\beta$ se une a PDGF-BB y PDGF-DD, mientras que PDGFR $\alpha\beta$ se une a todos los dímeros excepto a PDGF-AA (Cao 2013) (Figura 9).

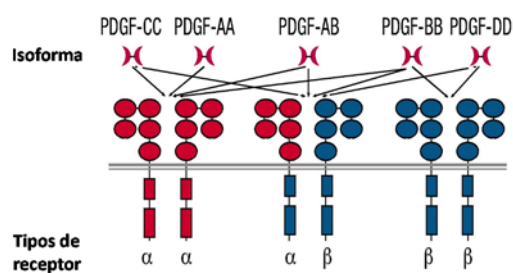


Figura 9. Ligandos de la familia de PDGF y receptores.
Adaptado de (Pietras et al. 2013).

La unión de los ligandos a los PDGFRs induce la dimerización de estos receptores y la autofosforilación de los residuos tirosina del dominio intracelular, creando sitios de unión para moléculas que transducen las señales, como las que contienen dominios SH2 (Heldin & Westermark 1999; Andrae et al. 2008a). PDGF induce principalmente las vías Ras/MAPK, PI3-K, PLC γ y PKC (Andrae et al. 2008b), promoviendo la proliferación, la supervivencia y la capacidad de migración de las células tumorales. Además, esta vía de señalización induce la remodelación vascular y la angiogénesis, favoreciendo el desarrollo de metástasis (Cao 2013).

En la piel del ratón, algunos de estos ligandos son expresados por los queratinocitos, mientras que sus receptores se expresan en células mesenquimales y fibroblastos de la dermis (Akiyama et al. 1996; Pontén et al. 1994). PDGF-A, PDGF-C y PDGFR α juegan un papel importante en el desarrollo de la dermis de ratón (Betsholtz 2004). Los ratones deficientes en PDGFR α desarrollan hipoplasia dérmica grave y ampollas cutáneas (Soriano 1997), mientras que la deficiencia en PDGF-C induce un fenotipo similar, pero menos agresivo (Ding et al. 2004). Por otra parte, los ratones deficientes en PDGF-A muestran una reducción del tamaño de la dermis y alteraciones en el desarrollo de los folículos y formación del pelo (Karlsson et al. 1999). Por el contrario, la inyección de PDGF-AA o PDGF-BB en la dermis de ratones normales, promueve la entrada en anagen de los folículos en reposo, induciendo la renovación del pelo (Tomita et al. 2006). En este sentido, PDGF-AA activa la

renovación de las células mesenquimales PDGFR α ⁺, que serían reclutadas para formar la papila dermal durante el desarrollo de los folículos (Karlsson et al. 1999).

5.2.3.2. Alteraciones de la vía de PDGFR en cáncer

La expresión de algunos ligandos y de los PDGFRs está desregulada en varios tipos de tumores. Estas alteraciones contribuyen al desarrollo y crecimiento de distintos tipos de tumores, como sarcomas y gliomas (Demoulin and Essaghiri 2014). La expresión de estas proteínas correlaciona significativamente con un mal pronóstico en cáncer. Por esta razón, la expresión de ligandos y/o receptores se utiliza como marcadores de pronóstico (Appiah-Kubi et al. 2016).

La desregulación de esta vía puede producirse por alteraciones genéticas, como mutaciones puntuales que inducen la actividad de los receptores, o amplificaciones o translocaciones que conducen a una sobreexpresión de los receptores o ligandos, desencadenando la activación de los PDGFRs (Cao 2013). Así, se han descrito translocaciones cromosómicas de los genes *PDGFRA* y *PDGFRB* en algunos tipos de leucemias (Toffalini & Demoulin 2010), amplificaciones de *PDGFRA* en oligodendrogliomas, glioblastomas (Smith et al. 2000) y carcinoma escamoso de esófago (Arai et al. 2003), y deleciones de *PDGFRA* en glioblastomas (Clarke and Dirks, 2003).

La activación autocrina o paracrina de esta vía induce el programa EMT en cáncer de mama, próstata, páncreas y mesoteliomas (Kong et al. 2008; Patel et al. 2010; Wang et al. 2010). Por otra parte, la activación del programa EMT induce la expresión de PDGFR, de forma que los tumores epiteliales que inicialmente no responden a PDGF, pueden llegar a ser sensibles a estos ligandos (Jechlinger 2006; Tam et al. 2013). Además, como resultado de la activación de EMT, se induce la expresión de ligandos que pueden activar PDGFR en estas células de forma autocrina (Fischer et al. 2007).

5.2.3.3. La vía de PDGFR y el microambiente tumoral

Diferentes estudios han descrito la influencia de las células del microambiente en el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. En este sentido, los fibroblastos del estroma tumoral (CAF) expresan PDGFR, y la activación de este receptor aumenta la supervivencia de estas células (Paulsson & Mücke 2014). El PDGF producido tanto por células tumorales como por las células del estroma (como células endoteliales y macrófagos), puede inducir la remodelación del microambiente tumoral en tumores sólidos (C.-H. Heldin 2013). La expresión ectópica de PDGF-BB y PDGF-CC en células tumorales, promueve el reclutamiento de CAF, fomentando el crecimiento del melanoma y de tumores de próstata, así como la generación de metástasis hepática a partir de tumores colorrectales (Forsberg et al. 1993; Skobe & Fusenig 1998; Cheng et al. 2013). Otros estudios han demostrado que la expresión transgénica de PDGF-CC en las células de hígado de ratón induce fibrosis y promueve el desarrollo de carcinoma hepatocelular (Campbell et al. 2005), y que la expresión ectópica de PDGF-

DD promueve la tumorigénesis y angiogénesis en melanoma (Furuhashi et al. 2004). Finalmente, se ha demostrado la asociación entre altos niveles de expresión de PDGFR en las células del estroma y un mal pronóstico en cáncer de mama, próstata, colorrectal y páncreas (revisado en C.-H. Heldin 2013).

6. EL MICROAMBIENTE TUMORAL

La primera relación que se estableció entre células del microambiente y tumorigénesis, fue propuesta por Rudolf Virchow en 1863, tras observar leucocitos en los tejidos neoplásicos (Balkwill & Mantovani 2001). Desde entonces, múltiples estudios se han centrado en el papel del microambiente tumoral en tumorigénesis, progresión tumoral y metástasis (Joyce & Pollard 2009).

6.1. Componentes del microambiente tumoral

El microambiente tumoral contiene diferentes tipos celulares, como fibroblastos del tejido donde se desarrolla el tumor, células endoteliales que forman los vasos sanguíneos, células infiltrantes del sistema inmune (macrófagos y linfocitos principalmente) y células madre mesenquimales que son reclutadas al tumor (Witz & Levy-Nissenbaum 2006; Whiteside 2008; Quail & Joyce 2013).

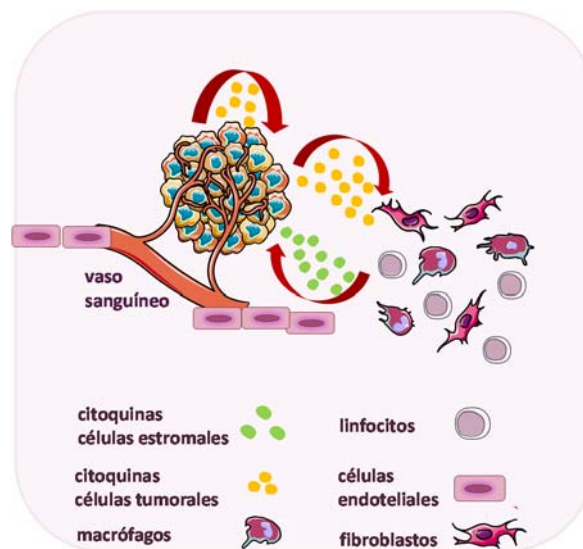


Figura 10. Microambiente tumoral. El microambiente tumoral está compuesto principalmente por fibroblastos, células endoteliales, células del infiltrado inmune, como macrófagos y linfocitos, y por los factores/citoquinas secretados por estas células. Las citoquinas producidas por las células del estroma pueden atraer y/o regular las células tumorales. Las citoquinas secretadas por las células tumorales pueden actuar de forma paracrina, atrayendo y reclutando células estromales al tumor primario, o regulando la función de las células estromales. Además, las citoquinas secretadas por las células tumorales pueden activar de forma autocrina sus respectivos receptores, regulando así su proliferación y/o diseminación. Adaptado de Fran Balkwill 2004.

Estas células secretan factores o citoquinas (Witz & Levy-Nissenbaum 2006) que permiten la comunicación con las células tumorales, promoviendo de forma paracrina su proliferación y/o diseminación. Es importante remarcar que las células tumorales también secretan citoquinas (Figura

10), que permiten remodelar el estroma tumoral durante la progresión mediante el reclutamiento de diferentes tipos celulares, así como regular la expresión de factores/citoquinas por las células del estroma, generándose complicados bucles de señalización entre las células tumorales y del estroma. Estos bucles de señalización activan señales intracelulares que, finalmente, promueven el crecimiento del tumor y la metástasis. Además, las citoquinas generadas por las células tumorales pueden activar de forma autocrina sus correspondientes receptores, regulando su proliferación y capacidad de diseminación e invasión (Figura 10). Por otra parte, la expresión de determinados receptores de citoquinas en las células tumorales, favorece la diseminación de estas células, siguiendo un gradiente que es generado desde los órganos donde se desarrollará la metástasis (Balkwill 2004a).

6.2. Citoquinas

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, sintetizadas por una gran variedad de tipos celulares. Son moléculas que permiten la comunicación entre células y cuyo modo de acción puede ser autocrino, paracrino o endocrino (Saavedra Ramírez et al. 2011.). Las citoquinas son moléculas con efectos pleiotrópicos, ya que una misma citoquina puede actuar sobre más de un tipo celular a través de la interacción con sus receptores. A su vez, cada célula puede expresar receptores para diferentes citoquinas (Nicola 1994).

Las citoquinas constituyen un conjunto heterogéneo de factores agrupados en diversas familias. Una de estas familias son las interleuquinas (IL). El término interleuquina fue aplicado inicialmente a un grupo de citoquinas sintetizadas por células del sistema de inmune, que participaban en la regulación de la respuesta inmune, tanto a nivel local como sistémico. Sin embargo, más tarde se demostró que muchos de estos factores también podían ser producidos por otros tejidos y estaban implicadas en la regulación de diversos procesos fisiológicos (Hunter & Jones 2015).

Los interferones (IFN- α , IFN- β , IFN- γ) y los factores de necrosis tumoral TNF- α y TNF- β forman dos familias diferentes de citoquinas. Los TNFs son importantes mediadores de las reacciones inflamatorias y juegan un importante papel en el desarrollo de varias enfermedades inflamatorias crónicas (Popa et al 2007). Por otra parte, los IFNs desempeñan un papel clave en la regulación de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Dunn et al 2006).

Otra familia de citoquinas es la formada por factores solubles reguladores de la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas, denominados "factores estimuladores de colonias" (CSF), entre los que se encuentran M-CSF (CSF-1) y GM-CSF. CSF-1 actúa regulando la supervivencia, proliferación y diferenciación de los monocitos-macrófagos y juega un importante papel en la respuesta inmune innata, así como en enfermedades inflamatorias (Chitu & Stanley 2006). Además, la sobreexpresión de CSF-1 promueve la progresión tumoral y la metástasis en cáncer de

mama (Lin et al 2001). Por otro lado, GM-CSF estimula la proliferación de granulocitos y macrófagos (Shi et al. 2006) y promueve la proliferación de los queratinocitos acelerando el proceso de curación de heridas (Hong 2016). En varios tipos de cáncer, como glioma, cáncer colorrectal o cáncer de pulmón, entre otros, GM-CSF promueve el crecimiento tumoral y la migración de células tumorales a través de la inducción de la expresión de MMPs (Tomita et al. 2000; Gutschalk et al. 2013; Hong 2016).

Dentro de las citoquinas, se incluyen la familia de los factores de crecimiento, los cuales están involucrados en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, así como en hematopoyesis, angiogénesis, migración y apoptosis (Sporn & Roberts 1986).

Por último, las quimioquinas son consideradas citoquinas quimiotácticas, dada su capacidad para inducir quimiotaxis en las células sensibles localizadas en las inmediaciones. Esta familia de citoquinas será descrita con más detalle en la sección 6.3.

6.2.1. Implicación de las citoquinas en cáncer

Se han descrito alteraciones en la expresión y secreción de determinadas citoquinas en múltiples tipos de tumores, donde actúan promoviendo el crecimiento tumoral, así como la invasión, la motilidad y la supervivencia de las células tumorales, favoreciendo el desarrollo de metástasis (Chow & Luster 2014). Estas moléculas pueden ser secretadas tanto por las células tumorales como por las células del estroma. En la Tabla 3 se muestra algunas de las alteraciones descritas en citoquinas (no quimioquinas) en diferentes tumores.

Citoquina	Alteración	Tipo de cáncer
MMIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos)	Niveles elevados	Pulmón, mama, colorrectal, melanoma maligno, pancreático, glioma maligno, hepatocelular, carcinoma de cabeza/cuello
IL-6	Niveles elevados	Pulmón, mama, colorrectal, gástrico, melanoma maligno, pancreático, hepatocelular, renal, carcinoma de cabeza/cuello, próstata, riñón, vejiga
IL-12	Niveles disminuidos	Colorrectal, gástrico, melanoma maligno, glioma maligno, hepatocelular, renal, carcinoma de cabeza/cuello
Interferón- γ	Niveles disminuidos	Pulmón, colorrectal, gástrico, melanoma maligno, glioma maligno, renal, carcinoma de cabeza/cuello
TGF- β	Niveles elevados	Pulmón, mama, colorrectal, gástrico, glioma maligno, hepatocelular, renal
IL-10	Niveles elevados	Pulmón, mama, colorrectal, gástrico, melanoma maligno, pancreático, glioma maligno, hepatocelular.
CNTF	Niveles elevados	Mieloma, linfoma, glioma, colorrectal, melanoma maligno, pancreático, hepatocelular, carcinoma de cabeza/cuello, ovario y testículo
CSF	Niveles elevados	Mama, colorrectal, endometrio, pancreático

Tabla 3. Principales citoquinas, no quimioquinas, alteradas en cáncer. Adaptado de Lippitz 2013.

La familia de la IL-6 es el grupo de citoquinas pro-tumorigénicas mejor caracterizado. Entre sus miembros se encuentran IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, el factor de inhibición de leucemia (LIF), OSM (*oncostatin M*), el factor neutrofílico ciliar (CNTF), cardiotrofina-1 (CT-1) y CLC (*cardiotrophin-like cytokine*). Todas ellas estimulan la inflamación, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia, así como la migración celular, la invasión y la angiogénesis, lo cual favorece el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis (Garbers et al. 2012). Diferentes estudios demostraron que los niveles de IL-6 y de sus receptores, IL-6R α y IL-6ST, están incrementados en varios tipos de tumores sólidos humanos (Taniguchi & Karin 2014) (Tabla 3).

6.3. Quimioquinas

Las quimioquinas son una familia de citoquinas de bajo peso molecular (6 a 14 kDa), que inicialmente fueron caracterizadas por su función quimioatrayente para diferentes poblaciones de leucocitos (Griffith et al. 2002). Las quimioquinas juegan un papel importante en la regulación del tráfico de células del sistema inmune en condiciones fisiológicas, así como en el desarrollo de resistencia a infecciones, enfermedades inflamatorias crónicas o cáncer (Allavena et al. 2011). Además, estos factores actúan sobre células no inmunes, regulando numerosos procesos, como la angiogénesis, el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis (Luster 1998; STRUYF et al. 2003; Vandercappellen et al. 2008).

La familia de las quimioquinas está formada por aproximadamente cincuenta ligandos, descritos en humanos y ratón (Griffith et al. 2014). Los miembros de esta familia de citoquinas se caracterizan por la presencia de dos o cuatro residuos de cisteína unidos por puentes disulfuro, los cuales son clave para su estructura tridimensional. Según la posición de las cisteínas en la región amino terminal, las quimioquinas se clasifican en 4 subgrupos: C, CC, CXC y CX3C (X representa cualquier aminoácido), siendo el ligando CX3CL1 el único miembro de este último grupo que posee además un dominio transmembrana (Saint et al. 2011; Allavena et al. 2011; de Munnik et al. 2015; Balkwill 2004a) (Figura 11).

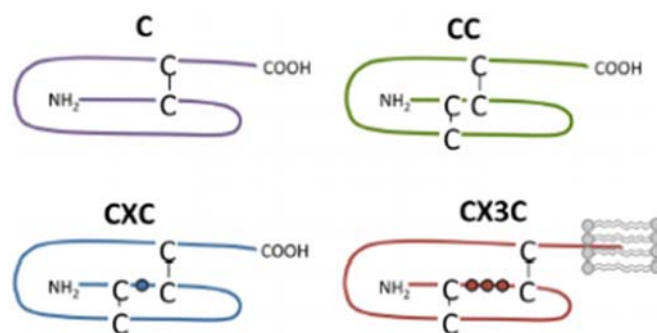


Figura 11. Familia de quimioquinas. Clasificación de las quimioquinas de acuerdo con el número y localización de residuos de cisteína en su región N-terminal. Adaptado de (de Munnik et al. 2015).

Se han identificado alrededor de 20 receptores de quimioquinas (Allen et al. 2007; Fran Balkwill, 2004a; Chow & Luster, 2014; de Munnik et al., 2015). Estos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas ($G\alpha\beta\gamma$) (GPCR: *G-protein coupled receptor*) que señalizan a través de $G_{\alpha i}$, por lo que su activación induce la movilización de calcio intracelular (Balkwill 2004a; Proudfoot 2002). Estos receptores se han clasificado en 3 familias: CCR, CXCR y CX3CR, en base a los ligandos que unen (Allen et al. 2007; Zlotnik & Yoshie 2012). Por otra parte, existe un grupo de receptores atípicos (D6, DARC, CCRL1 y CXCR7) que no señalizan vía $G_{\alpha i}$, y por lo tanto no producen movilización de calcio intracelular. Algunos estudios indican que este último grupo de receptores podrían regular los niveles de quimioquinas en los tejidos, actuando como receptores *scavenger* o *decoy* (Graham et al. 2012).

Una de las principales características de las quimioquinas y sus receptores es su comportamiento promiscuo. Así, una determinada quimioquina puede unirse a distintos receptores de una familia concreta, y distintos ligandos pueden unirse a un mismo receptor. Es importante remarcar que esta promiscuidad se produce manteniendo la especificidad dentro de la familia (Balkwill 2004a; Zlotnik & Yoshie 2012) (Tabla 4).

Familia	Receptor	Quimioquina
CC-	CCR1	CCL3, CCL4, CCL5, CCL6 CCL7, CCL9, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23
	CCR2	CCL2, CCL6, CCL7, CCL8, CCL12, CCL13
	CCR3	CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26, CCL28
	CCR4	CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL22
	CCR5	CCL3, CCL4, CCL5, CCL8
	CCR6	CCL20
	CCR7	CCL19, CCL21
	CCR8	CCL1, CCL4, CCL17
	CCR9	CCL25
	CCR10	CCL27, CCL28
CXC-	CXCR1	CXCL6, CXCL8
	CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8
	CXCR3	CXCL9, CXCL10, CXCL11
	CXCR4	CXCL12 (SDF-1)
	CXCR5	CXCL13
	CXCR6	CXCL16
	CXCR7	CXCL11, CXCL12 (SDF-1)
CX3C-	CX3CR1	CX3CL1

Tabla 4. Receptores de quimioquinas y sus ligandos. Adaptada de Allen, Crown, and Handel 2007.

Los receptores de quimioquinas se activan tras la unión sus ligandos, lo cual induce principalmente las vías JAK/STAT (Mitchell & John 2005; Brazil et al. 2004), PI3K y la vía de la fosfolipasa $C\beta$ ($PLC\beta$) (Park et al. 2012), las cuales promueven proliferación, supervivencia y diferenciación, así como la migración e invasión de células tumorales y la angiogénesis. Además, induce la activación de diversos miembros de la familia de las Rho-GTPasas (Mellado et al. 2001; Rossi & Zlotnik, 2000).

6.3.1. Implicación de las quimioquinas en cáncer

Se han descrito alteraciones en la expresión de quimioquinas y de sus receptores en mieloma múltiple o leucemia, y en numerosos tumores sólidos, como cáncer de mama, pulmón, próstata, ovario o colon (Richmond et al. 2009) (Tabla 5).

Tipo tumoral	Quimioquina/Receptor
Cáncer de mama	CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL10 CXCR4, CCR7, CXCR3
Melanoma	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL7, CXCL8, CCL2, CCL5 CXCR4, CCR7, CCR9, CCR10
Cáncer de pulmón	CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL12, CXCR4, CXCR7, CXCR3
Cáncer de próstata	CCL2, CCL5, CCL25, CXCL1, CXCL8, CXCL10, CX3CR CXCR2, CCR9, CX3CR1
Mieloma múltiple	CCL2, CCL3, CCL4, CXCL8, CXCL12, CXCR3, CXCR4, CCR1, CCR5, CCR6
Cáncer colorrectal	CCL1, CXCL1, CXCL10 CXCR3
Cáncer de ovario	CXCL12, CXCL1, CXCL8, CCL2 CCR2, CXCR4

Tabla 5. Alteraciones de quimioquinas y sus receptores en diferentes tipos de tumores. Adaptado de Richmond, et al. 2009.

Estas alteraciones pueden estar inducidas por la inactivación de genes supresores tumorales, como *Ctcf* (Nikolic et al. 2014), o por activación constitutiva de oncogenes, como el proto-oncogen *Ret* (Castellone et al. 2004), *Myc* (Yi et al. 2003) o *Ras* (O'Hayer et al. 2009). Por lo tanto, estos genes juegan un papel importante en la regulación de las quimioquinas durante la carcinogénesis (Sarvaiya et al. 2013).

Las quimioquinas desempeñan un papel crucial en la progresión tumoral ya que, además de regular la proliferación y supervivencia de las células tumorales, inducen el programa EMT y promueven la capacidad de migración e invasión de estas células, así como su evasión del sistema inmune (Sarvaiya et al. 2013).

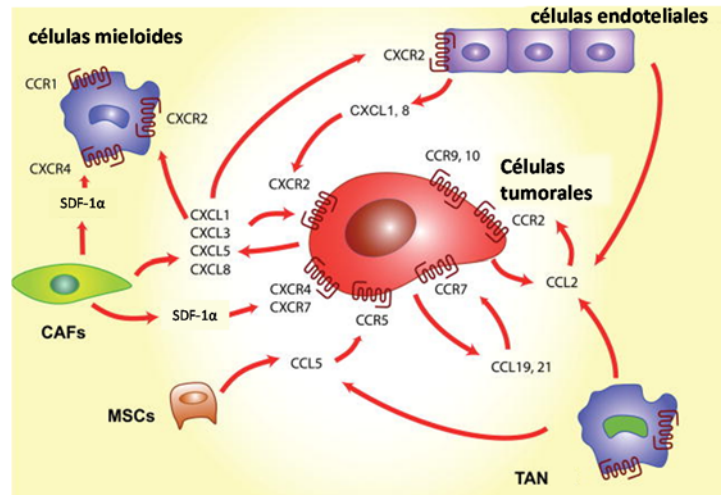


Figura 12. Quimioquinas y receptores expresados en células tumorales y células del estroma. CAFs (fibroblastos asociados a cáncer), MSCs (células madre mesenquimales), TAN (neutrófilos asociados a cáncer). Adaptado de Lazenec and Richmond 2010.

Las quimioquinas median la comunicación entre las células tumorales y las células que forman parte del estroma. Así, las células tumorales producen una gran variedad de quimioquinas que modulan no sólo sus propiedades, sino también las de las células estromales asociadas. Además, la expresión de receptores por parte de las células tumorales potencia la migración de estas células siguiendo un gradiente de quimioquinas, facilitando así el desarrollo de metástasis en órganos diana específicos (Richmond et al. 2009). Por otra parte, las células del microambiente secretan una serie de quimioquinas que pueden modular las características y actividad de las células tumorales (Figura 12) (Lazenec & Richmond 2010).

6.3.1.1. Quimioquinas y desarrollo de metástasis

Los primeros trabajos que permitieron relacionar la interacción quimioquina-receptor con el desarrollo de metástasis fueron los realizados por Muller y colaboradores (Muller et al. 2001). Estos autores observaron que el receptor CXCR4 se expresaba más abundantemente en las células de cáncer de mama que en las células epiteliales del tejido normal. Además, observaron que su ligando SDF-1 α (*stromal cell-derived factor-1*) se expresaba abundantemente en los tejidos diana donde estas células tumorales metastatizan preferentemente (ganglios linfáticos, médula ósea y pulmones). De acuerdo con estas observaciones, otros estudios demostraron que las células de cáncer de mama experimentaban una migración quimiotáctica hacia un gradiente de SDF-1 α *in vitro*. Cuando estas células tumorales eran inyectadas en ratones inmunodeficientes, el tratamiento con anticuerpos monoclonales que neutralizan la actividad de CXCR4, bloqueaba el desarrollo de metástasis en ganglios linfáticos y pulmones (Balkwill 2004b).

Otros estudios, realizados en distintos tipos de cáncer humano, han confirmado el papel de las quimioquinas en el desarrollo de metástasis. Así, (i) existe una correlación positiva entre los niveles

de expresión de CXCR4 en las células tumorales de próstata y agresividad tumoral, y la expresión de SDF-1 α es mayor en las lesiones metastásicas que en los tumores primarios (Sun et al. 2003); (ii) la expresión de CCR7 correlaciona con mal pronóstico y potencial metastásico, y su ligando CCL21 se expresa abundantemente en nódulos linfáticos; (iii) las células de melanoma humano expresan CCR10, que unen CCL27 y CCL28, quimioquinas que se expresan a altos niveles en la piel, donde se localizan una gran parte de las metástasis generadas en este tipo de cáncer (revisado en Fran Balkwill 2004b). Por lo tanto, dado que estas moléculas son solubles y difunden desde su lugar de síntesis y secreción, las quimioquinas pueden estimular la motilidad de las células tumorales y atraerlas a los sitios donde se generan las metástasis. Para que las quimioquinas actúen de forma local, deben ser inmovilizadas tras su secreción por algún componente del tejido. En este sentido, las quimioquinas tienen capacidad de unirse a los glicosaminoglicanos presentes en los proteoglicanos de la matriz extracelular, los cuales se localizan además en la superficie luminal de las células endoteliales. A través de la interacción con estas quimioquinas inmovilizadas, se induce la adhesión de leucocitos a las células endoteliales y su posterior extravasación hacia los tejidos. Se ha postulado que este mecanismo podría ser utilizado también por las células tumorales, facilitando así la extravasación de estas células y el desarrollo de metástasis (Balkwill 2004a).

6.3.2. La vía de señalización mediada por SDF-1 α

SDF-1 α es una quimioquina homeostática de la familia CXC que se expresa en una gran diversidad de tejidos. El gen de *SDF1* contiene cuatro exones y el *splicing* alternativo de su ARN mensajero puede dar lugar a varias isoformas (Shirozu et al. 1995). Inicialmente, se describieron en ratón y humano dos isoformas, SDF-1 α y SDF-1 β . Posteriormente, se han descrito en humanos las isoformas SDF-1 γ , SDF-1 δ , SDF-1 ϵ y SDF-1 φ , las cuales difieren de las isoformas α y β en el cuarto exón (Altenburg et al. 2007; Janowski 2009).

Durante el desarrollo embrionario, SDF-1 estimula la proliferación y diferenciación de células progenitoras inmaduras. En organismos adultos, juega un papel clave estimulando la supervivencia de células inmunes y regulando el tráfico de estas células (Juarez & Bendall 2004; Lataillade et al. 2004). Así, SDF-1 α es un factor de crecimiento para los progenitores de células B y un factor quimiotáctico, tanto para las células T como para los monocitos. Se expresa preferentemente en ganglios linfáticos, pulmón, hígado y médula ósea, aunque también se ha descrito su expresión en el intestino delgado, riñones (Bleul et al. 1996; Bleul et al. 1998; D'Apuzzo et al. 1997; Pablos et al. 1999) y en los fibroblastos de la dermis (Quan et al. 2015).

En tumores, esta quimioquina es sintetizada por las células del sistema inmune, las células tumorales y los fibroblastos del estroma, actuando como un potente quimioatrayente (Guo et al. 2016) y promoviendo el desarrollo de metástasis (Teicher & Fricker 2010). SDF-1 α se expresa

abundantemente en muchos tumores sólidos humanos, incluyendo cáncer de mama, páncreas, próstata, glioblastoma y SCC de piel donde, al igual que en condiciones fisiológicas, los fibroblastos del estroma son la principal fuente (Quan et al. 2015).

Durante mucho tiempo se consideró que CXCR4 era el único receptor de SDF-1 α , lo cual representaba una excepción en la familia de las quimioquinas. Actualmente, se sabe que SDF-1 α ejerce su acción mediante su unión con CXCR4 y con CXCR7 (Guo et al. 2016; Sun et al. 2010), el cual presenta diez veces mayor afinidad por SDF-1 α que CXCR4 (Würth et al. 2014).

6.3.2.1. Señalización SDF-1 α /CXCR4

En condiciones fisiológicas, CXCR4 es expresado por múltiples tipos celulares, como linfocitos, células madre hematopoyéticas, células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos (Guo et al. 2016). La expresión de CXCR4 está inducida en más de 23 tipos de tumores humanos, incluyendo cáncer de mama, ovario, próstata (Sun et al. 2010), melanoma y SCC de cabeza y cuello (Sun et al. 2010; da Silva et al. 2016). La activación de la vía de señalización de SDF-1 α a través de CXCR4 promueve la proliferación de células tumorales y la angiogénesis en gliomas, cáncer de mama, ovario, colorrectal, melanoma o SCC cabeza y cuello, entre otros (Revisado en Sun et al. 2010).

Tras la unión de SDF-1 α , CXCR4 forma un complejo con la subunidad G α i (Sun et al. 2010) y activa cambios en el citoesqueleto en células de SCC oral, vía ERK1/2, AKT/PBK y NF- κ b, facilitando su migración (da Silva et al. 2016). Además, las células tumorales que expresan CXCR4 son atraídas a órganos distantes con elevada expresión de SDF-1 α , donde inician la generación de metástasis (Guo et al. 2016) (Figura 13).

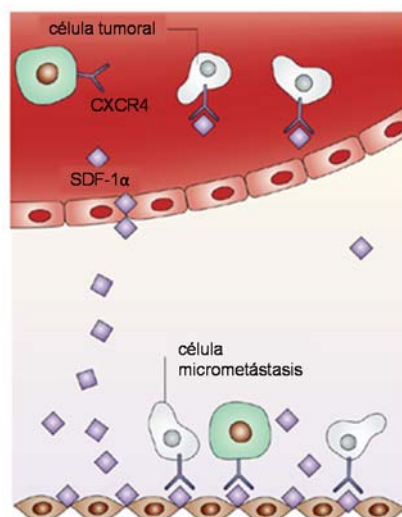


Figura 13. Papel de SDF-1 α durante la generación de metástasis. La expresión de SDF-1 α por las células del microambiente induce la supervivencia de las células tumorales migratorias y promueve su migración hacia tejidos distantes. Adaptado de Guo et al. 2016.

Además, la unión de SDF-1 α a CXCR4 promueve la motilidad de las células tumorales a través de la activación de las vías de señalización de FAK, Pyk2 and PI3K en cáncer de mama (Ben-Baruch 2009; Lee et al. 2004), así como a través de la vía JAK/STAT en melanoma (Bartolome 2006) (Figura 14).

6.3.2.2. Señalización SDF-1 α /CXCR7

La búsqueda de nuevos receptores de SDF-1 α se inició tras observarse que SDF-1 α se unía a las células de hígado fetal murino de ratones deficientes en CXCR4 (Burns et al. 2006). Además, existían discrepancias en la afinidad de unión de SDF-1 α a CXCR4 en varias líneas celulares de cáncer humano, que sugerían la presencia de otro receptor para SDF-1 α (revisado en X. Sun et al. 2010).

En condiciones fisiológicas, CXCR7 se expresa en linfocitos T (Burns et al. 2006) y está implicado en la regulación de la migración de las células B en las etapas tardías de maduración (Humpert et al. 2014). La expresión de este receptor se induce en las células tumorales y en las células endoteliales de varios tipos de tumores, incluido SCC de pulmón (Sun et al. 2010), cáncer de mama, próstata, páncreas o gástrico. Además, la expresión de CXCR7 está asociada a un incremento de la agresividad del SCC de piel, y la activación de este receptor estimula la supervivencia de las células tumorales vía ERK1/2 (Hu et al. 2014).

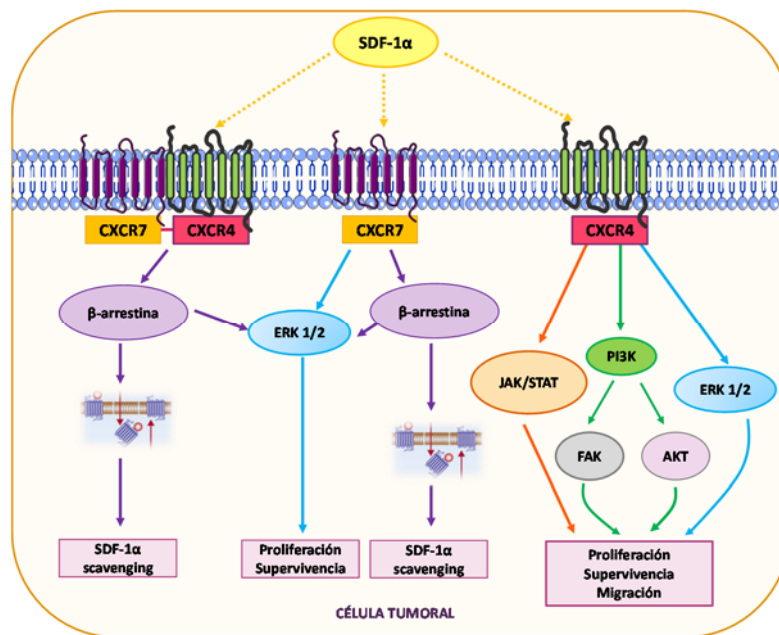


Figura 14. Señalización de SDF-1 α mediada por CXCR4 y CXCR7. La unión de SDF-1 α a CXCR4 induce proliferación, supervivencia y migración celular a través de la activación de las vías de JAK/STAT, PI3K y ERK 1/2. La unión de SDF-1 α a CXCR7 promueve la internalización del ligando y su degradación, mientras que CXCR7 se recicla a la membrana celular. Otros estudios indican que SDF-1 α activaría a través de CXCR7 la vía de ERK1/2, estimulando la proliferación y supervivencia celular. La formación de heterodímeros CXCR7/CXCR4 bloquea la señalización a través de CXCR4 y favorece la actividad *scavenger* de CXCR7, así como la activación de la vía de ERK1/2. Adaptado de Scala 2015.

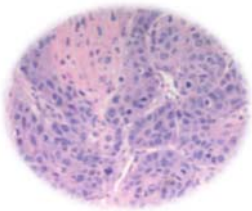
CXCR7 es también un receptor GPCR con siete dominios transmembrana pero, a diferencia de CXCR4, carece de la capacidad para mediar quimiotaxis y la movilización de calcio después de la unión con el ligando (Burns et al. 2006). En este sentido, se ha propuesto que la unión de SDF-1 α con CXCR7 activa β -arrestina, lo que conduce a la internalización del ligando y a su degradación en el lisosoma, mientras que el receptor se recicla volviendo a la membrana celular (Sánchez-Martín et al. 2013) (Figura 14). La eliminación de CXCR7 provoca un aumento significativo de los niveles extracelulares de SDF-1 α en interneuronas corticales, favoreciendo su unión a CXCR4. Esto sugiere que CXCR7 podría regular la unión de SDF-1 α con CXCR4 (Sánchez-Alcañiz et al. 2011).

6.3.2.3. Señalización de SDF-1 α mediante heterodímeros CXCR4-CXCR7

En los últimos años, se ha descrito que CXCR4 y CXCR7 pueden formar homo y heterodímeros al unirse a SDF-1 α . La capacidad de formar homo o heterodímeros puede depender del nivel de expresión de ambos receptores. Cuando CXCR4 y CXCR7 son expresados en niveles similares, se forman heterodímeros y homodímeros con la misma frecuencia (Levoye et al. 2009). La heterodimerización induce un cambio conformacional en CXCR4, bloqueando la formación del complejo con la subunidad G α i y la consecuente movilización de calcio. Estos estudios sugieren que la formación de heterodímeros favorecería la internalización del ligando promovida por CXCR7 y el reciclaje de ambos receptores (Würth et al. 2014; Levoye et al. 2009).

Recientemente, se ha descrito que CXCR7 tendría otra función distinta a la actividad *scavenger*. Tras la unión al ligando, CXCR7 activaría β -arrestina, y esto estimularía la fosforilación de ERK 1/2, promoviendo proliferación y supervivencia celular (Rajagopal et al. 2010) (Figura 14).

Hipótesis y Objetivos



Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que los carcinomas escamosos de piel de estadios tempranos, que muestran características de diferenciación epitelial (WD-SCCs), progresan a carcinomas indiferenciados y con características mesenquimales (PD/S-SCCs), los cuales presentan un crecimiento mucho más agresivo y una mayor capacidad metastásica que los WD-SCCs. Basándonos en estas observaciones, nosotros hipotetizamos que las características de las células madre del cáncer (CSCs) podrían cambiar a lo largo de esta progresión, para promover el crecimiento agresivo y la metástasis asociada a los PD/S-SCCs. La progresión de WD-SCCs a PD/S-SCCs podría estar favorecida por la localización y las características de las células de origen, y podría estar además potenciada por señales o factores procedentes del microambiente tumoral, que actuarían modificando la capacidad de las CSCs para dividirse, diferenciarse y diseminar.

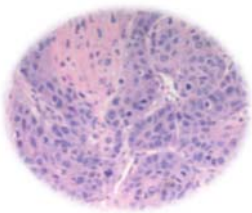
El objetivo principal de la presente tesis doctoral es estudiar los mecanismos moleculares que promueven la progresión del carcinoma escamoso de piel de ratón.

Los objetivos concretos de este trabajo son los siguientes:

1. Determinar si el origen celular de los SCCs de piel, ya sean las células madre de la epidermis interfolicular o aquellas que residen en los folículos pilosos, puede influir en el desarrollo de PD/S-SCCs y por tanto en la progresión de los SCCs.
2. Analizar las alteraciones moleculares y funcionales de las CSCs producidas durante la progresión de los SCCs de piel, que serían responsables de promover el crecimiento agresivo y el mayor desarrollo de metástasis en los PD/S-SCCs.
3. Caracterizar las alteraciones del microambiente tumoral durante la progresión de los SCCs de piel, las cuales podrían regular las características y la función de las CSCs.
4. Evaluar el impacto de la vía de señalización mediada por SDF-1 α en el crecimiento de los SCCs avanzados y en el desarrollo de las metástasis.

El desarrollo de los objetivos 2 y 3 de esta tesis se realizó en colaboración con la Dra. Victoria da Silva Diz y Adrià Bernat Peguera, miembros del laboratorio de Envejecimiento y Cáncer del PEBC (IDIBELL).

Materiales y Métodos



1. MODELOS DE RATÓN

Todos los ratones utilizados en este estudio se mantuvieron en jaulas ventiladas y a temperatura constante (20-25°C), en condiciones SPF (*Specific Pathogen Free*) y de esterilidad. Los ratones disponían de agua y comida *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron realizados en cabinas de flujo laminar.

El manejo y todos los procedimientos realizados con los ratones fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL) en conformidad con la normativa nacional española.

1.1. Modelos de ratón de trazado de linaje

Para generar los modelos de ratón utilizados en el desarrollo del objetivo 1 de la presente tesis doctoral, se cruzaron ratones K14-HPV16 Tg/+ (FVB) (Arbeit et al. 1994) con los ratones K14Cre^{ER}/Rosa26-^{LSL}YFP (Vasioukhin et al. 1999), generando los ratones E6/E7-K14CreYFP (permiten trazar las SCs de la IFE y su progenie). Por otro lado; los ratones K14-HPV16 Tg/+ se cruzaron con los ratones Lgr5Cre^{ER}/Rosa26-^{LSL}YFP y Lgr5Cre^{ER}/Rosa26-^{LSL}LacZ (Jaks et al. 2008), generando los E6/E7-Lgr5CreYFP y los E6/E7-Lgr5CreLaz, respectivamente (permiten trazar las SCs del folículo y su progenie). Para trazar la población de SCs del folículo, los ratones E6/E7-Lgr5CreYFP y E6/E7-Lgr5CreLaz se trataron con 3 mg de tamoxifeno (Sigma). Para trazar exclusivamente la población de SCs de la IFE, los ratones E6/E7-K14CreYFP fueron tratados con una dosis más baja de tamoxifeno (1 mg). Todos los tratamientos se realizaron mediante inyección intraperitoneal, 21 días después del nacimiento.

Para acelerar el desarrollo de tumores en los modelos mencionados anteriormente, 8 semanas después del nacimiento, se afeitó la piel de la espalda de los ratones y se administró tópicamente una solución de 7,12-dimetilbenz(a) antraceno (DMBA, Sigma), a una concentración de 0.125 µg/µl (diluido en acetona). Una semana después, se administró tópicamente una solución de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA, Sigma), a una concentración de 0.0625µg/µl (diluido en acetona) cada 3 días durante 15 semanas. Después del tratamiento, todos los ratones desarrollaron múltiples lesiones neoplásicas. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño crítico o los ratones presentaron síntomas de pérdida de salud, los tumores se resecaron quirúrgicamente.

1.2. Modelo de progresión tumoral

Para generar los modelos de ratón de progresión de SCCs que se utilizaron en nuestros trabajos, se utilizaron los ratones K14-HPV16Tg/+ (fondo FVB) (Arbeit et al. 1994) que se cruzaron con los ratones C57/Bl6 (F1). Para la generación de los linajes ortotópicos de SCCs (OT-SCC), se

anestesiaron ratones macho atímicos (Harlan Laboratories) de 6 semanas de edad por inhalación de isoflurano. Seguidamente se hizo una pequeña incisión en la piel de la espalda de estos ratones y se implantó un pequeño trozo de tumor (2-4 mm³) en el centro de la herida utilizando suturas quirúrgicas.

Se midió la anchura del tumor (W) y la longitud (L) cada 6 días y se estimó el volumen del tumor según la fórmula, $V=\pi/6 \times L \times W^2$. Cuando estos alcanzaron un tamaño crítico, fueron reseccionados quirúrgicamente. La incisión se cerró mediante grapas y una pequeña pieza del tumor fue injertada de forma seriada en nuevos ratones inmunodeficientes (da Silva-Diz et al. 2016), como se ha descrito anteriormente, para permitir un crecimiento ilimitado del tumor. Los ratones sometidos a resección se controlaron diariamente. Cuando éstos presentaron síntomas de pérdida de salud o dificultad respiratoria, se sacrificaron y se evaluó la presencia de lesiones metastásicas.

2. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS DE LAS MUESTRAS TUMORALES

Para el diagnóstico histopatológico de los tumores, así como para los ensayos de inmunohistoquímica, los tumores se fijaron en formaldehído al 4% a 4°C durante toda la noche. A continuación, las muestras tumorales se deshidrataron con etanol en una serie de concentraciones crecientes, siguiendo el siguiente protocolo:

1. Etanol 70%, durante 1 hora.
2. Tres soluciones de etanol 96%. Las muestras se sumergieron 1 hora en las dos primeras soluciones y se sumergieron durante toda la noche en una tercera solución.
3. Etanol 100%, durante 4 horas.
4. Xileno durante 1 hora y media.
5. Por último, las muestras se embebieron en parafina líquida durante toda la noche.

Los tumores se seccionaron a 4 µm utilizando un microtomo. Para los diagnósticos histopatológicos, así como para los ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, las secciones se desparafinaron en xileno, y seguidamente se hidrataron etanol en una serie de concentraciones decrecientes, como se indica a continuación:

1. Xileno durante 40 minutos.
2. Etanol 100% durante 15 minutos.
3. Etanol 96% durante 15 minutos.
4. Etanol 70% durante 5 minutos.
5. Las secciones se sumergieron en agua destilada durante 5 minutos.

Para visualizar EGFP, YFP o mCherry directamente, los tumores se fijaron previamente en formaldehído al 4% durante 30 minutos, se lavaron 30 minutos con PBS y seguidamente fueron

embebidos en OCT y se congelaron a -80°C . Los tumores se seccionaron a $4\text{ }\mu\text{m}$ utilizando un criostato.

Los núcleos se tiñeron usando 4'6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma). Para ello en primer lugar las secciones se incubaron durante 10 minutos en PBS 1x, se permeabilizaron en una solución de PBS 0.1% Triton X-100 (Merck) durante 10 minutos, y a continuación, se incubaron con DAPI soluble (1/1000, en PBS) durante 10 minutos. Para finalizar, las preparaciones se lavaron con PBS 1x durante 10 minutos y se cubrieron con cubreobjetos utilizando el medio de montaje Vectashield®.

Las muestras se visualizaron en un microscopio Leica DM6000B y un microscopio confocal Leica TCS SP5.

2.1. Diagnóstico histopatológico. Tinción hematoxilina-eosina

Para el diagnóstico histopatológico, las secciones se tiñeron con hematoxilina/eosina. Para ello después de la hidratación (sección 2), las secciones fueron teñidas con hematoxilina Harris' (10%) durante 10-15 segundos. Para eliminar el exceso de hematoxilina, las secciones fueron lavadas con agua corriente durante 5 minutos. Seguidamente, las preparaciones se trataron con HCL (0.75%) durante 5 segundos, y con una solución de agua amoniacal (2%) durante 5 segundos. A continuación, las muestras fueron lavadas en agua destilada durante 5 minutos y fueron contrastadas con eosina (20% en etanol 80%) durante 10 segundos. Después de este proceso, las secciones fueron deshidratadas como se indica a continuación:

1. Etanol 70% durante 5 minutos.
2. Etanol 96% durante 10 minutos.
3. Etanol 100% durante 5 minutos.
4. Xileno durante 40 minutos.

Finalmente, las secciones fueron cubiertas con cubreobjetos usando el medio de montaje DPX (Merck).

2.2. Tinción LacZ

Para la detección de las células LacZ⁺, las muestras de tumor se procesaron según el siguiente protocolo:

1. Fijación de las muestras en una solución de 0.2% de glutaraldehído-2% paraformaldehído en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.
2. Tres Lavados de 15 minutos con la solución de lavado (2 mM de MgCl₂ – 0.1% NP40 en PBS).

3. Tinción de las muestras con la solución K₃Fe (CN)₆ (5 mM)-K₄Fe (CN)₆ (5 mM)-X- gal (1 mg/ml) en solución de lavado, durante 48 horas a 37°C.
4. Dos lavados con PBS durante 10 minutos cada uno a temperatura ambiente.
5. Fijación de las muestras con PFA 4% durante toda la noche a 4°C.
6. Dos lavados con PBS durante 10 minutos cada uno a temperatura ambiente
7. Deshidratar las muestras con etanol a concentraciones crecientes: 2 horas etanol 70% a 4°C, 2 horas etanol 96% a 4°C, 2 horas etanol 100% a 4°C y 2 horas n-butanol a temperatura ambiente.
8. Por último, las muestras se embebieron en parafina líquida durante toda la noche

A continuación, se obtuvieron secciones de los tumores de 4 µm de grosor utilizando un micrótomo. Para la detección de las células LacZ⁺, las secciones se desparafinaron durante 10 minutos en xileno, se rehidrataron con soluciones con concentraciones crecientes de etanol y finalmente, se contrastaron con hematoxilina, como se indica a continuación:

1. Hidratación de las muestras: 2 minutos etanol 100%, 1 minutos etanol 96%, 1 minuto etanol 90%, 1 minuto etanol 80%, 1 minuto etanol 70%, 1 minuto etanol 60%, 1 minuto etanol 50%, 1 minuto etanol 25%, 1 min agua destilada.
2. Hematoxilina Harris' (10%) durante 10-15 segundos
3. Etanol 100% durante 1.5 minutos
4. Xileno 4 minutos

Finalmente, las secciones fueron cubiertas con cubreobjetos, usando el medio de montaje DPX.

2.3. Ensayos de inmunohistoquímica

Para los ensayos de inmunohistoquímica, las secciones fueron inicialmente desparafinadas e hidratadas siguiendo el protocolo descrito en la sección 2. Seguidamente, se realizó el desenmascaramiento del antígeno utilizando citrato de sodio 10 mM (pH 6.0) a altas temperaturas, usando microondas. A continuación, las secciones fueron incubadas con una solución de H₂O₂ al 3% durante 10 minutos, para bloquear la peroxidasa endógena. Posteriormente, las muestras fueron lavadas 1 vez con agua destilada y 3 veces con PBS 0.1% Triton X-100 (durante 5 minutos). Las secciones de tumores fueron bloqueadas con suero de caballo al 5%, FBS al 5% o BSA al 5% en PBS durante 1h a temperatura ambiente, y se incubaron con los anticuerpos primarios de interés diluidos en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados se resumen en la Tabla 10.

Las secciones tumorales, se lavaron 3 veces con PBS 0.1% Triton X-100 y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 10) durante 1h a temperatura ambiente. Se utilizó el kit MOM Basic (Vector Laboratories) para los anticuerpos monoclonales de ratón (siguiendo las instrucciones del fabricante). A continuación, se procedió al revelado con diaminobencidina (DAB,

Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Después de un lavado con agua corriente durante 5 minutos, las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina y deshidratadas en un gradiente creciente de etanoles y xileno, como se describe a continuación:

1. Hematoxilina Harris' (10%) durante 10-15 segundos.
2. Lavado con agua corriente durante 5 minutos.
3. Etanol 70% durante 5 minutos.
4. Etanol 96% durante 10 minutos.
5. Etanol 100% durante 10 minutos.
6. Xileno 30 durante minutos.

Finalmente, las muestras se cubrieron con cubreobjetos, como se describe en la sección 2.1.

2.4. Ensayos de inmunofluorescencia

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron con secciones de parafina o en criocortes de OCT.

Las secciones de OCT se atemperaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se fijaron con formol 4% durante 10 minutos. Seguidamente se lavaron en PBS y se permeabilizaron con PBS 0.1% Triton X-100 durante 10 minutos. Antes de ser incubadas con la solución de bloqueo 1h, las secciones fueron lavadas en PBS. Las muestras fueron incubadas con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C (Tabla 10). Al día siguiente, las secciones fueron atemperadas 20 minutos y lavadas 3 veces con PBS 0.1% Triton X-100 antes de ser incubadas con los anticuerpos secundarios (Alexa Fluor) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Los núcleos fueron teñidos con DAPI durante 10 minutos y las preparaciones fueron montadas con Vectashield®.

Las muestras en parafina, fueron desparafinadas e hidratadas como se describe en la sección 3. Después del desenmascaramiento del antígeno, las secciones se lavaron 3 veces con PBS 0.1% Triton X-100 y, tras incubarlas con solución de bloqueo durante 1 hora, se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios de interés (Tabla 10). Tras realizar 3 lavados con PBS 0.1% Triton X-100, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor y los núcleos fueron teñidos con DAPI, como se describe anteriormente para las muestras de OCT.

Anticuerpo primario			Anticuerpo secundario		
Anti- β -catenina	1:150	BD Bioscience	Anti-Mouse	1:200	DAKO
Anti-CD31	1:50	Cell Signaling	Anti-Rat	1:300	Alexa Fluor® 488
Anti-E.cadherina	1:100	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:600	Alexa Fluor® 568
Anti-H3 fosforilada (Ser10)	1:200	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:600	Alexa Fluor® 568
Anti-FGFR1	1:80	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:400	Alexa Fluor® 568
Anti-P-cadherina	1:450	R&D Systems	Anti-Goat	1:500	DAKO

Anti-Sox9	1:300	Millipore	Anti-Rabbit	1:200	DAKO
Anti-Vimentina	1:500	Abcam	Anti-Rabbit	1:600	Alexa Fluor® 568

Tabla 10. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para los análisis de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

3. AISLAMIENTO DE CÉLULAS DE SCCS Y ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

3.1. Aislamiento de células de SCCs

Los tumores reseccionados fueron triturados manualmente con la ayuda de un bisturí y se incubaron en medio de digestión (RPMI (Gibco®), HEPES (2 mM, Sigma), FBS (10%, Gibco®), antibiótico/antimicótico (1x, Sigma), colagenasa I (60 U/ml, Sigma) y dispasa (0,7 U/ml, Gibco®) durante una noche a 37°C en agitación. Las suspensiones celulares se filtraron y se recuperaron después de una centrifugación. Seguidamente, se incubaron con tampón de lisis acetato de potasio (Ack, Lonza) durante 10 minutos, se lavó con PBS y después de una centrifugación, las células recuperadas se incubaron con tampón de bloqueo (FBS al 5% en PBS) IgG (0.01 mg/ml; Sigma), durante 10 minutos. Las células tumorales se incubaron con el anticuerpo anti-CD31 (1:200, BD Bioscience) a 4°C durante 30 minutos y en agitación, luego con Dynabeads® anti-rata (1:50; Invitrogen) durante 30 min a 4°C, para eliminar las células endoteliales de la suspensión de células tumorales. Las células se lavaron con solución de lavado (PBS, 0.5%BSA) y esta preparación de células se utilizó para establecer cultivos primarios y para ensayos de citometría de flujo.

3.2. Análisis y separación celular mediante citometría de flujo

Para el análisis y la separación celular mediante citometría de flujo, en primer lugar, las células aisladas de tumores así como las células en cultivo, se contaron utilizando Trypan Blue (Bio west). Seguidamente, se separaron 100.000 células para cada análisis y se incubaron en tampón de bloqueo (FBS al 5% en PBS) con IgG (0.01 mg/ml; Sigma) durante 10 minutos. A continuación, se incubaron con los anticuerpos de interés durante 30 minutos en agitación. Seguidamente, las células se lavaron con solución de lavado (sección 3.1). Finalmente, las células se resuspendieron en el tampón de análisis (FBS al 2%, EDTA 0,5 mM en PBS).

Anticuerpo	Concentración	Casa comercial
CD34 eFluor® 660	1:100	eBioscience
CD34 Biotilado	1:30	eBioscience
CD49f PE	1:50	BD Bioscience
CD49f fitc	1:50	BD Bioscience
CD140a-PE	1:50	BD Bioscience

CD45 PE	1:200	BD Bioscience
CXCR4 VIO	1:100	Miltenyi Biotec
CXCR7 PE	1:75	BioLegend
CXCR4 APC	1:50	Miltenyi Biotec
EpCAM APC/Cy7	1:150	BioLegend

Tabla 6. Anticuerpos utilizados para los análisis de citometría de flujo.

Para los marcajes con el anticuerpo CD34 biotilado, se incubaron las células durante 30 min a 4 °C y en agitación con el anticuerpo primario y después de un lavado con PBS 0,5% BSA, se incubaron con estreptavidina-APC (1:50; BD Bioscience) y con el resto de anticuerpos de interés, siguiendo el protocolo mencionado anteriormente.

Para los análisis de separación de células mediante citometría de flujo, se utilizaron 4-10 millones de células. Para la incubación con los anticuerpos de interés, se separaron en grupos de 300.000 células por tubo. Después de la incubación y del lavado con PBS 0,5% BSA, se reunieron los 4 millones de células en un tubo y tras centrifugarlas se resuspendieron en el tampón PBS, 2%FBS, 2 mM EDTA.

Tanto el análisis como la separación de células, se realizaron con el equipo BD Bioscience Aria. Las células vivas se detectaron por exclusión con DAPI (Sigma).

4. CULTIVOS CELULARES Y TRATAMIENTOS

Todos los cultivos celulares primarios utilizados en la presente tesis doctoral se establecieron en nuestro laboratorio a partir de WD-SCCs y PD/S-SCCs implantados ortotópicamente en ratones inmunodeficientes.

4.1. Cultivos celulares

Las células tumorales (deplecionadas de linaje endotelial) aisladas de PD/S-SCCs (células PD/S) se cultivaron en medio básico compuesto de DMEM-F12 (Gibco®) con B27 (Gibco®) y penicilina/estreptomina (PAA Laboratories) en un incubador humidificado a 37°C y 5% de CO₂. Las células tumorales aisladas de WD-SCCs (células WD), se cultivaron en medio básico con EGF (20 ng/ml, Sigma).

4.2. Tratamientos de estimulación/inhibición y ensayos de proliferación *in vitro*

Para los ensayos de proliferación, se sembraron 6 réplicas de 2×10^3 células WD por pocillo en placas de 96 pocillos, y se ayunó en medio básico durante 12 h. Las células PD/S, que ya crecían en medio básico, se sembraron a la misma densidad. Después, se añadió el medio básico fresco con o sin EGF

(20 ng/ml), FGF2 (10 ng/ml) o PDGF-AA (10-30 ng/ml), PDGF-BB (10-30 ng/ml) o PDGF-CC (10-30 ng/ml) o SDF1 α (80-150 ng/ml).

La viabilidad celular se midió usando el ensayo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro (MTT). Para los cultivos en suspensión, se añadieron 10 μ l de sal de MTT (5 mg/mL) y se incubó durante 3 horas a 37°C. Seguidamente, se añadieron 100 μ l de tampón de lisis de MTT (50% N-dimetilformamida, 2.5% ácido acético, 2.1% ácido clorhídrico 1N, 20% SDS y H₂O destilada) y se incubó a 37°C durante toda la noche. La proliferación celular se midió calculando la absorbancia media ($\pm$ SE) a 560/750nm. Para los cultivos de células adheridas, se añadieron 10 μ l de sal de MTT y se incubó durante 3 horas a 37°C. Seguidamente, se añadieron 100 μ l de DMSO y se midió la proliferación celular calculando la absorbancia media ($\pm$ SE) a 560/750nm.

Para evaluar el efecto de Imatinib, PD173074 o AMD3100 sobre la proliferación celular en presencia o ausencia de factores de crecimiento, se sembraron 6 réplicas de 5x10³ células PD/S por pocillo para los ensayos con Imatinib y PD173074, y 4x10³ células PD/S por pocillo, para los ensayos con AMD3100, en placas de 96 pocillos. Los inhibidores se añadieron en medio básico fresco 2h antes de los tratamientos con los factores de crecimiento. En estos ensayos, el medio con factores y/o inhibidores se refrescó cada 3 días y la proliferación y supervivencia celular se midieron con ensayos MTT.

Para determinar el efecto de factores de crecimiento e inhibidores sobre la activación/inhibición de la señalización de EGFR, PDGFR, FGFR y SDF-1 α se sembraron 1,5x10⁶ de células WD y 4x10³ células PD/S por pocillo en placas de seis pocillos. Las células WD se ayunaron durante 12h en ausencia de factores antes de iniciar los tratamientos. Los inhibidores se añadieron 2h antes del tratamiento con factores de crecimiento. Las células se incubaron entonces durante 10min en presencia de los respectivos factores.

Al final del tratamiento, las células se colocaron sobre hielo, se lavaron dos veces con PBS frío y se recuperaron para el posterior análisis mediante western blot.

4.3. Ensayos de invasión celular

Los ensayos de invasión se realizaron en placas CIM-16 (ACEA Biosciences) cubiertas con 5% de Matrigel (*Growth Factor-Reduced*, BD Biosciences). Se rellenaron los pocillos de la cámara inferior con DMEM 10% FBS y los pocillos de la cámara superior con DMEM libre de suero y se equilibraron durante 1 hora a 37°C. Se sembraron en la cámara superior 8x10⁴ células PD/S células sh-control y sh-PDGFR α y se colocó en el sistema xCELLingence. En el caso de células tratadas con inhibidores, las células PD/S fueron previamente tratadas durante 48 horas con Imatinib (4 μ mol/L), con AMD3100 (1 μ g/ml y 5 μ g/ml). El índice celular representa la capacidad de invasión de las células.

Por otro lado, se incluyeron en matrigel células sh-control, sh- PDGFR α , y células PD/S control y previamente tratadas 48 horas con Imatinib (4 μ mol/L), se sembraron en réplicas en placas de 96 pocillos, cubiertas previamente con matrigel y se añadió 100 μ l de medio básico con o sin Imatinib. Después de 24 horas, se capturaron imágenes utilizando un microscopio invertido. Se cuantificaron las esferas que contenían 4 o más estructuras de invasión con una longitud mayor a 25 μ m.

5. TRANSDUCCIONES LENTIVIRALES

Para interferir la expresión de PDGFR α , CXCR4 y CXCR7 se utilizaron vectores lentivirales TRC shARN de DharmaconGE®.

Para comparar la actividad transcripcional de la β -catenina en células WD y PD/S y los SCCs derivados de estas células, se utilizó el gen reportero TCF/LEF, que contiene 7 dominios de unión de b-catenina (7TGC). La unión de β -catenina a esta región induce la expresión de GFP (Fuerer & Nusse 2010).

Las partículas lentivirales se produjeron en células 293T utilizando pPAX2 y pMD2.G como vectores de empaquetamiento. Para la transfección, se mezclaron 2.5 μ g de pMD2.G, 7.5 μ g de pPAX2 y 10 μ g del plásmido de interés y se añadió 80 μ l PEI (1ng/ μ l) y OPTIMEM hasta completar un volumen de 300 μ l. La solución resultante, conteniendo los plásmidos, se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad y se añadió gota a gota a las placas Petri que contenían las células 293T. Después de 12 h de incubación, el medio de transfección se cambió por medio fresco (DMEM 2% FBS) y se incubó durante 48 horas para la producción de lentivirus. Para la infección, las células WD y PD/S se incubaron con el medio de las células 293T que contenía las partículas de lentivirus. Para ello, las células WD que crecían como células adheridas se recuperaron de la placa mediante tratamiento con tripsina (Trypsina 2.5x/EDTA, Gibco®) durante 10 min a 37°C y se sembraron 1x10⁶ células en placas de 60 mm 24h antes de la infección, mientras que las células PD/S, creciendo como esferas, se disgregaron mecánicamente y 1x10⁶ células se sembraron como células individuales justo antes de la infección.

6. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

6.1. Extracción de proteínas de células tumorales

Las proteínas de las células tumorales aisladas de tumores se extrajeron utilizando tampón de lisis (Tris pH8 50mM, EDTA 5mM, NaCl 350mM, NP-400 5%, glicerol 10%, fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) 1mM, NaF 2mM, Na₃VO₄ 0,1mM, DTT 1mM, PhosSTOP (Roche), Complete (Roche), SDS (Invitrogen) 0,1% y Triton X-100 (Thermo Scientific) 0.01%). Seguidamente, las muestras se incubaron en hielo durante 20 minutos, se sonicaron durante 5 minutos

y se centrifugaron (10.000 rpm) durante 10 minutos a 4°C. La concentración de proteínas, en el sobrenadante se cuantificó utilizando la solución Bradford (Bio Rad).

6.2. Extracción de proteínas de muestras tumorales

Para preparar extractos de proteínas de los tumores se partió de fragmentos de tumores congelados a -80°C. Las muestras fueron disgregadas en tampón de lisis (sección 6.1) sin SDS ni Tritón, por usando un homogeneizador Politron. Después de la disgregación, se añadieron 0,01% Tritón y 0,1% SDS a los homogenizados y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Seguidamente, las muestras fueron sonicadas durante 5 minutos y centrifugadas (10.000 rpm) durante 10 minutos a 4°C. Las proteínas en el sobrenadante se detectaron siguiendo el protocolo descrito en la sección 6.1.

7. WESTERN BLOT

30µg de proteínas extraídas de los tumores y de las células (sección 6) fueron diluidas en volúmenes iguales con tampón de carga 4x (60mM TRIS pH 6.8, 2% SDS, 20% glicerol, 0.01% azul de bromofenol y 5% β-Mercaptoethanol). Seguidamente, se incubaron a 95°C durante 5 minutos.

A continuación, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE. Para ello, se prepararon geles a partir de una solución de acrilamida/bisacrilamida (30% (37.5:1) (Merck Millipore). En este gel el porcentaje de acrilamida/bisacrilamida es variable, dependiendo del peso molecular de las proteínas de interés. La electroforesis se realizó durante 2 horas a 100V.

Anticuerpo primario			Anticuerpo Secundario		
Anti-AKT	1:1000	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:2000	DAKO
Anti-pAKT Ser473	1:1000	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:2000	DAKO
Anti-β-actina-HRP	1:50.000	Sigma	--	--	--
Anti-β-catenina	1:5000	BD Bioscience	Anti-Rabbit	1:1000	DAKO
Anti-β-catenina activa	1:400	Millipore	Anti-Mouse	1:1000	DAKO
Anti-Caspasa 3 cleaved	1:1000	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:1000	DAKO
Anti-CXCR4	1:1000	Abcam	Anti-Rabbit	1:1000	DAKO
Anti-EGFR	1:1000	Cell Signaling	Anti-Mouse	1:1000	DAKO
Anti-pEGFR Tyr845	1:1000	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:1000	DAKO
Anti-ERK1/2	1:2000	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:3000	DAKO
Anti-pERK1/2 Tyr204	1:2000	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1:3000	DAKO
Anti-FAK	1:2000	Cell Signalling	Anti-Rabbit	1:2000	DAKO
Anti-p-FAK Tyr925	1:2000	Cell Signalling	Anti-Rabbit	1:2000	DAKO
Anti-FGFR1	1: 1000	Cell Signaling	Anti-Rabbit	1: 1000	DAKO
Anti-pFGFR Tyr653/654	1:1000	Cell Signalling	Anti-Rabbit	1:1000	DAKO
Anti-GAPDH-HRP	1:6000	Cell Signalling	--	--	--
Anti-PDGFRα	1:500	R&D Systems	Anti-Goat	1:1000	DAKO
Anti-pPDGFRα Tyr754	1:1000	R&D Systems	Anti-Rabbit	1:1000	DAKO
Anti-STAT3	1:2000	Cell Signalling	Anti-Rabbit	1:2000	DAKO

Anti-p-STAT3 Tyr705	1:2000	Cell Signalling	Anti-Rabbit	1:2000	DAKO
Anti-ZEB1	1:500	Abcam	Anti-Goat	1:1000	DAKO

Tabla 7. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para los análisis de western blot.

Una vez separadas las proteínas en el gel de acrilamida, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare). La transferencia de proteínas se realizó a 200 mA durante 2 horas. A continuación, las membranas se bloquearon con solución de bloqueo (5% leche desnatada o 5% BSA (bovine serum albumin) en TBS- 0.1% Tween20 (Sigma Aldrich) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Seguidamente, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C y en agitación, con los anticuerpos primarios descritos en la tabla 7.

Al día siguiente, las membranas se lavaron en TBS- 0.1% Tween20 durante 30 minutos, cambiando el tampón de lavado cada 10 minutos. A continuación, se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (DAKO) (tabla 7) diluidos en 5% leche desnatada o 5% BSA.

La detección se realizó utilizando el sistema de detección de quimioluminiscencia, *ECL Western Blotting Detection Reagents* (Amersham).

8. ENSAYO ELISA (*ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*)

Para realizar estos análisis, inicialmente se sembraron en suspensión 1.5×10^6 células PD/S por cada frasco y 6×10^5 células WD por cada placa Petri (60x15cm). Estos cultivos celulares, se incubaron durante 48 horas a 37° en medio DMEM con B27. Pasado este tiempo se recogió el medio y se sometió a una centrifugación (13000 rpm) durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. A continuación se utilizó el kit de ELISA de PeproTech (*Mini ABTS ELISA Development kit*), siguiendo las recomendaciones de uso del fabricante. Seguidamente, se añadió la solución sustrato (*TMB Liquid Substrate*) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo del color. La absorbancia se midió a 450nm.

9. RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (qRT-PCR)

9.1. Retrotranscripción

El ARN de las células y los tumores, se extrajo usando Trizol (Invitrogen) y la precipitación total del ARN se realizó con isopropanol, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN aislado se cuantificó utilizando Nano-Drop®. A continuación, las muestras fueron tratadas con DNasa, usando el kit TURBO DNA-free™ (Ambion) según las indicaciones del fabricante. Seguidamente, utilizando

el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), se retrotranscribió 1 µg de ARN en un termociclador de Applied Biosystems 2720, siguiendo estos ciclos: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 10 minutos 85°C.

9.2. qRT-PCR

La qRT-PCR, es una PCR que permite cuantificar el número de productos de amplificación. Comúnmente, se utilizan dos métodos para la detección de los productos, ambos han sido usados en este trabajo.

Se utilizaron 15 ng de ADNc y cebadores específicos para cada gen. Todos los datos se normalizaron a la expresión de GAPDH y HPRT.

Las reacciones de PCR a tiempo real se realizaron en el equipo Applied Biosystems 7900HT.

9.2.1. qRT-PCR mediante SYBR Green

Para la detección mediante SYBR Green, nosotros utilizamos SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), que contiene todos los reactivos necesarios para la qRT-PCR, excepto el ADNc y los primers. En placas de 384 pocillos, cargamos 15 ng de ADNc diluido en un volumen final de 4µl en agua MiliQ, 5 µl de SYBR Green y 0.5 µl de primer *Forward*, 0.5 µl de primer *Reverse* (ambos a una concentración de 10 µM). Los primers (Sigma-Aldrich) utilizados se resumen en la Tabla 8.

Gen	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
<i>Gapdh</i>	GGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTC
<i>Pgdfra</i>	CAGTCCACCCGTGTGCT	GAAAATTCAACAGCAGCTGGT
<i>Pgdfβ</i>	CAGTGACAGACTACCTCTTTGGAG	GATATGCAGGATGGAGCCA
<i>Pgdfa</i>	TCAGGAAGTTGGCCGATGTG	ATAGACTCCGTAGGGGCTGAG
<i>Pgdfb</i>	GAATGGTCACCCGAGCTTGA	CCGGTCCAGGTGAGAAAGATT
<i>Pgdfc</i>	AGGTTGTCTCCTGGTCAAGC	CCTGCGTTTCCTCTACACAC
<i>Fgfr1b</i>	TCTGGCCTCTACGCTTGC	AGGATGGGAGTGCATCTGA
<i>Fgfr1c</i>	TGCTGGAGTTAATACCACCG	TTCCAGAACGGTCAACCATG
<i>Fgfr2b</i>	GGCAGTAAATACGGGCCTG	GGACAGTGAGCCAGGCAG
<i>Fgfr2c</i>	AACGGGAAGGAGGTTTAAGCAG	TGGCAGAACTGTCAACCATGC
<i>Fgfr3b</i>	GCCAACCAGACAGCCATTCTAGGC	CTTGGGGCCCGTGAACACGCAGC
<i>Fgfr3c</i>	CGATGCACAGCCACACAT	GTTAGCGCCTGCAGTCTTG
<i>Fgfr4</i>	GAATCGTATTGGAGGCATTCGG	CAGATACAAGACCTGTACCTCC
<i>Fgf2</i>	CGACCCACACGTCAAACCTAC	TGGCACACACTCCCTTGATA
<i>Fgf7</i>	GGGAAATGTTTCGTTGCCTTA	CCCTGCTGAATGAAACTGGT
<i>Areg</i>	CATCGGCATCGTTATCACAG	TGCACAGTCCCATTTTCTTG
<i>Btc</i>	GGTAGCAGTGTGAGCTCCCT	TCTGGTTGTGTTCCCATCTG

<i>Epgn</i>	CTCCTAGCACAGCACAGCAG	TGGTCTTCCAGACAAGGATG
<i>Ereg</i>	AAGCTGCACCGAGAAAGAAG	GGATCACGGTTGTGCTGATA
<i>Hbegf</i>	CAAGGACTACTGCATCCACG	AGAGTCAGCCCATGACACCT
<i>Tgfa</i>	CTACTCGCCAACCGCAGG	TGGCACACAGCTAACAGGAT
<i>Egfr</i>	GGCGTTGGAGGAAAAGAAAG	ATCCTCTGCAGGCTCAGAAA
<i>Erb2</i>	GTGATCATCATGGAGCTGGC	GTCGCAACTTCATGTCGGTA
<i>Erb3</i>	AGATGGGCAACTCTCAGGC	TGTGTCCCGTAAGCACAATC
<i>Egf</i>	TCGAGAGAAGCGAGAGAAGC	TCTGGGTCAATCCGAGAGAT
<i>Sox2</i>	GCGGAGTGGAACCTTTTGTCC	CGGGGAAGCGTGTACTTATCCTT
<i>Nanog</i>	CAGAAAAACCACTGGTTGAAGACTAG	GCAATGGATGCTGGGATACTC
<i>Axl</i>	GCACAGTCTGCAAACTCCAG	GAGCACTGTGATGGTGGCT
<i>Gas1</i>	CCCTCTTCTGTGCGGTTTTT	CACCGTTCAGCACTCTGAGTC
<i>Vcan</i>	CCGCTGGACTGACGGCAGTG	CAACAGGGGGTTGGCCGCAA
<i>Nrp2</i>	TGTTTCGAGGGAGTGATAGGG	ATCCTCACCTGCAAAAGCTG
<i>Evl</i>	TGCTCTTTGCCCTGAACATC	TCTGGATGTCCATCTCTCA
<i>Ddr2</i>	AAGGCTTGCTGCTGCTGCT	GAAGACGGAGTTGGATCTGG
<i>Tsc2</i>	CCGCAACCTGTCTTTGTGG	AATGTGGCGGAGTCTTGCGA
<i>Cdc88A</i>	TGAAGAGCCTGCAACAAGAGAAC	TCGGAGGGCATCCAAATTCATCTCG
<i>Cldn3</i>	TACCGTCACCACTACCAGCA	GCAAGCAGACTGTGTGTGCG
<i>Dsc3</i>	CGATGGTGGTTCTTGAGTTC	AGGCTTCACCAACAAAAGTGA
<i>Dsg2</i>	AGTGGGCTCTGATAACTGGC	CAAGGGTCACAATCCCTTCA
<i>Ccr1</i>	TGCTGAGGAACTGGTCAGG	AGGCCAGAAACAAAAGTCTG
<i>Ccr5</i>	GCAGGGTGCTGACATACCAT	CCTAGCCAGAGGAGGTGAGA
<i>Ccl6</i>	GCGACGATCTTCTTTTCCA	CCAGGAGGATGAGAAACTCC
<i>Ccl9</i>	GCCCTCAGACTGCTCTGGAC	ACTGCCCTCTCTTCTCAT
<i>Ccr2</i>	AGCACATGTGGTGAATCCAA	TGCCATCATAAAGGAGCCA
<i>Cxcl1</i>	TCTCCGTTACTTGGGGACAC	CCCACTCAAGAATGGTTCGC
<i>Ccr3</i>	GGTGGTGCCCACTCATATTC	AAGGACTTAGCAAAAATTCACCA
<i>Ccl7</i>	AGCTACAGAAGGATCACCAG	CACATTCCTACAGACAGCTC
<i>Ccl2</i>	GCATCCACGTGTTGGCTCA	CTCCAGCCTACTCATTTGGGATCA
<i>Cxcr3</i>	TCTCGTTTTCCCATATTCG	AGCCAAGCCATGTACCTTGA
<i>Cxcl4</i>	CAGCTAAGATCTCCATCGCTTT	AGTCCTGAGCTGCTGCTTCT
<i>Ccr4</i>	GGGTACCAGCAGGAGAAGC	CGACGGCATTGCTTCATAG
<i>Cx3cr1</i>	GTTCCAAAGGCCACAATGTC	AAGTTCCCTTCCCATCTGCT
<i>Cx3CL1</i>	TAGCTGATAGCGGATGAGCA	CGCGTTCTTCCATTTGTGTA
<i>CxCR4</i>	CCATGGAACCGATCAGTGTG	TTTTCATCCCGGAAGCAGG
<i>Il6</i>	ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC	TGATGCACTTGCAAGAAACA
<i>Il6ra</i>	ACCAGGTGATCATTAGGGA	TGGGTGTACTCTGGCTCACA
<i>Il6st</i>	GAAACAAGTTGCTGCTCT	CTGAGGGACCGGTGGTGT
<i>Cxcl5</i>	GCATTCGCTTAGCTTTCTT	GCCCTACGGTGGAAGTCATA
<i>Cxcr1</i>	TTCTGAGCTTGCTGGGAAAC	GGGTCCCTCGCCTGTATAAGA
<i>Csf1</i>	GGTAGTGGTGGATGTTCCCA	CCAGGATGAGGACAGACAGG
<i>Csf1r</i>	GGGCAACTGAGTAGGGTCAA	GTGCTACTGCTGTTGCTGCT

<i>Cntf</i>	CCATCCACTGAGTCAAGGCT	TGGCTAGCAAGGAAGATTCTG
<i>Sdf-1a</i>	GGCGTCTGACTCACACCTCT	AGTGTGCATTGACCCGAAAT
<i>Cxcl15</i>	AGAGGCTTTTCATGCTCAACA	CCATGGGTGAAGGCTACTGT
<i>Cxcr7</i>	CTGTCAGCTGGAGAATGTGC	TGCGGTGATGAAGCTGTAG
<i>Ccl12</i>	TGGCTGCTTGTGATTCTCCT	GTCTCAGGTATTGGCTGGA
<i>Cxcl3</i>	CCCCAGGCTTCAGATAATCA	TCTGATTTAGAATGCAGGTCCTT

Tabla 8. Lista de primers utilizados en qRT-PCR.

9.2.2. qRT-PCR mediante sondas TaqMan

Para la cuantificación mediante sondas TaqMan, nosotros utilizamos PCR Master Mix No AmpErase® UNG (Applied Biosystems). En placas de 384 pocillos, se cargaron 15 ng de ADNc diluido en un volumen final de 4.5 µl de agua MiliQ y se añadió 5.5 µl de solución de sonda TaqMan de interés. Las sondas utilizadas se resumen en la Tabla 9.

Símbolo gen	ID TaqMan
<i>Ccl5</i>	mm01302427 m1
<i>Cd34</i>	mm00519283 m1
<i>Cdb1</i>	mm 01247357 m1
<i>Cdb3</i>	mm 01249209 m1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1
<i>Hmgn3</i>	Mm00518151_m1
<i>Hprt</i>	Mm01545399_m1
<i>Krt14</i>	mm00516876 m1
<i>Krt15</i>	mm00492972 m1
<i>Lgr5</i>	Mm00438890_m1
<i>Lgr6</i>	Mm01291336_m1
<i>Lrig 1</i>	Mm00456116_m1
<i>Snail</i>	mm00441533 g1
<i>Slug</i>	mm00441531 m1
<i>Sox 4</i>	Mm00486317 s1
<i>Sox9</i>	Mm00448840_m1
<i>Twist</i>	mm00442036 m1
<i>Vegfa</i>	mm01281449 m1
<i>Vim</i>	mm01333430 m1
<i>Zeb 1</i>	mm00495564 m1
<i>Zeb2</i>	mm00497193 m1

Tabla 9. Lista de sondas TaqMan utilizados en qRT-PCR.

10. INYECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES Y TRATAMIENTOS *IN VIVO*

10.1. Inyección de células tumorales

Para llevar a cabo los ensayos de dilución límite, las células tumorales aisladas de WD-SCCs y PD/S-SCCs (deplecionadas de células hematopoyéticas y células endoteliales) se diluyeron de forma seriada en DMEM, se mezclaron con 1×10^6 fibroblastos de la dermis de ratones neonatos, y se inyectaron subcutáneamente en ratones nude (Harlan Laboratories). El crecimiento tumoral se monitorizó durante 8 a 12 semanas. La frecuencia de las células iniciadoras del tumor se calculó utilizando el software ELDA (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda>).

Para determinar el efecto de la inhibición de la expresión de PDGFR α , CXCR4 y CXCR7 en el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis, se inyectaron de forma subcutánea en ratones inmunodeficientes 4×10^3 células PD/S sh-control, sh-PDGFR α , sh-CXCR4 o sh-CXCR7. Las inyecciones de las células sh-PDGFR α se realizaron mezclando estas células con fibroblastos de la dermis de ratones neonatos, como se ha descrito anteriormente. En el caso de las inyecciones de las células sh-CXCR4 y sh-CXCR7, la suspensión de células fue mezclada con un volumen igual de matrigel (*Growth Factor-Reduced*, BD Biosciences).

Los tumores se reseccionaron cuando alcanzaron un tamaño crítico, y los ratones fueron sacrificados 20 días más tarde. Se analizó macroscópicamente la presencia de metástasis en diferentes tejidos y se recuperaron los pulmones, los cuales fueron incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina/eosina para cuantificar el desarrollo de lesiones metastásicas microscópicas.

10.2. Tratamientos *in vivo*

Para llevar a cabo la inhibición farmacológica de FGFR1 y PDGFR α , se implantaron ortotópicamente PD/S-SCC. Cuando los tumores comenzaron a crecer, se distribuyeron de forma aleatoria los ratones en el grupo control y en el grupo para ser tratados con inhibidor.

Los tratamientos con Imatinib (LC Laboratories) se realizaron con sonda oral diariamente. Para ello, el Imatinib fue diluido en agua y administrado a una concentración de 150 mg/kg. Los tratamientos con PD173074 (LC Laboratories) se realizaron diariamente mediante inyección intraperitoneal. El inhibidor fue diluido en ácido láctico (50 nmol/L) y se administró a una concentración de 25 mg/Kg. Los grupos control fueron tratados con el vehículo respectivo.

Los OT-SCCs generados fueron reseccionados quirúrgicamente al mismo tiempo y los ratones reseccionados se siguieron tratando con su respectiva solución control o de inhibidor hasta el

momento del sacrificio, 8-10 días después de la resección del tumor. Se recolectaron los pulmones y otros órganos para valorar el desarrollo de metástasis.

11. AMPLIFICACIÓN DE ARN Y ANÁLISIS DE MICROARRAYS

Para identificar genes que se expresaron diferencialmente entre L-CSCs y E-CSCs, se compararon los perfiles de expresión génica global de las poblaciones L-CSCs (células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ aisladas mediante citometría de flujo de cuatro PD/S-SCCs independientes) de tres linajes diferentes con las respectivas poblaciones de E-CSCs (células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ aisladas de sus respectivos WD-SCCs). Por otro lado, para identificar los genes que se expresaban diferencialmente entre los PD/S-SCCs y los WD-SCCs, se compararon los perfiles de expresión génica global de tres linajes diferentes de PD/S-SCCs con los respectivos WD-SCCs.

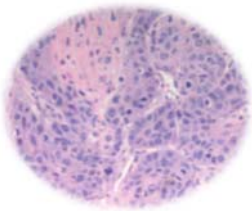
Para ello, se extrajo el ARN, de tumores y de células sorteadas (E-CSCs y L-CSCs), utilizando Trizol y el kit RNeasy Mini Kit (Quiagen). La amplificación del ADNc procedente de las muestras de las células sorteadas se realizó mediante picoprofiling como se describió anteriormente (Coussens et al. 1996). El ADNc se purificó usando columnas de limpieza GeneElute PCR (Sigma Aldrich). La transcripción inversa se realizó como se ha descrito previamente (sección 9.1). Se utilizaron 7 μ g de cDNA para la hibridación en arrays Affymetrix Mouse Genoma 430PM.

Los valores de expresión para todas las sondas se calcularon utilizando el algoritmo RMA implementado en el paquete affy de Bioconductor, escrito en el lenguaje estadístico R (Gautier et al. 2004). Los genes expresados diferencialmente en los PD/S-SCCs así como en las L-CSCs de todos los linajes se detectaron usando la prueba empírica Bayes (eBayes) ajustado a *t*-test, con el paquete Limma. Las pruebas múltiples fueron corregidas por el método *Benjamini-Hochberg false discovery rate* (FDR).

Los genes expresados diferencialmente se definieron como aquellos que exhiben un cambio de al menos dos veces y que tienen un FDR *P*-value <5%. Para identificar los procesos biológicos que estaban inducidos o atenuados por los genes expresados diferencialmente, se realizaron tests hipergeométricos. Para asociar la Ontología del Gen (GO) a los genes se utilizó el paquete GOSTats (Falcon & Gentleman 2007).

La agrupación jerárquica del perfil de expresión se realizó utilizando la distancia Euclídea y el método de Ward de varianza mínima se utilizó como método de aglomeración.

Resultados



1. IMPACTO DEL ORIGEN DE LAS SCs EPIDÉRMICAS EN EL DESARROLLO DE PD/S-SCCs Y EN PROGRESIÓN TUMORAL

Estudios previos realizados por nuestro grupo (da Silva-Diz et al. 2013) y por otros laboratorios (Lapouge et al. 2011; White et al. 2011) demostraron que mutaciones que alteran el control de la proliferación y/o diferenciación de las SCs que residen en la epidermis interfolicular (IFE) y el bulge de los folículos pilosos, dan lugar al desarrollo de SCCs en la piel de ratones. Estas observaciones indican que ambas poblaciones de SCs pueden ser el origen celular de estos tumores. Además, nuestros estudios demostraron que los WD-SCCs con características de diferenciación epitelial, progresan a SCCs indiferenciados (PD-SCCs), los cuales presentan un crecimiento mucho más agresivo y una mayor capacidad metastásica (Anexo). Sin embargo, al inicio de esta tesis se desconocía si el origen y la localización de las SCs, ya fuera en la IFE o en los folículos, podía promover la progresión de los SCCs, y en definitiva, el desarrollo de PD-SCCs.

Con el objetivo de analizar esta hipótesis, utilizamos ratones K14-HPV16, los cuales sobreexpresan las oncoproteínas E6 y E7 del papilomavirus humano HPV16 en los queratinocitos basales, incluyendo las SCs de la IFE y de los folículos. Estos ratones desarrollan hiperplasias y displasias en la piel durante los primeros meses de vida, y SCCs un año después del nacimiento, los cuales mostraron ser WD-SCCs y PD-SCCs. Estudios previos demostraron que las SCs de la IFE pueden ser identificadas mediante la expresión de K14 (Mascre et al. 2012), mientras que las SCs del bulge se caracterizan por expresar LGR5, K15 y CD34, entre otros marcadores (Lyle et al. 1998; Trempus et al. 2003; Jaks et al. 2008). Para analizar la implicación de ambas poblaciones de SCs en el desarrollo de estos tumores, se cruzaron ratones K14-HPV16 (Tg⁺) con: i) ratones K14Cre^{ER}/Rosa26^{LSL}YFP, generando los ratones K14-HPV16/K14Cre^{ER}/Rosa26^{LSL}YFP (E6/E7-K14CreYFP), que permiten trazar las SCs de la IFE y su progenie; y ii) con ratones Lgr5Cre^{ER}/Rosa26^{LSL}YFP y Lgr5Cre^{ER}/Rosa26^{LSL}LacZ, generando los E6/E7-Lgr5CreYFP y los E6/E7-Lgr5CreLacZ respectivamente, para trazar las LGR5⁺-SCs de los folículos y su progenie.

Aunque el promotor de K14 es activo tanto en los queratinocitos de la IFE como en los localizados en los folículos, su actividad es mayor en las células de la IFE (da Silva-Diz et al. 2013). Con el fin de trazar exclusivamente las SCs de la IFE, los ratones E6/E7-K14CreYFP fueron tratados con una baja dosis de tamoxifeno (1 mg), 21 días después del nacimiento. Ocho semanas después del nacimiento, se analizó la presencia y localización de células YFP⁺ en la piel de ratones con sobreexpresión de E6/E7 (E6/E7 Tg⁺), así como en la de sus hermanos de camada wild-type (E6/E7+/+). De acuerdo con lo descrito previamente, los E6/E7+/+ presentaban un reducido porcentaje de células YFP⁺ en la capa basal de la IFE, mientras que la expresión de YFP fue indetectable en la mayoría de las células de los folículos (Figura 15A). Sin embargo, el número de

células YFP⁺ incrementó de forma clara en la IFE de los E6/E7 Tg/+ (Figura 15B). Dado que la sobreexpresión de estas oncoproteínas induce la proliferación de las células de la IFE (da Silva et al., 2013), es probable que el aumento de células YFP⁺ observado en la IFE se deba a una expansión de la población de SCs localizadas en esta región de la epidermis.

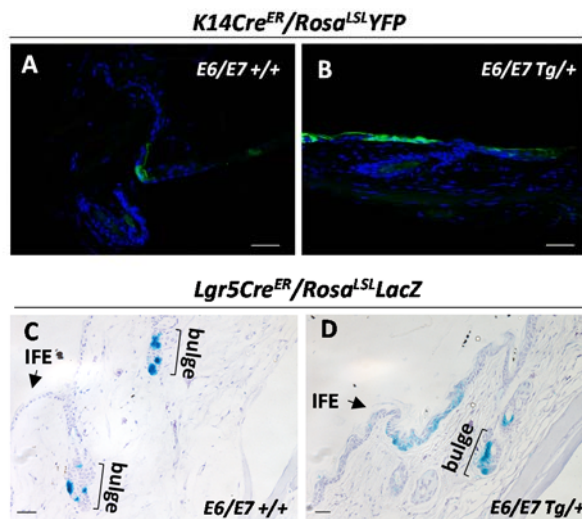


Figura 15. Validación de los modelos E6/E7-K14CreYFP y E6/E7-Lgr5CreYFP/LacZ para trazar el linaje de las SCs de la IFE y de los folículos. Imágenes representativas de secciones de piel de ratones E6/E7 +/+ y E6/E7 Tg/+ de los modelos E6/E7-K14CreYFP y E6/E7-Lgr5CreYFP/LacZ. **A y B)** Identificación de células YFP⁺ en la IFE de ratones E6/E7-K14CreYFP, mediante fluorescencia directa. Los núcleos se tiñeron con DAPI. **C y D)** Identificación de las LGR5⁺-SCs y su progenie localizadas en el bulge de los folículos en los ratones E6/E7 +/+ (**C**) y en la IFE y en el bulge en los ratones E6/E7 Tg/+ (**D**), identificadas mediante tinción con X-Gal. Los núcleos se tiñeron con hematoxilina. Barra de escala 40 μ m.

Por otra parte, con el fin de trazar el linaje de las LGR5⁺-SCs, los ratones E6/E7-Lgr5CreYFP y los E6/E7-Lgr5CreLacZ, tanto los que sobreexpresaban las oncoproteínas virales como los ratones E6/E7 +/+, fueron tratados con 3 mg de tamoxifeno a los 21 días de edad. El análisis de la piel de estos ratones (8 semanas de edad) mostró que únicamente algunas células del bulge eran YFP⁺ o LacZ⁺ en los ratones E6/E7 +/+ (Figura 15C), demostrando que la localización de esta población de SCs y su progenie se restringía al folículo. Sin embargo, la sobreexpresión de E6/E7 promovía la proliferación de las LGR5⁺-SCs, dando lugar a una expansión y acumulación de esta población y su progenie en el folículo. De acuerdo con nuestros estudios previos observamos que una parte de esta población de células YFP⁺ se movilizaba a la IFE (Figura 15D), donde esta población de células aberrantes contribuían al desarrollo de SCCs (da Silva-Diz et al. 2013).

Aunque la expresión de E6/E7 induce el desarrollo de SCCs espontáneos en la piel, para acelerar el desarrollo tumoral se llevó a cabo un tratamiento de carcinogénesis química mediante la administración de DMBA-TPA en la piel del ratón. Al final del tratamiento, se extrajeron los tumores generados en cada modelo y diferentes fragmentos de estos tumores fueron utilizados para: i) determinar su grado histológico, y concretamente el de los clones celulares YFP⁺ o LacZ⁺, y evaluar

si el origen de los WD-SCCs y PD/S-SCCs primarios podría asociarse a un tipo de SCs concreto; y ii) para analizar mediante citometría de flujo la presencia de CSCs $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ entre las células tumorales YFP⁺ derivadas de las SCs de la IFE y/o de las LGR5⁺-SCs del folículo piloso.

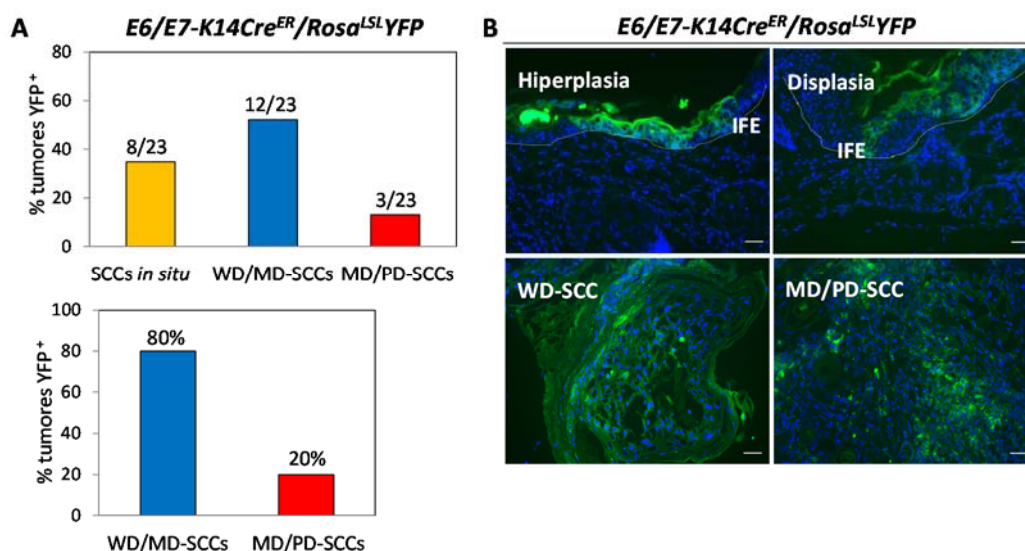


Figura 16. Las SCs de la IFE y su progenie contribuyen al desarrollo de WD-SCCs y PD-SCCs. A) Los resultados indican el porcentaje de las lesiones indicadas conteniendo células YFP⁺ en ratones E6/E7-K14CreYFP. **B)** Imágenes representativas de diferentes lesiones preneoplásicas, WD-SCCs y MD/PD-SCCs que presentan células YFP⁺. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra de escala 40 μ m.

Sin embargo, diferentes problemas nos han impedido desarrollar plenamente estos estudios. Por una parte, el tratamiento de carcinogénesis química potenció en gran medida el desarrollo de lesiones y la mayor parte de los ratones con sobreexpresión de E6/E7 tuvieron que ser sacrificados por razones éticas inmediatamente después de finalizar el tratamiento. El análisis histológico de estas lesiones mostró que la mayoría eran lesiones preneoplásicas (displasias y papilomas) y SCCs *in situ* (62,5% en E6/E7-K14CreYFP y 69,6% en los E6/E7-Lgr5CreYFP/LacZ). Por otro lado, debido a que se aplicaron bajas dosis de tamoxifeno para inducir un marcaje clonal de las SCs, el número de SCCs presentando focos YFP⁺ o LacZ⁺ resultó ser reducido (16% en E6/E7-K14CreYFP y 14% en E6/E7-Lgr5CreYFP/LacZ). Además, estas lesiones presentaban un bajo número de células YFP⁺, las cuales fueron insuficientes para determinar de forma clara si estas células expresaban CD34 u otros marcadores de progresión tumoral mediante citometría de flujo.

Sin embargo, el análisis histológico de los tumores generados permitió determinar de forma clara el estadio de progresión de los SCCs con marcaje YFP⁺/LacZ⁺ en los diferentes modelos de ratón. Nuestros análisis mostraron que la mayoría de los SCCs conteniendo células YFP⁺/LacZ⁺ eran SCCs *in situ* y WD-SCCs, tanto en los ratones E6/E7-K14CreYFP (86,95% de SCCs; Figura 16A) como en los E6/E7-Lgr5CreYFP/LacZ (76% de SCCs; Figura 17A). Si consideramos únicamente las lesiones invasivas, observamos que la frecuencia de WD-SCCs generados a partir de las SCs de la

IFE (80% de tumores conteniendo células YFP⁺) fue mayor que la frecuencia de MD/PD-SCCs (20% de tumores conteniendo células YFP⁺) en los ratones E6/E7-K14CreYFP (Figura 16).

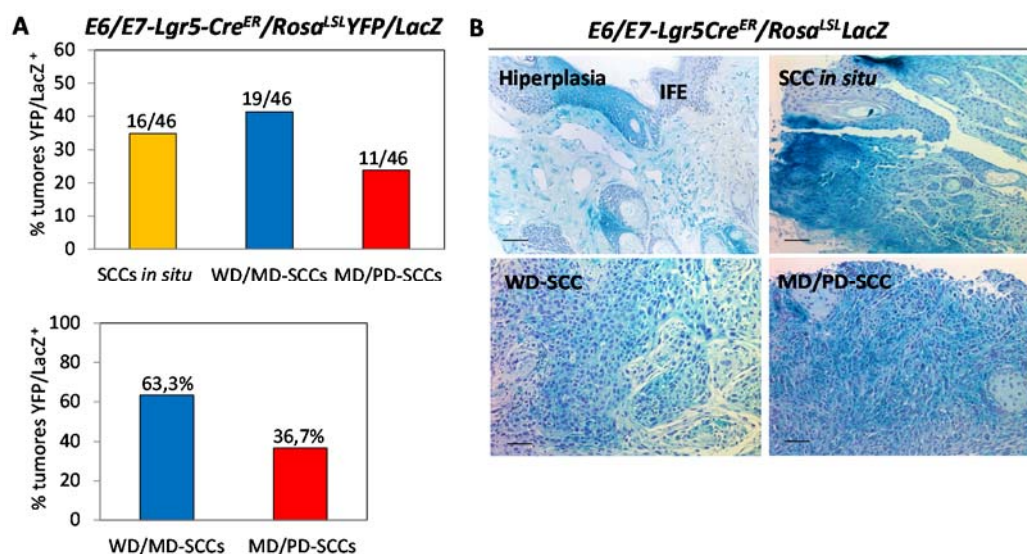


Figura 17. Las LGR5⁺-SCs de los folículos y su progenie contribuyen al desarrollo de WD-SCCs y PD-SCCs. **A)** Porcentaje de las lesiones indicadas conteniendo células YFP⁺/LacZ⁺ en ratones E6/E7-Lgr5CreYFP y E6/E7-Lgr5CreLacZ. **B)** Imágenes representativas de lesiones preneoplásicas y de tumores a diferentes estadios de progresión que presentan células LacZ⁺. Los núcleos se tiñeron con hematoxilina. Barra de escala 40 μm.

El análisis de los SCCs generados en los ratones E6/E7-Lgr5CreYFP/LacZ mostró que, aunque en este caso se generaron más WD-SCCs que MD/PD-SCCs (63,3% vs 36,7%), la frecuencia de MD/PD-SCCs desarrollados a partir de las LGR5⁺-SCs (tumores conteniendo células YFP⁺/LacZ⁺) fue superior a los que se generaban a partir de SCs de la IFE (Figura 17). Estos resultados indican que los PD-SCCs se pueden generar tanto a partir de las SCs de la IFE y su progenie como de las SCs que residen en los folículos. Dado que el porcentaje de MD/PD-SCCs generados a partir de las LGR5⁺-SCs fue ligeramente superior al de los generados a partir de las SCs de la IFE, nuestros resultados sugieren que la progresión de WD-SCCs a PD-SCCs podría estar potenciándose cuando las SCs foliculares son el origen de estas lesiones.

2. ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES Y FUNCIONALES DE LAS CSCs DURANTE LA PROGRESIÓN DE LOS SCCs DE PIEL

Con el objetivo de estudiar si las diferencias observadas en el crecimiento y en el desarrollo de metástasis entre los WD-SCCs y PD/S-SCCs podían deberse a cambios en el contenido y en las características de las CSCs, nuestro laboratorio generó diferentes modelos de progresión de SCCs de piel. Para ello, se implantaron diferentes muestras de SCCs de piel, desarrolladas en ratones K14-HPV16 espontáneamente o tras el tratamiento con DMBA-TPA, en la piel de ratones inmunodeficientes. Cuando estos tumores ortotópicos (OT-SCCs) crecieron, fueron reseccionados y

trasplantados de forma seriada en ratones atímicos, permitiendo el crecimiento ilimitado de los tumores y la generación de diferentes linajes tumorales. Aunque tras el primer implante los OT-SCCs conservaban las características histopatológicas de los tumores primarios, después de varios trasplantes (ver Anexo) el 62,5% de los WD-SCCs progresaron a carcinomas moderadamente diferenciados (MD-SCCs), y finalmente a PD-SCCs. Estos últimos tumores presentaban patrones de expresión de queratinas diferentes a sus precursores WD-SCCs y frecuentemente contenían regiones formadas por células con morfología fusocelular. Los SCCs de los diferentes linajes se clasificaron como WD-SCCs o PD/fusocelulares (PD/S-SCC) en base a la expresión de queratinas y sus características histopatológicas (ver Anexo).

Además, nuestros estudios previos demostraron que los tumores PD/S crecían significativamente más rápido y desarrollaban más metástasis en un menor tiempo de latencia que sus precursores WD-SCCs. Estas lesiones metastásicas se producían generalmente en pulmón, pero también se detectaron, aunque con menor frecuencia, en nódulos linfáticos, hígado o riñón (ver Anexo). Por lo tanto, estos resultados demostraban que los tumores PD/S se generaban como consecuencia de la progresión de los WD-SCCs, y nuestros linajes constituían unos modelos excelentes para evaluar los posibles cambios en la frecuencia y características de las CSCs durante la progresión tumoral.

2.1. Análisis de la frecuencia de CSCs y de la inducción del programa de EMT durante la progresión de SCCs de piel

Para evaluar si durante la progresión de los SCCs se producían cambios en la población de las CSCs, coincidiendo con un crecimiento tumoral más agresivo y una mayor capacidad metastásica, inicialmente cuantificamos la frecuencia de CSCs o células iniciadoras de tumores (TICs) mediante ensayos de dilución límite. Para ello, se inyectaron en diferentes ratones inmunodeficientes varias diluciones de células tumorales (deplecionadas de células endoteliales y células de linaje hematopoyético) aisladas de tumores WD y PD/S de dos linajes tumorales diferentes. Nuestros resultados demostraron que la frecuencia de TICs se incrementaba de forma dramática en los tumores PD/S en comparación con sus precursores WD-SCCs (Figura 18A). Además, observamos que mientras que los tumores generados a partir de las células aisladas de WD-SCCs conservaban características de diferenciación epitelial, el implante de células aisladas de PD/S-SCCs generó tumores indiferenciados y con morfología mesenquimal (Figura 18B). Estos resultados indican que las TICs de los PD/S-SCCs pierden la capacidad de diferenciarse, a diferencia de las TICs de los WD-SCCs.

Nuestros estudios previos demostraron que, similarmente a lo descrito en otros modelos de ratón de SCC de piel (Malanchi et al. 2008; Lapouge et al. 2012), las células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ aisladas de los WD-SCCs presentaban una mayor capacidad iniciadora de tumores que las células tumorales $\alpha 6$ -

integrina⁺/CD34⁺, demostrándose que estos marcadores permitían identificar poblaciones enriquecidas en CSCs en los SCCs ortotópicos de estadios tempranos (ver Anexo). Además, los tumores generados a partir de las células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ de los PD/S-SCCs crecieron significativamente más rápido que aquellos generados por $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ aisladas de WD-SCCs, indicando que la habilidad de las CD34⁺-CSCs para promover el crecimiento tumoral cambiaba significativamente durante la progresión. Sin embargo, tanto las células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ como las $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁻ de los PD/S-SCCs presentaron una capacidad similar para generar tumores (ver Anexo).

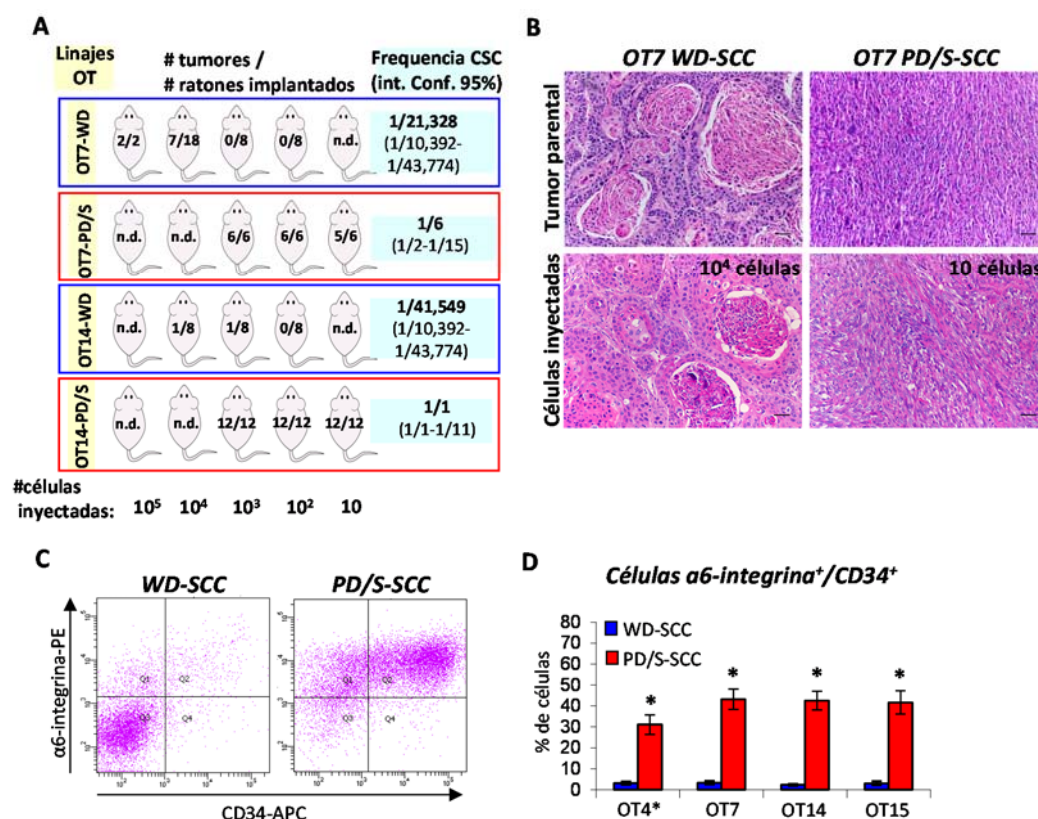


Figura 18. Expansión de la población de células iniciadoras de tumores/CSCs durante la progresión de los SCCs de piel. **A)** Se inyectaron diluciones seriadas de células tumorales aisladas de WD-SCCs y PD/S-SCCs de los linajes indicados (OT) en ratones inmunodeficientes (6-18 ratones por dilución). Los resultados muestran el número de ratones que desarrollaron tumores, frecuencia de CSCs e intervalos de confianza (int. conf.) para cada condición. (nd, no determinado). **B)** Imágenes representativas que muestran las características histopatológicas de los tumores parentales y regenerados después de la inyección del número indicado de células tumorales. Barra de escala, 30 μ m. **C y D)** Imágenes representativas (**C**) y cuantificación mediante citometría de flujo del porcentaje de células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ (media $\pm$ SE) (**D**) en OT WD-SCCs y PD/S-SCCs. OT4* linaje de SCC derivado de un tumor desarrollado espontáneamente en K14-HPV16, mientras que los demás linajes se generaron a partir de tumores inducidos mediante DMBA-TPA en K14-HPV16.

Dado que otros laboratorios demostraron que únicamente las células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ presentan capacidad de auto-renovación a largo plazo (Lapouge et al. 2012), nosotros comparamos mediante citometría de flujo el porcentaje de células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ presentes en los PD/S-SCCs y en sus respectivos precursores WD-SCCs de cada linaje tumoral. Los resultados mostraron que los

tumores PD/S presentaban un incremento dramático del contenido de CD34⁺-CSCs comparado con los WD (Figuras 18C y 18D). Así mismo, los PD/S-SCCs primarios, generados en los ratones K14-HPV16, mostraron una fuerte expansión de esta población de CSCs, comparada con los WD-SCCs primarios (ver Anexo). Además, mediante ensayos de qRT-PCR e inmunohistoquímica analizamos la expresión de otros marcadores de SCs epidérmicas. Observamos que la expresión de *Cd34*, *Hmng3*, *Sox4* y *Lrig*, así como la de los factores de transcripción embrionarios *Sox2* y *Nanog* se inducía en los PD/S-SCCs, mientras que la expresión de marcadores como *Cdh3* (P-Cadherina), *Sox9*, *Lgr5* o *Lgr6*, disminuían drásticamente en los PD/S-SCCs (Figuras 19A y 19B).

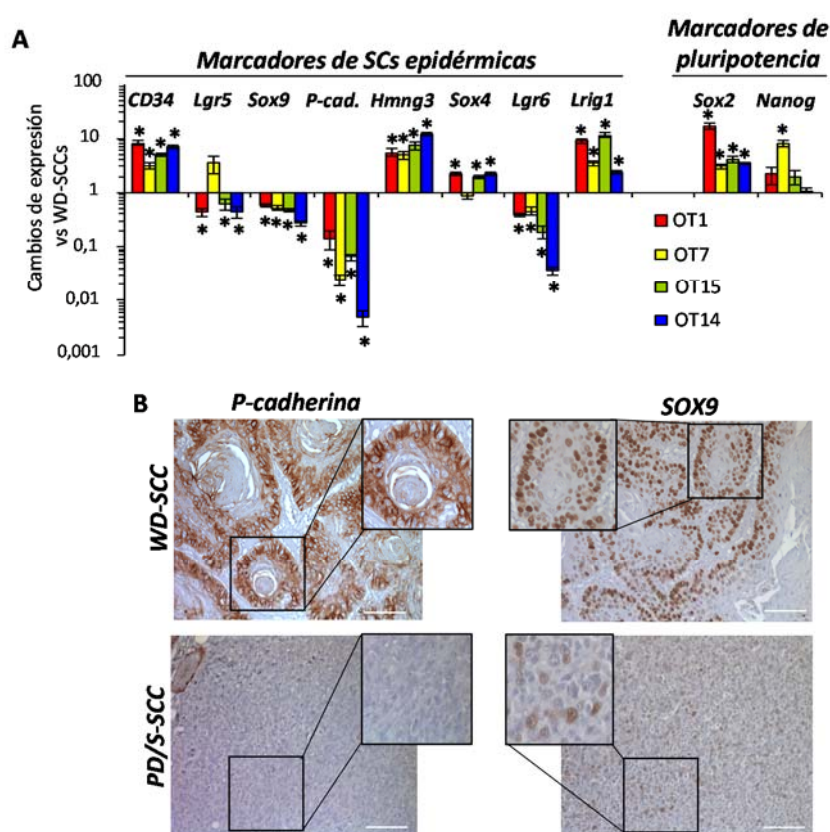


Figura 19. Análisis de la expresión de marcadores de células madre y marcadores de pluripotencia en SCCs de diferentes estadios de progresión. A) Niveles de ARN (media $\pm$ SE) de los marcadores de células madre indicados en PD/S-SCCs relativos a WD/SCCs en diferentes linajes tumorales (6-8 muestras por grupo). * indica diferencias significativas entre los grupos comparados (t-test, $p < 0,05$). **B)** Imágenes representativas de la detección de P-cadherina y SOX9 en secciones de WD-SCCs y PD/S-SCCs (linaje OT14) mediante ensayos de inmunohistoquímica. Barra de escala 50 μ m.

El análisis de citometría de flujo de estas muestras mostró que, mientras que alrededor del 80% de las CD34⁺-CSCs de los WD-SCCs expresaban el marcador epitelial EpCAM, el porcentaje de células EpCAM⁺ se reducía de forma significativa en los tumores PD/S, y más concretamente en su población de CD34⁺-CSCs (Figuras 20A y 20B), sugiriendo que las características de las CSCs cambian durante la progresión tumoral.

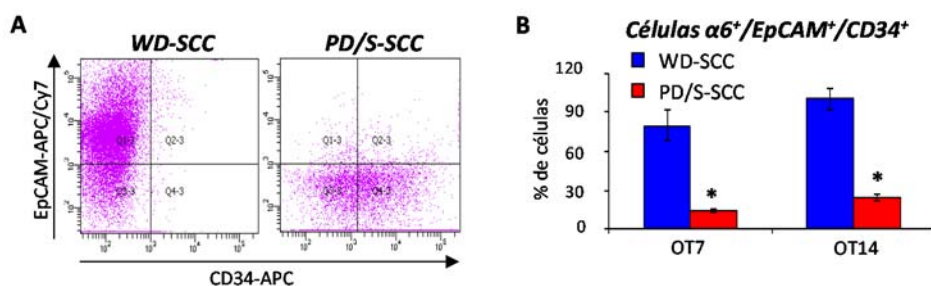


Figura 20. La expresión de EpCAM se reduce significativamente en los PD/S-SCCs. **A)** Imágenes representativas de la cuantificación de las $CD34^{+}$ -CSCs que expresan EpCAM en los WD-SCCs y PD/S-SCCs mediante citometría de flujo. **B)** Los resultados indican el porcentaje de células $\alpha 6^{+}/EpCAM^{+}/CD34^{+}$ (media $\pm$ SE) en los WD-SCCs y los PD / S-SCCs de los linajes indicados. (6-8 tumores por grupo). * indica diferencias significativas entre los grupos comparados (t-test, $p < 0,05$).

Coincidiendo con la pérdida de características epiteliales y la aparición de características mesenquimales, observamos que la expresión de marcadores de EMT se inducía en los PD/S-SCCs de diferentes linajes tumorales, así como en PD/S-SCCs primarios desarrollados en los ratones K14-HPV16.

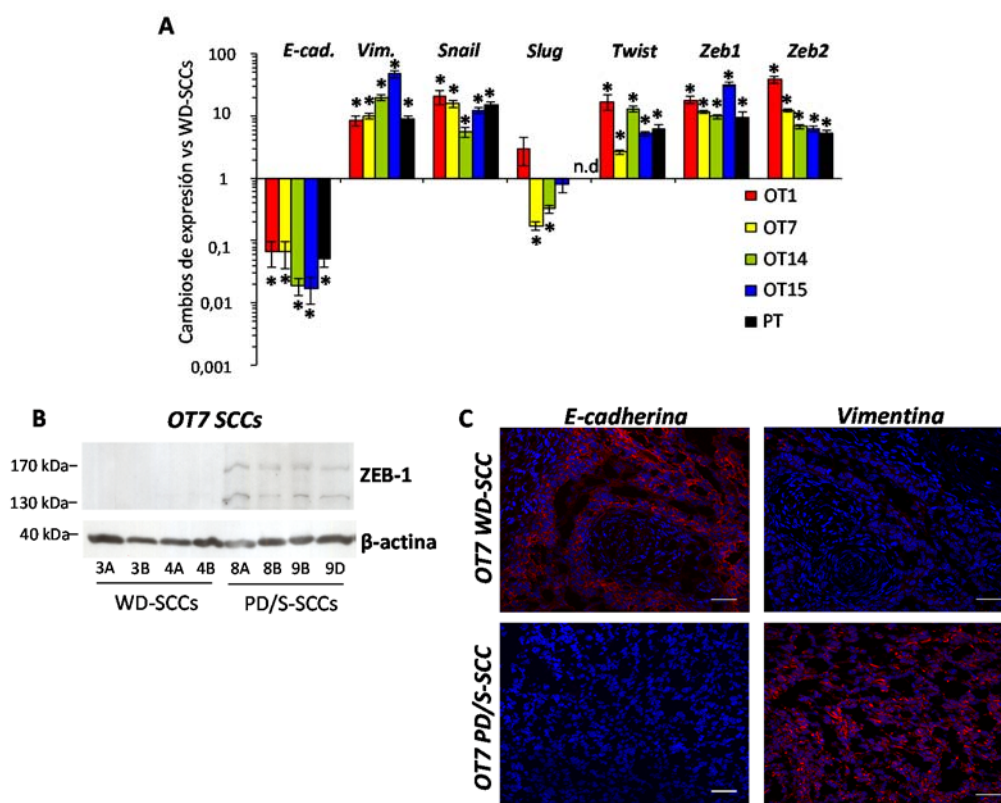


Figura 21. Los PD/S-SCCs presentan una fuerte inducción del programa EMT. **A)** Resultados de qRT-PCR que muestran los niveles de ARN (media $\pm$ SE) de los genes indicados en los PD/S-SCCs relativos a los WD-SCCs (6 muestras por grupo) de diferentes linajes de progresión y en SCCs primarios (PT) desarrollados espontáneamente en ratones K14-HPV16 (4 muestras por grupo). * indica diferencias significativas entre WD-SCCs y PD/S-SCCs (t-test, $p < 0,05$). **B)** Niveles de proteína ZEB-1 en WD-SCCs y PD/S-SCCs. β -actina se utilizó como control de carga de proteínas. El número de muestra identifica el pase del tumor y las letras indican muestras tumorales independientes de un mismo pase. **C)** Imágenes representativas de la inmunodetección de células que expresan E-cadherina y Vimentina en WD-SCCs y PD/S-SCCs. Barra de escala, 30 μ m.

Concretamente, en los tumores de estadios más avanzados se producía un aumento significativo de la expresión de factores de transcripción que inducen EMT, tales como *Snail*, *Twist*, *Zeb1* y *Zeb2* (Figuras 21A y 21B), así como un aumento de expresión de *Vimentina* y una drástica disminución de la expresión de *Cdh1* (E-cadherina) (Figuras 21A y 21C).

Es importante destacar que los WD-SCCs ortotópicos que nunca progresaron a PD-SCCs no mostraron una expansión de la población de CSCs ni una inducción del programa EMT (Figura 22), indicando que estos cambios no se producen como consecuencia del trasplante seriado de estos tumores en ratones inmunodeficientes.

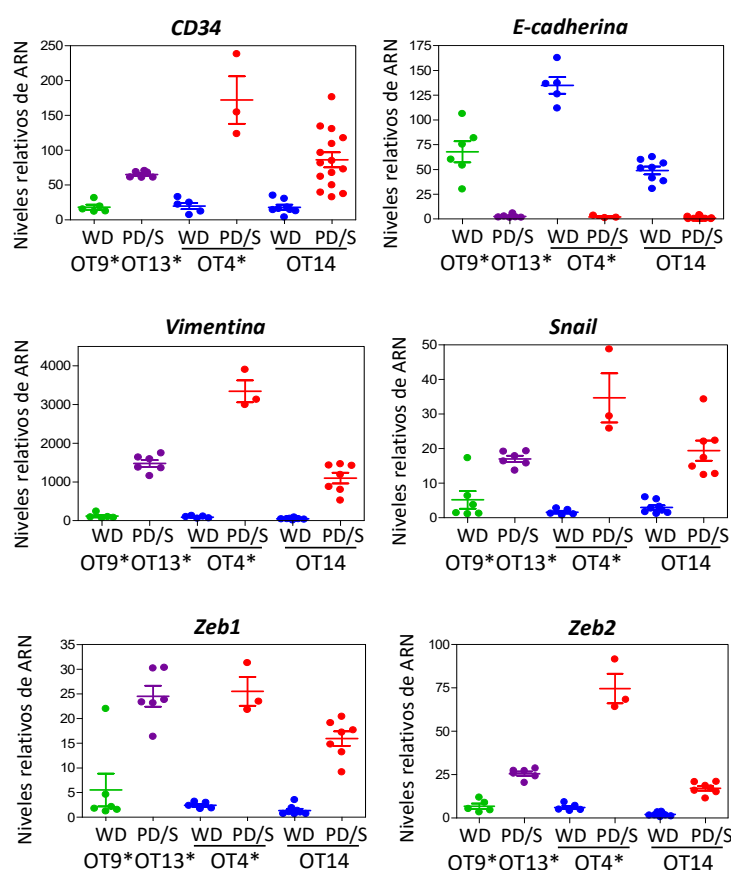


Figura 22. Análisis de la expresión de CD34 y marcadores de EMT en diferentes linajes tumorales. Cuantificación de los ARN (media $\pm$ SE) de los genes indicados relativo a la expresión de *Gapdh* en tumores WD-SCCs y PD/S-SCCs generados a partir de un tumor espontáneo (OT4) y un tumor inducido por DMBA/TPA (OT14). Se incluyen muestras de tumores de pases tardíos de un linaje generado a partir de un WD-SCC que nunca progresó (OT9) y de un linaje generado a partir de un PD/S-SCC (OT13). * Indica que los tumores de origen de estos linajes fueron generados espontáneamente.

Todos estos resultados demuestran que los SCCs avanzados presentan un fuerte enriquecimiento de CSCs y una robusta inducción del programa de EMT, coincidiendo con el crecimiento agresivo y la mayor capacidad metastásica de estos tumores.

2.2. Las características de las CSCs cambian durante la progresión de los SCCs de piel

Para determinar los cambios en las características de las CSCs durante la progresión de los SCCs, se aislaron las CSCs $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ de diferentes tumores PD/S (Late CSCs; L-CSCs) y de sus precursores WD (Early CSCs; E-CSCs) de tres linajes tumorales, y se compararon los perfiles de expresión génica global entre ambas poblaciones celulares mediante ensayos de arrays de expresión en plataformas Affimetrix. Este análisis nos reveló que 1.839 genes estaban diferencialmente expresados en las L-CSCs respecto a las E-CSCs, y nos permitió definir una firma génica para las CSCs de los SCCs mesenquimales y metastásicos (Figura 23A). Esta firma génica se caracteriza principalmente por la sobreexpresión de genes asociados con proliferación, morfogénesis, regulación negativa de la apoptosis, organización del citoesqueleto, motilidad celular y desarrollo de metástasis, y por la disminución de la expresión de genes relacionados con la diferenciación celular, el mantenimiento de las uniones entre células y la adhesión celular (Figuras 23B y 23C).

La validación de estos resultados mediante qRT-PCR demostró que la expresión de marcadores de SCs, tales como *Sox2*, *Hmgn3* y *Gas1* estaba incrementada en las L-CSCs, mientras que la expresión de genes como P-cadherina (*Cdh3*) estaba disminuida en estas células comparada con las E-CSCs. Asimismo, comprobamos que se producía una reducción de la expresión de E-cadherina y una inducción de la expresión de *Vimentina*, *Twist* y *Axl* en las L-CSCs (Figura 23D). Estos resultados indican que las L-CSCs presentan una fuerte inducción del programa de EMT comparado con las E-CSCs. La sobreexpresión de genes que promueven la auto-renovación y la disminución de la expresión de genes asociados con diferenciación epitelial (*p63*, *K14* e *In1*) (Figura 23D), junto con la reducida capacidad de diferenciación que mostraron las L-CSCs cuando eran inyectadas en ratones inmunodeficientes (Figura 18B), indican que la expansión de las L-CSCs podría estar provocada por un aumento en la tasa de auto-renovación y un bloqueo del programa de diferenciación de estas células.

Además, la comparación de la firma génica de las L-CSCs con datos publicados en la bibliografía, indicó que algunos de los genes que aparecen en esta firma también estaban desregulados en PD/S-SCCs generados en otros modelos de ratón de SCCs de piel, coincidiendo con las características mesenquimales que mostraban estos tumores (Wong et al. 2013) (ver Anexo).

Por otra parte, nuestros resultados indicaban que la expresión de factores clave de las vías de señalización de WNT, FGFR, PDGFR y EGFR estaban alterados en las L-CSCs (Figura 23B). Estos resultados sugerían que la alteración de estas vías podría promover la expansión de las CSCs, el crecimiento agresivo y/o la mayor capacidad metastásica asociada a los PD/S-SCCs.

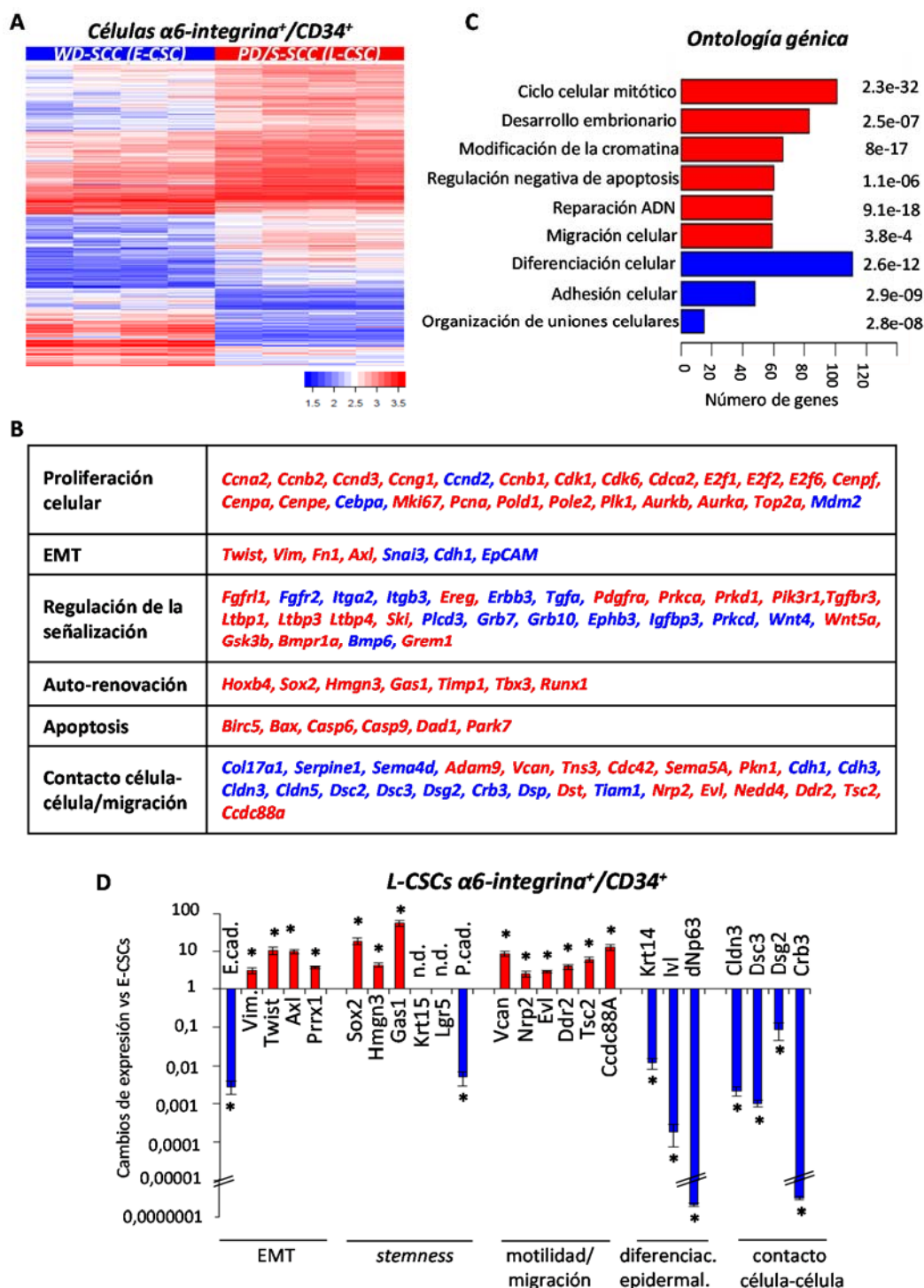


Figura 23. La firma génica de las CSCs cambia durante la progresión de los SCCs. **A)** Representación jerárquica de los genes expresados diferencialmente ($\log_2 FC \geq 1$, $FDR P < 0.05$) entre las CSC $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ de los PD/S-SCCs (L-CSC) y sus respectivos precursores WD-SCCs (E-CSC) de tres linajes tumorales diferentes. **B)** Selección de genes sobreexpresados (rojo) o con expresión disminuida (azul) en las L-CSCs respecto a las E-CSCs. **C)** Análisis de la ontología de los genes diferencialmente expresados en L-CSCs comparados con E-CSCs. **D)** Los resultados (media $\pm$ SE) indican el número de veces que cambia los niveles de ARN de los genes indicados en L-CSCs respecto a las E-CSCs (tres muestras por grupo). Los valores de expresión se relativizaron a la expresión de *Gapdh*. (n.d.) la expresión de estos genes no se detectó en E-CSCs o L-CSCs. * indica diferencias significativas entre los grupos comparados (t-test; $p < 0,05$).

2.3. Caracterización de los cultivos primarios de células tumorales aisladas de WD-SCCs y PD/S-SCCs

Una de las estrategias que seguimos para determinar la relevancia de las vías de señalización identificadas en nuestros estudios, fue establecer cultivos primarios de células tumorales a partir de PD/S-SCCs (células PD/S) y de sus precursores WD-SCCs (células WD).

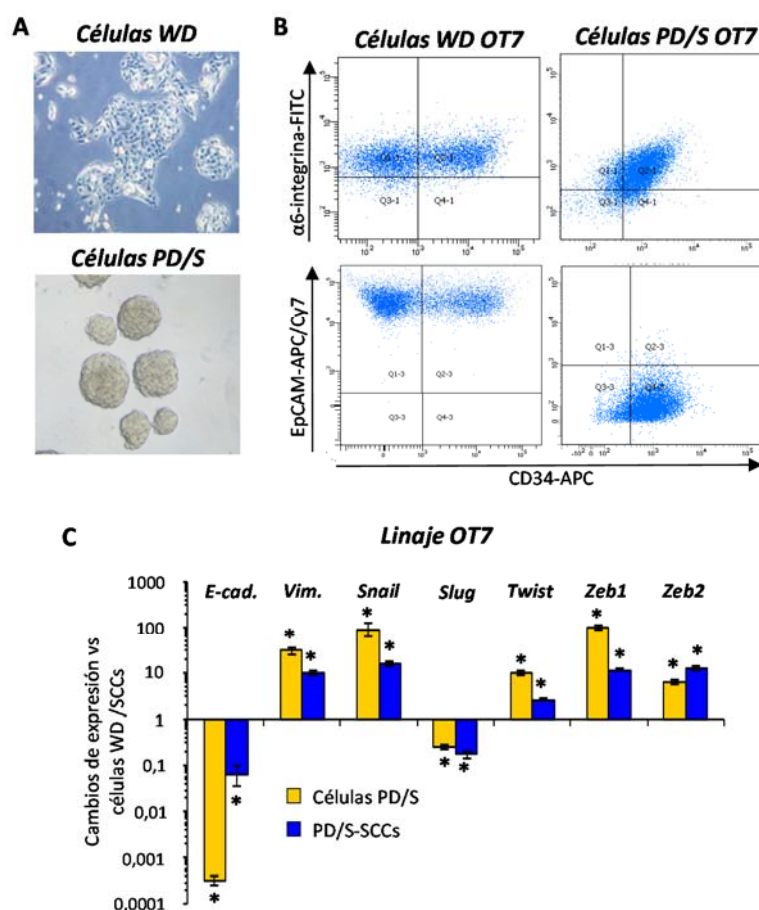


Figura 24. Los cultivos primarios de células WD y PD/S están enriquecidos en CSCs. **A)** Imágenes de células WD y PD/S creciendo *in vitro*. **B)** Análisis del enriquecimiento de células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ y EpCAM⁺/CD34⁺ en los cultivos de células WD y PD/S, realizado mediante citometría de flujo. **C)** Cuantificación del ARN (media $\pm$ SE) de los marcadores y factores inductores de EMT indicados en las células PD/S respecto a sus respectivos tumores de origen.

Las células WD crecían adheridas a la placa y presentaban un fenotipo epitelial típico, caracterizado por fuertes uniones célula-célula, mientras que las células PD/S crecían en suspensión, formando esferas (Figura 24A). El análisis de las células WD y PD/S mediante citometría de flujo demostró que bajo nuestras condiciones de cultivo, éstas estaban enriquecidas en CSCs $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺. Concretamente, más del 50% de las células WD expresaban estos marcadores de CSCs y conservaba la expresión de EpCAM, mientras que el 90% de las células PD/S eran CD34⁺-CSCs, las cuales perdían la expresión de EpCAM (Figura 24B). Además, mediante ensayos de qRT-PCR demostramos

que estas células en cultivo exhibían un perfil de expresión de factores inductores de EMT similar al de los tumores ortotópicos de origen (Figura 24C) y a las CSCs derivadas de éstos (datos no mostrados). Por lo tanto, estos resultados demostraban que esta población de células en cultivo recapitulaban las características de las E-CSCs y L-CSCs.

2.4. La vía de señalización de WNT/ β -catenina está atenuada en los SCCs de piel avanzados

Con el fin de determinar la relevancia de la actividad de la β -catenina durante la progresión de los SCCs, inicialmente analizamos la expresión de esta proteína, así como su localización celular en los PD/S-SCCs y en sus precursores WD-SCCs.

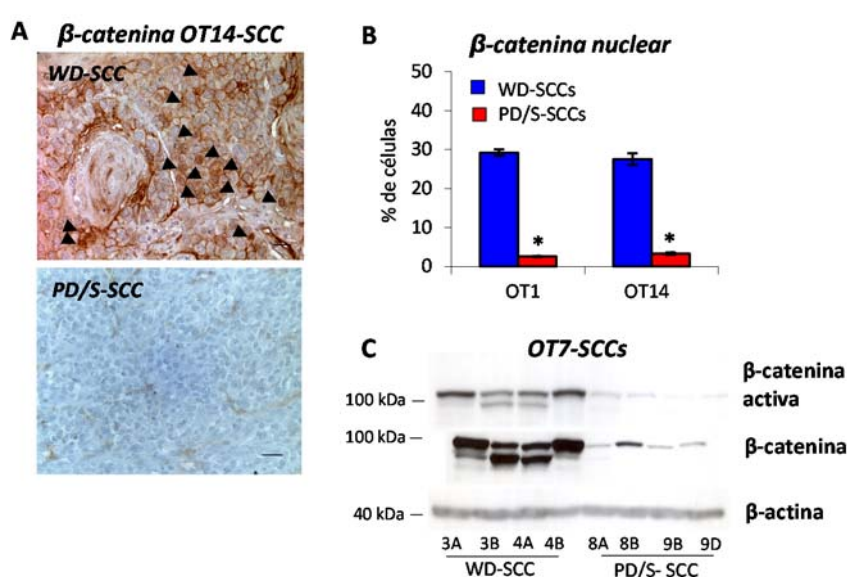


Figura 25. La vía de señalización de β -catenina se atenúa durante los últimos estadios de la progresión de los SCCs. **A)** Imágenes representativas de la expresión y localización de β -catenina en los tumores indicados, analizado mediante ensayos de inmunohistoquímica. Las flechas indican las células con localización nuclear de β -catenina (barra de escala, 30 μ m). **B)** Cuantificación de células con marcaje nuclear de β -catenina en WD-SCCs y PD/S-SCCs de los linajes indicados (media $\pm$ SE, 3 muestras por grupo). * indica diferencias significativas entre los grupos comparados (t-test; $p < 0,05$). **C)** Niveles de β -catenina y de su forma activa en WD-SCCs y PD/S-SCCs. El control de carga de proteínas utilizado fue β -actina. El número de la muestra identifica el pase del tumor y las letras indican las diferentes replicas tumorales de un mismo pase.

Mediante ensayos de inmunohistoquímica, comprobamos que la mayoría de las células epiteliales de los WD-SCCs mostraban un marcaje de β -catenina en la membrana, y alrededor del 25% de estas células presentaban β -catenina localizada en el núcleo (Figuras 25A y 25B). Además, detectamos la forma activa (Ser37/Thr41 no-fosforilada) de esta proteína mediante western blot (Figura 25C), indicando estos resultados que esta vía estaba activa en los estadios tempranos de progresión de los SCCs. Por el contrario, observamos una drástica disminución en la expresión de β -catenina y de su

forma activa en los PD/S-SCCs (Figuras 25A-25C), indicando que esta vía se atenúa durante la progresión tumoral.

Con el fin de corroborar estos resultados, analizamos la actividad transcripcional de β -catenina en WD-SCCs y PD/S-SCCs. Para ello, las células WD y PD/S fueron transducidas con un vector reportero que presenta 7 dominios de unión de la β -catenina, los cuales dirigen la expresión de EGFP. Las células transducidas con este vector podían además ser identificadas y aisladas por citometría de flujo mediante la expresión de la proteína fluorescente mCherry (Fuerer & Nusse 2010) (Figura 26A). Las células mCherry⁺ WD y PD/S fueron implantadas en ratones atímicos con el fin de regenerar WD-SCCs y PD/S-SCCs, respectivamente. El análisis de los tumores generados mostró que los WD-SCCs contenían una población de células EGFP⁺ localizadas mayoritariamente en la base de los nidos de estos tumores en contacto con el estroma, coincidiendo con la localización de las CD34⁺-CSCs descrita previamente (Malanchi et al. 2008; Beck et al. 2011; Schober & Fuchs 2011). La expresión de EGFP indicaba que estas células presentaban inducida la actividad transcripcional de β -catenina. Por el contrario, no se detectaron células EGFP⁺ en los PD/S-SCCs (Figura 26B).

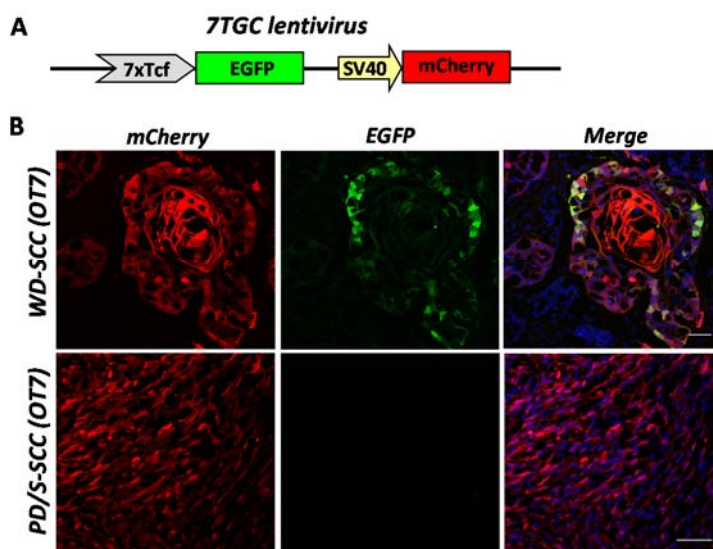


Figura 26. La actividad transcripcional de la β -catenina se atenúa durante progresión de los SCCs. A) Esquema del vector lentiviral utilizado para determinar la actividad transcripcional de la β -catenina. **B)** Imágenes representativas de secciones de WD-SCCs y PD/S-SCCs generados tras el trasplante de células transducidas con el vector reportero. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y la expresión de EGFP y de mCherry se visualizó mediante fluorescencia directa. Barra de escala, 30 μ m.

Estos resultados indican, que aunque la vía de señalización de β -catenina juega un papel importante en la generación y el crecimiento de SCCs en estadios tempranos de progresión (Malanchi et al. 2008), esta vía se atenúa en los PD/S-SCCs.

2.5. La activación autocrina y paracrina de la vía de EGFR promueve la proliferación y supervivencia de las E-CSCs

Estudios previos demostraron que la vía de EGFR es necesaria para mantener la proliferación y supervivencia de las células localizadas en el compartimento basal de los WD-SCCs de piel (Hansen et al. 2000; Sibilía et al. 2000). Dado que nuestros resultados de array indicaban que se producen alteraciones en la expresión de receptores de la familia de EGFR en las L-CSCs, decidimos analizar la relevancia de esta vía en la regulación de las CSCs de WD-SCCs y PD/S-SCCs. Para ello, inicialmente analizamos mediante qRT-PCR la expresión de los receptores *Egfr*, *ErbB2* y *ErbB3*, así como la expresión de sus ligandos *Tgfa*, *Areg* y *Hbegf* en las E-CSCs y L-CSCs aisladas de varios linajes de SCCs ortotópicos. Los resultados mostraron una importante reducción de la expresión tanto de los receptores como de los ligandos en las L-CSCs de la mayoría de los tumores analizados (Figura 27A). De acuerdo con estos resultados, observamos que la expresión de estos receptores y ligandos, claramente detectada en los WD-SCCs, se reducía de forma significativa en los PD/S-SCCs de diferentes linajes, así como en los SCCs avanzados desarrollados espontáneamente en la piel de los ratones K14-HPV16 (Figuras 27B y 27C).

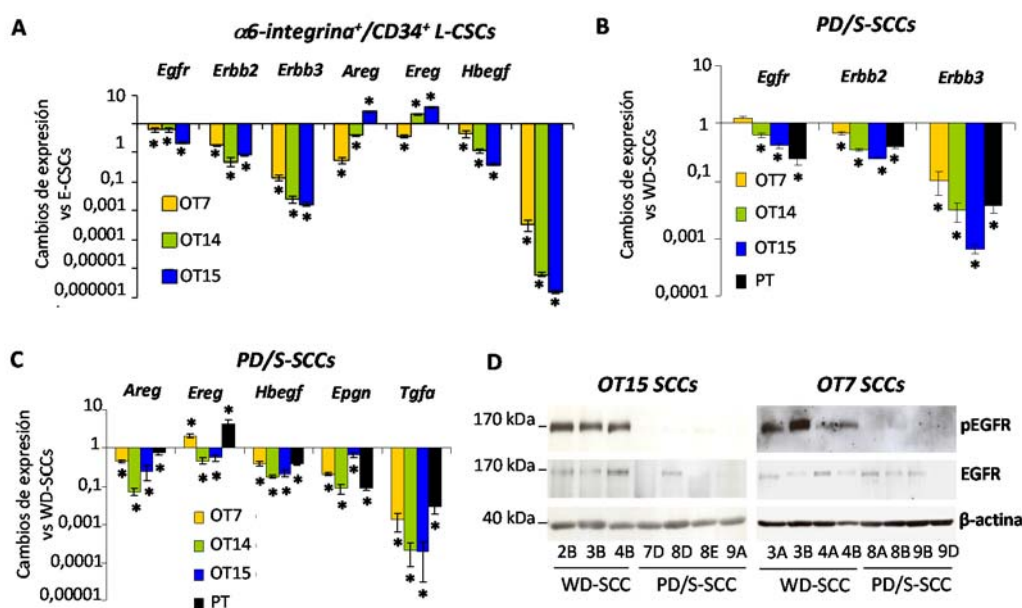


Figura 27. La vía de señalización de EGFR se atenúa en los PD/S-SCCs. A-D) Los resultados muestran diferencias en los niveles de ARN (media $\pm$ SE) de los genes indicados (relativos a *Gapdh*) en las L-CSCs respecto a las E-CSCs (**A**) (3 muestras por grupo) y en los PD/S-SCCs respecto a los WD-SCCs (**B** y **C**) en los linajes tumorales indicados (OT) (8 muestras por grupo) y en SCCs espontáneos (PT) (4 muestras por grupo). * indica diferencias significativas entre los grupos comparados (t-test; $p < 0,05$). **D)** EGFR y su forma fosforilada en diferentes muestras de WD-SCCs y PD/S-SCCs de los linajes indicados. La β -actina se utilizó como control de carga de proteínas.

Además, mediante análisis de western blot, comprobamos que la activación de EGFR, indicada por los niveles de fosforilación de este receptor, disminuían drásticamente en los PD/S-SCCs comparado

con sus precursores WD-SCCs (Figura 27D). Por lo tanto, estos resultados indicaban que la activación de la vía de señalización de EGFR está atenuada en los SCCs avanzados.

Con el fin de determinar si la vía de EGFR estaba activada específicamente en las CSCs de los WD-SCCs, comparamos la expresión de este receptor y sus ligandos en las células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ y $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁻ aisladas de los tumores WD mediante qRT-PCR. Nuestros resultados mostraron que las CSCs $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ expresaban niveles más elevados de EGFR y del ligando *Tgfa* que las células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁻, mientras que la expresión de *Areg* y *Epgn* fue similar en ambas poblaciones celulares (Figura 28A). Además, observamos que EGFR estaba fosforilado y activo principalmente en las CSCs $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ (Figura 28B), indicando que esta población de células presentaban inducida la vía de EGFR.

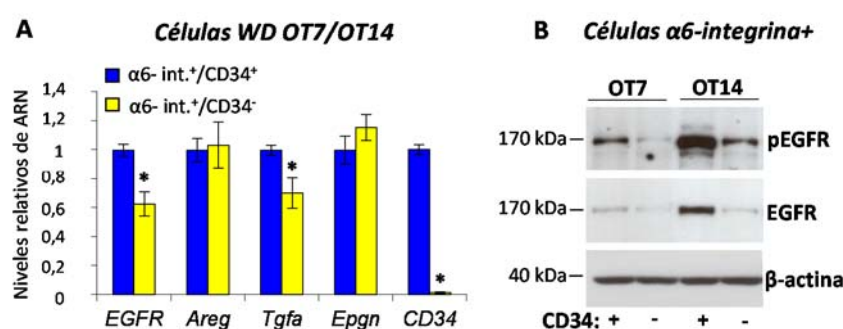


Figura 28. La vía de EGFR está inducida principalmente en la población de CSCs de los tumores WD-SCCs. **A)** Niveles de ARN (media $\pm$ SE) de los genes indicados (relativos a la expresión de *Gapdh*) en las células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ y $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁻ aisladas de WD-SCCs (3 muestras por grupo). * indica diferencias significativas entre los grupos comparados (t-test; $p < 0,05$). **B)** Niveles de EGFR y de su forma fosforilada en las poblaciones indicadas de células aisladas de WD-SCCs de los linajes OT7 y OT14. Se utilizó β -actina como control de carga de proteínas.

Para investigar el papel de la vía de EGFR promoviendo la proliferación de las CSCs, en primer lugar, analizamos el estatus de esta vía en nuestros cultivos celulares establecidos a partir de tumores PD/S y sus precursores WD (descritos en la sección 2.3). Nuestros resultados indican que ambas poblaciones de células en cultivo exhibían un patrón de expresión de receptores y ligandos similar al de las CD34⁺-CSCs aisladas de los WD-SCCs y PD/S-SCCs (Figura 29).

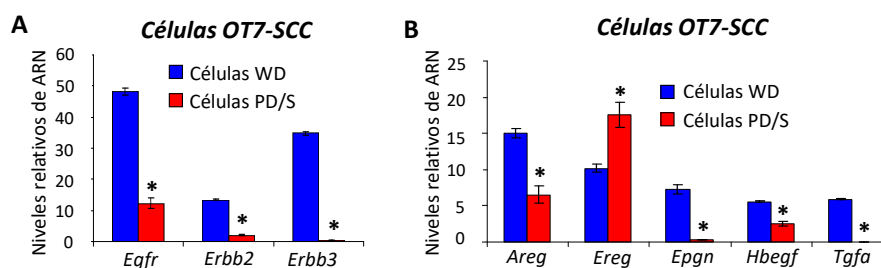


Figura 29. Expresión de receptores Erbb y ligandos en cultivos primarios de células WD y PD/S. **A, B)** Cuantificación mediante qRT-PCR de los niveles de ARN (media $\pm$ SE) de los genes indicados relativos a la expresión de *Gapdh*. * indica diferencias significativas entre los grupos comparados (t-test; $p < 0,05$).

A continuación, se analizó el efecto del tratamiento con EGF y con diferentes dosis de Gefitinib, un inhibidor de la tirosina quinasa de EGFR, en la proliferación de las células WD y PD/S. Los resultados mostraron que, mientras que la proliferación de las células PD/S no se modificaba de forma significativa en respuesta a EGF, el tratamiento con el ligando inducía de forma significativa la proliferación de las células WD (Figura 30A), concomitantemente con la inducción de la fosforilación del receptor, así como de AKT y principalmente de ERK1/2 (Figura 30D), siendo todos estos procesos inhibidos en respuesta a Gefitinib (Figuras 30B-30D). Además, observamos que, cuando las células WD crecían en ausencia de EGF, mostraban altos niveles de pEGFR, y la proliferación de estas células (Figuras 30B y 30C), así como la fosforilación de EGFR, AKT y ERK1/2 eran inhibidos en presencia de Gefitinib (Figura 30D).

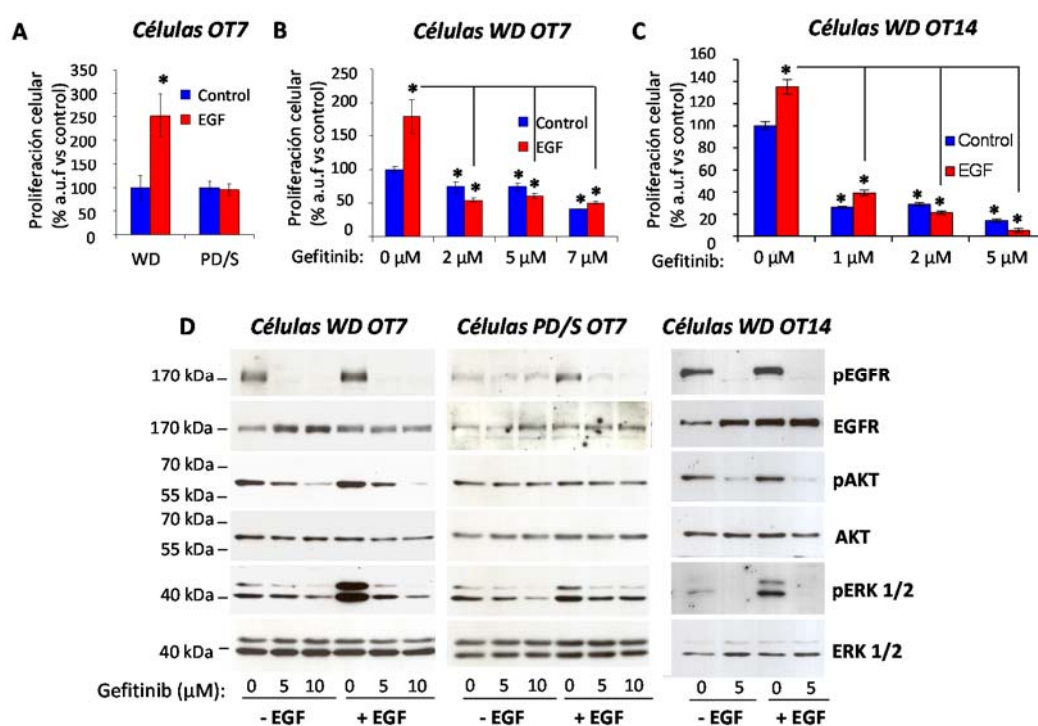


Figura 30. La activación de la vía de EGFR promueve la proliferación y supervivencia de las E-CSCs. A) Proliferación de las células WD y PD/S incubadas en presencia o ausencia de EGF, medida por MTT. Las medias ($\pm$ SE) indican unidades arbitrarias de fluorescencia (a.u.f.) en células tratadas con EGF relativas a las a.u.f. de células que crecen en condiciones basales. B y C) Efecto del tratamiento con Gefitinib en la proliferación de células WD tratadas con o sin EGF en los linajes indicados (media $\pm$ SE de a.u.f., 2 muestras por grupo). * indica diferencias significativas entre los grupos comparados (t-test; $p < 0,05$). D) Niveles de EGFR, AKT y ERK1/2 y sus formas fosforiladas en células WD de los linajes indicados, crecidas en ausencia o presencia de EGF y Gefitinib. La β -actina se usó como control de la carga de proteínas.

El conjunto de nuestros resultados indican que la activación autocrina, y probablemente paracrina, de la vía de señalización de EGFR promueve la proliferación y supervivencia de las E-CSCs, mientras que esta vía está fuertemente atenuada en las L-CSCs de los SCCs avanzados.

2.6. La activación autocrina de la vía de PDGFR α en las L-CSCs promueve su migración y la metástasis en los PD/S-SCCs

Los resultados del análisis del array mostraron que la expresión de *Pdgfra* estaba inducida en las L-CSCs, indicando que la vía de señalización medida por este receptor podría activarse en esta población de células en los estadios finales de la progresión de los SCCs de piel. Para validar estos resultados, inicialmente analizamos mediante qRT-PCR los niveles de expresión de *Pdgfra*, *Pdgfrb*, tanto en las E-CSCs y L-CSCs, como en sus respectivos tumores de origen. Nosotros observamos una fuerte inducción de la expresión de *Pdgfra* en las L-CSCs (Figura 31A), así como en los PD/S-SCCs de diferentes linajes y en los SCCs avanzados generados en los ratones K14-HPV16 (Figura 31B). Sin embargo, aunque la expresión de *Pdgfrb* estaba fuertemente incrementada en los PD/S-SCCs (Figura 31B), su expresión era muy reducida tanto en las CSCs $\alpha 6$ integrina⁺/CD34⁺ como en las células aisladas de tumores PD/S (Figuras 31A y 31C). Estos resultados indican que PDGFR β se expresa principalmente en las células del estroma, las cuales inducen su expresión durante la progresión tumoral.

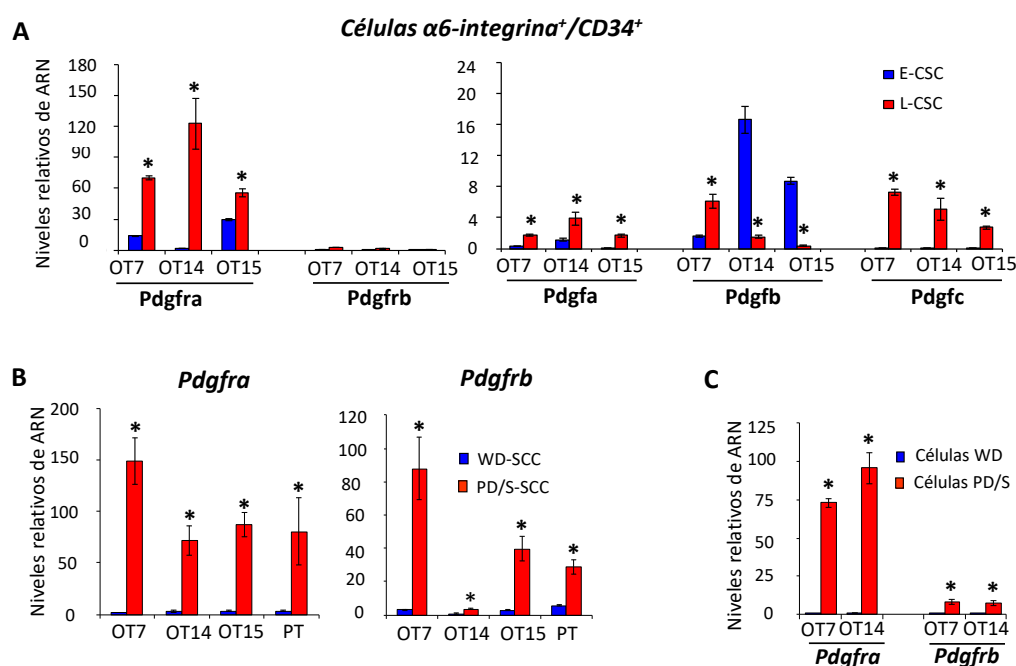


Figura 31. La expresión de *Pdgfra* y sus ligandos se induce significativamente en las L-CSCs de los PD/S-SCCs. A, B) Cuantificación de los niveles de ARN de los genes indicados (media $\pm$ SE) relativos a *Gapdh* en E-CSCs y L-CSCs (**A**) (2 muestras por grupo) y en WD-SCCs y PD/S-SCCs de diferentes linajes (OT), así como en tumores primarios (PT) (**B**). **C)** Niveles de ARN (media $\pm$ SE) de *Pdgfra* y *Pdgfrb* relativos a *Gapdh* en células WD y células PD/S (2 muestras por grupo) de los linajes indicados. * indica diferencias significativas entre los grupos comparados (t-test; $p < 0,05$).

De acuerdo con estos resultados, el análisis de WD-SCCs y PD/S-SCCs mediante citometría de flujo mostró que el porcentaje de células tumorales que expresan PDGFR α (células $\alpha 6$ -integrina⁺/PDGFR α ⁺) incrementaba significativamente en los SCCs avanzados (Figura 32A).

Además, estos estudios demostraron que, mientras que la población de CSCs que expresaban PDGFR α (células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺/PDGFR α ⁺) era muy reducida en los WD-SCCs, ésta incrementaba significativamente en los PD/S-SCCs de diferentes linajes, así como en los SCCs avanzados, generados espontáneamente en los ratones K14-HPV16 (Figuras 32B-32D).

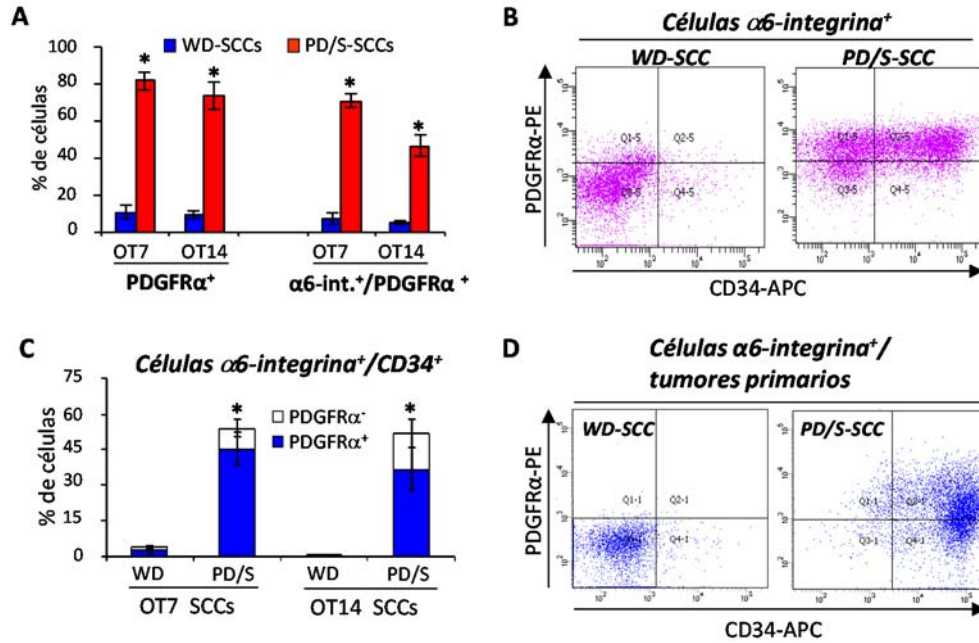


Figura 32. Los PD/S-SCCs contienen un elevado porcentaje de CSCs que expresan PDGFR α . **A)** Cuantificación mediante citometría de flujo del porcentaje (media $\pm$ SE) de las células indicadas en WD-SCCs y PD/S-SCCs de diferente linajes (6-8 tumores por grupo). **B)** Resultados representativos de la cuantificación de CSCs $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ que expresan PDGFR α en los WD-SCCs y PD/S-SCCs. **C)** Porcentaje de las células indicadas en WD-SCCs y PD/S-SCCs (media $\pm$ SE) (6-8 tumores por grupo), cuantificado por citometría de flujo. **D)** Resultados representativos de la cuantificación de las células $\alpha 6$ -integrina⁺ que expresan PDGFR α y CD34 en SCC primarios.

Dado que no se detectaron cambios en la expresión de *Pdgfra*, *Pdgfrb* o *Pdgfr*, en los WD-SCCs que nunca progresaron a PD/S-SCCs después de reimplantes seriados, (Figura 33C - OT9), nuestros resultados demuestran que durante la progresión de los SCCs se induce la vía de PDGFR α .

Por otro lado, se observó una fuerte inducción en la expresión de los ligandos *Pdgfa* y *Pdgfr* en las L-CSCs de diferentes linajes (Figura 31A), así como en sus respectivos PD/S-SCCs (Figura 33A). Además, PDGFR α estaba fuertemente fosforilado en los PD/S-SCCs, comparado con sus respectivos precursores WD-SCCs (Figura 33B). Estos resultados sugieren que las CSCs de SCCs avanzados podrían activar la vía de PDGFR α de forma autocrina.

Para validar esta hipótesis, las células PD/S fueron tratadas con diferentes dosis de Imatinib, un inhibidor de la quinasa de PDGFR, en presencia o ausencia de ligandos. Observamos que los niveles de pPDGFR α incrementaban en presencia de ligandos en el medio de cultivo (Figura 34A). En ausencia de PDGF, las células PD/S mostraban una clara fosforilación de PDGFR α , la cual era

bloqueada en respuesta al inhibidor. (Figura 34A). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la proliferación de las células PD/S en respuesta a PDGF o tras el tratamiento con Imatinib (Figura 34B y 34C).

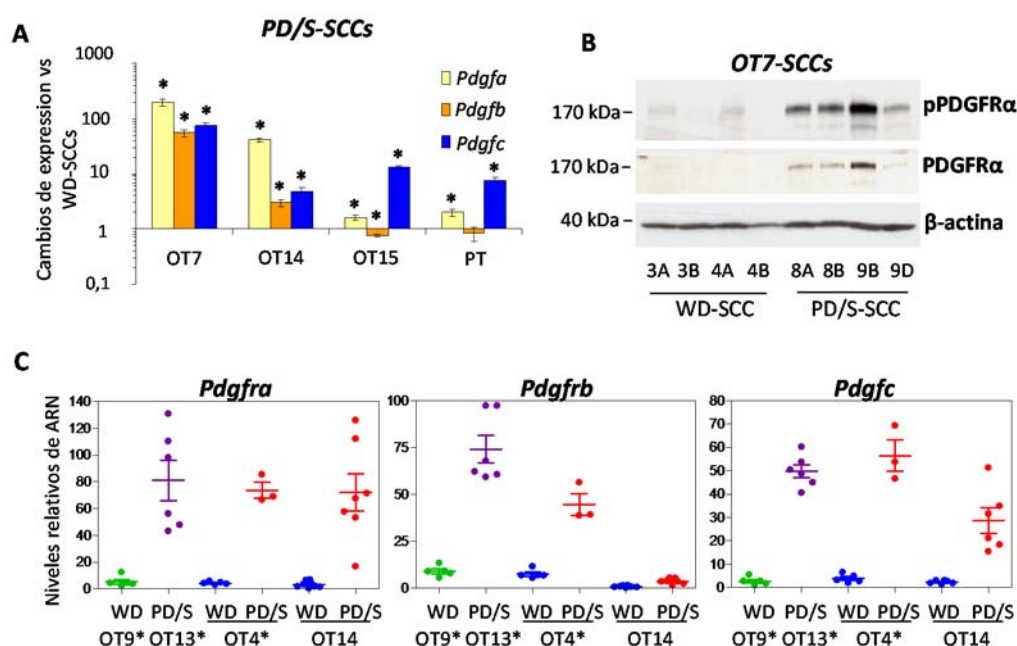


Figura 33. Activación de PDGFRα en PD/S-SCCs. **A)** Cuantificación del ARN (media $\pm$ SE) de los ligandos de PDGFR en PD/S-SCCs de los linajes indicados y en SCC primarios (PT) relativos a WD-SCCs (5-7 muestras por grupo). * Indica diferencias significativas entre los grupos (t-test, $P < 0,05$). **B)** PDGFRα y su forma fosforilada en WD-SCCs y PD/S-SCCs. La β-actina se muestra como control de la carga de proteínas. El número de muestra identifica el número de pase del tumor y las letras indican réplicas tumorales independientes. **C)** Niveles del ARN (media $\pm$ SE) de los genes indicados relativos a la expresión de *Gapdh* en muestras de linajes de SCCs que progresaron (OT4 y OT14), linajes que no mostraron progresión tumoral (OT9) y aquellos que se mantuvieron como PD/S-SCCs (OT13) después de trasplantes seriados. * Indica que los tumores de origen de estos linajes se desarrollaron de forma espontánea.

Además, la generación de células PD/S con expresión interferida de PDGFRα (Figura 34D; sh#3), nos permitió corroborar que la proliferación de estas células no se modificaba como consecuencia del bloqueo de la actividad de PDGFRα (Figura 34E). Por lo tanto, la activación autocrina de PDGFRα no inducía la proliferación de las L-CSCs. Para evaluar la relevancia de esta vía de señalización en el crecimiento tumoral y la generación de metástasis *in vivo*, se diseñaron dos tipos de experimentos: (i) se inyectaron células PD/S con una expresión interferida de PDGFRα (sh-PDGFRα) y sus respectivas células controles (sh-control) en ratones inmunodeficientes, y (ii) se implantaron ortotópicamente PD/S-SCCs en ratones inmunodeficientes, los cuales fueron tratados diariamente con Imatinib o solución vehículo.

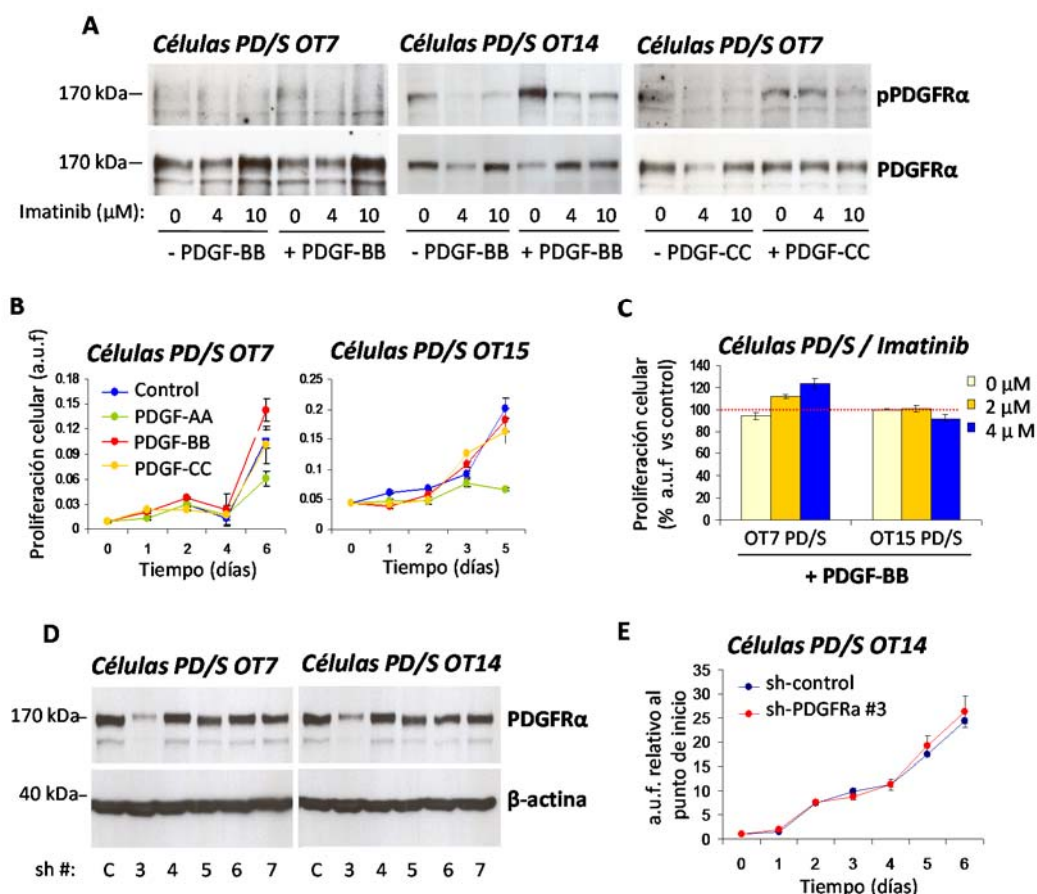


Figura 34. La activación autocrina de la vía de PDGFRα no promueve la proliferación de las células PD/S. **A)** Análisis de los niveles de pPDGFRα en células PD/S en ausencia o presencia de Imatinib y de los ligandos indicados. **B)** Cinética de proliferación (media de a.u.f. ± SE) de las células PD/S de los linajes indicados en ausencia (control) o presencia de PDGF-AA (10 ng/ml), PDGF-BB (30 ng/ml) y PDGF-CC (30 ng/ml), determinada mediante ensayos de MTT. **C)** Proliferación de células PD/S en respuesta al tratamiento con PDGF-BB (30 ng/ml) y dosis crecientes de Imatinib. Los resultados (media ± SE) representan la proliferación (a.u.f.) de las células bajo estos tratamientos respecto a sus respectivas células control, crecidas en ausencia de ligandos e inhibidor (línea roja). **D)** Expresión de PDGFRα en las células control (C) e interferidas con diferentes sh-PDGFRα. β-actina se incluyó como un control de la carga de proteínas. **E)** Cinética de proliferación (media de a.u.f. ± SE respecto al día 0) de células PD/S control (sh-control) y con expresión interferida de PDGFRα (sh-PDGFRα).

Los resultados de estos experimentos mostraron que, de acuerdo con lo observado *in vitro*, el bloqueo de la actividad de PDGFRα no reducía el crecimiento tumoral *in vivo* (Figura 35). Sin embargo, se observó una reducción significativa en el número y el tamaño de las metástasis desarrolladas en los pulmones de los ratones tratados con Imatinib, así como en los ratones portadores de PD/S-SCCs con una reducida expresión de PDGFRα (Figuras 36A-36C). Es importante destacar que las escasas metástasis desarrolladas en los ratones con PD/S-SCCs sh-PDGFRα, mostraron unos niveles elevados de PDGFRα, indicando que estas lesiones metastásicas podrían haber surgido a partir de células tumorales que eludieron la interferencia del receptor (Figura 36D).

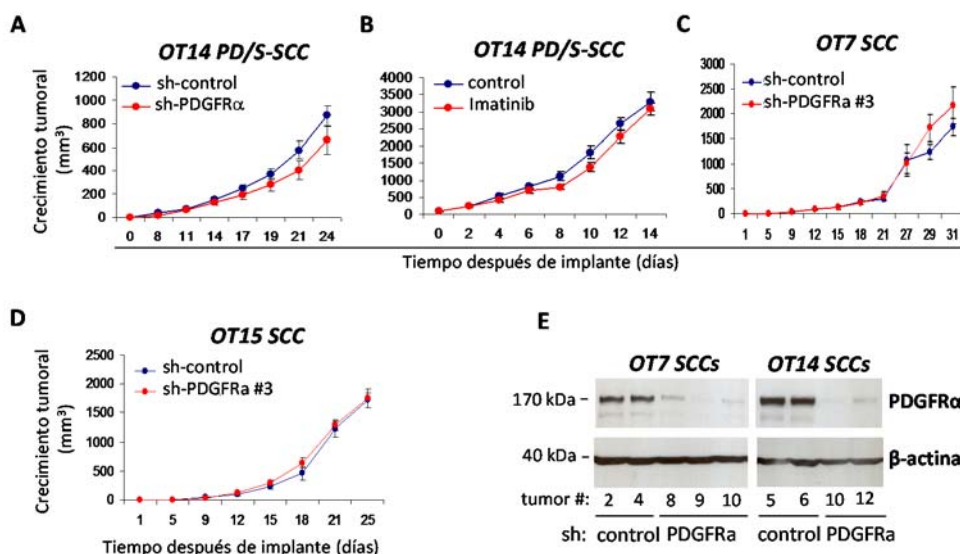


Figura 35. La inhibición de la vía de PDGFRα en las L-CSCs no bloquea el crecimiento de los PD/S-SCCs. A-C) Cinética de crecimiento (media del tamaño del tumor $\pm$ SE) de los PD/S-SCCs sh-control y sh-PDGFRα de los linajes indicados (A, C y D; 8 tumores por grupo), y de los PD/S-SCCs tratados con solución vehículo o Imatinib (B; 10 ratones por grupo). E) Expresión de PDGFRα en los tumores indicados, procedentes de los ensayos descritos en A y C. β-actina se incluyó como un control de la carga de proteínas.

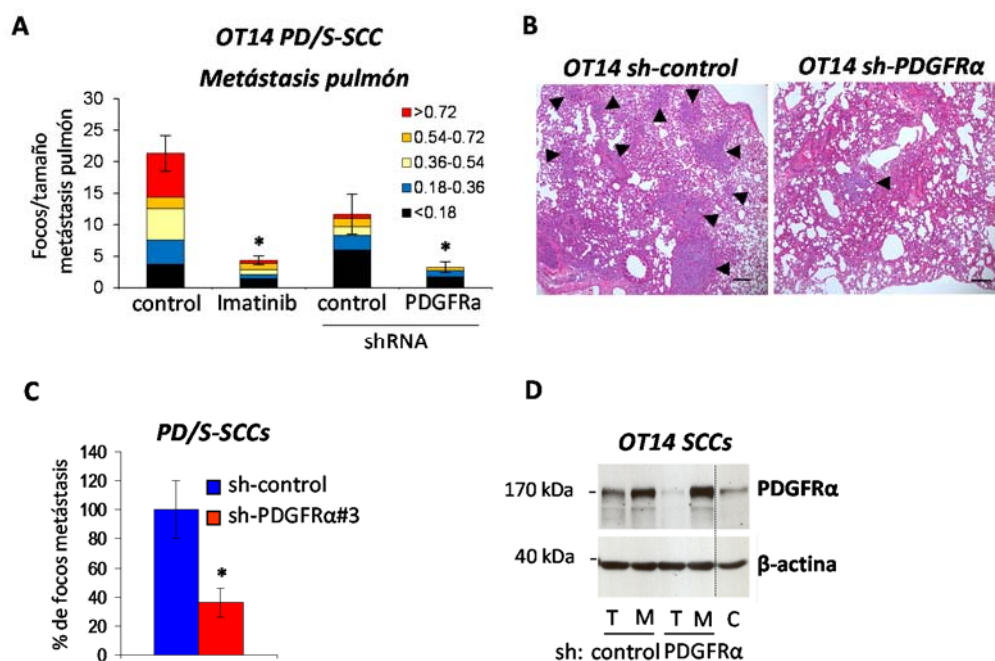


Figura 36. La activación autocrina de PDGFRα en las CSCs de SCCs avanzados promueve el desarrollo de metástasis. A) Media $\pm$ SE de focos metastásicos detectados por sección de pulmón (categorizados por tamaño, mm²) en ratones inyectados con células PD/S sh-control o sh-PDGFRα (4 ratones por grupo) y en ratones control y tratados con Imatinib (10 ratones por grupo). B) Imágenes representativas que muestran lesiones metastásicas (indicadas por flechas) en los pulmones de ratones inyectados con células PD/S sh-control y sh-PDGFRα. Barra de escala, 200 μ m. C) Porcentaje de focos metastásicos por sección pulmonar (media $\pm$ SE) desarrollados a partir de tumores sh-PDGFRα en relación con tumores de control (12 ratones por grupo de 3 linajes tumorales diferentes). * Indica diferencias significativas entre los grupos (t-test, $p < 0,05$). D) Expresión de PDGFRα en tumores (T) y sus respectivas metástasis (M). Se incluyó una muestra de pulmón libre de tumor (C) como control de la expresión de PDGFRα en este tejido. β-actina se muestra como control de la carga de proteínas.

Estudios previos demostraron que el tratamiento con Imatinib reduce la angiogénesis de los tumores (Hwang et al. 2003; Ruan et al. 2013). Para evaluar si la reducción de metástasis inducida por el bloqueo de PDGFR α podía asociarse a una disminución de la angiogénesis, cuantificamos la formación de vasos sanguíneos CD31 $^{+}$ en los PD/S-SCCs controles, tratados con Imatinib y con expresión reducida de PDGFR α . Nuestros resultados demostraron que, aunque el número de vasos sanguíneos en los PD/S-SCCs tratados con Imatinib se reducía significativamente, la frecuencia de vasos sanguíneos CD31 $^{+}$ no estaba alterada en los PD/S-SCCs con expresión reducida de PDGFR α (Figura 37A). Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la activación autocrina de la vía de PDGFR α en las L-CSCs promueve el desarrollo de metástasis, independientemente de alteraciones en la angiogénesis.

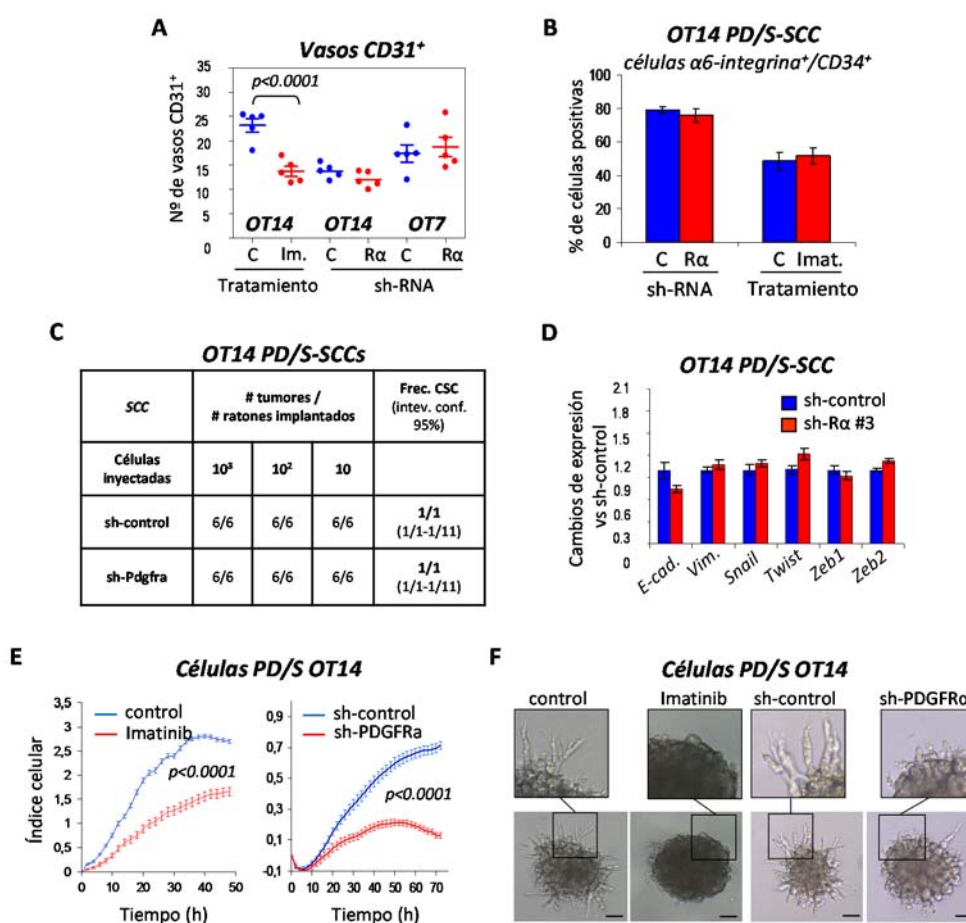


Figura 37. La activación autocrina de PDGFR α induce migración e invasión en las células PD/S. **A)** Los resultados indican el número de vasos CD31 $^{+}$ (media $\pm$ SE) por sección de tumor en los grupos indicados. **B)** Cuantificación, mediante citometría de flujo, del porcentaje de células $\alpha 6$ -integrina $^{+}$ /CD34 $^{+}$ (media $\pm$ SE) en los grupos de tumores indicados. **C)** Estimación de la frecuencia de células iniciadoras de tumores en PD/S-SCCs expresando PDGFR α y con la expresión de PDGFR α interferida, realizada mediante ensayos de dilución límite. Se muestra el número de ratones que desarrollaron tumores respecto al total de ratones inyectados, la frecuencia de CSCs e intervalos de confianza (int. conf.) para cada condición. **D)** Cambios en los niveles de ARN de los genes indicados (media $\pm$ SE) en los PD/S-SCCs sh-PDGFR relativos a sh control. **E)** Cinética a tiempo real de la capacidad de invasión (media del índice celular $\pm$ SE) de las células PD/S con actividad PDGFR α bloqueada, comparada con sus respectivas células PD/S control. **F)** Efecto del bloqueo de la actividad de PDGFR α , tras el tratamiento con Imatinib o la interferencia del receptor (sh-PDGFR α) en la formación de estructuras de invasión en células PD/S crecidas en matrigel. Barra de escala, 50 μ m.

Asimismo, comprobamos que esta reducción en el desarrollo de metástasis no era debida a una disminución en la frecuencia de CSCs α -integrina⁺/CD34⁺ (Figura 37B), o de células iniciadoras de tumores (determinada mediante ensayos de dilución límite) en los PD/S-SCCs sh-PDGFR α (Figura 37C). Es más, la expresión de marcadores y factores de transcripción que inducen EMT resultó inalterada en los tumores PD/S-SCCs sh-PDGFR α (Figura 37D). Por lo tanto, el bloqueo en el desarrollo de metástasis provocado por la inhibición de PDGFR α no se debía a una atenuación del programa EMT.

Sin embargo, observamos que la inhibición de la actividad de PDGFR α , provocada por el tratamiento con Imatinib o la interferencia del receptor, reducía de forma significativa la formación de estructura de invasión en las L-CSCs, cuando eran crecidas en matrigel (Figura 37F). De acuerdo con estos resultados, observamos que la capacidad de migración e invasión de estas células, sembradas en cámaras modificadas de Boyden en ausencia de ligandos, se reducía significativamente en respuesta a la inhibición de PDGFR α (Figura 37E). Por lo tanto, estos resultados indican que la activación autocrina de PDGFR α promueve la migración e invasión de las L-CSCs, favoreciendo su diseminación y promoviendo el desarrollo de metástasis.

2.7. La activación autocrina de la vía mediada por FGFR1 promueve el crecimiento de los SCCs avanzados

Estudios previos demostraron que los queratinocitos de la piel adulta de ratón expresan FGFR1 y FGFR2, y estos receptores juegan un papel importante en la homeostasis de la piel (J. Yang et al. 2010). Sin embargo, se desconocía si la vía de FGFR regulaba la proliferación y supervivencia de las CSCs de los SCCs.

Nuestros análisis mostraron que la expresión de *Fgfr2* estaba disminuida en las L-CSCs (Figuras 23B y 38A), indicando que la vía de FGFR estaba alterada en las CSCs de los SCCs avanzados. El análisis de la expresión de diferentes miembros de la familia de FGFR y sus variantes IIIb y IIIc mostró que *Fgfr1-IIIc* (*Fgfr1c*) era el receptor de esta familia más expresado tanto en las E-CSCs como en las L-CSCs (Figura 38A).

Aunque la expresión de *Fgfr1c* se inducía en las L-CSCs de algunos PD/S-SCCs, esto no se observó de forma consistente en todos los linajes estudiados (Figura 38A). Sin embargo, los PD/S-SCCs desarrollados de forma espontánea en los ratones K14-HPV16 y los ortotópicos generados por la progresión de WD-SCCs, presentaban una fuerte inducción de la expresión de FGFR1 (Figuras 38B y 38C). Por el contrario, no se detectaron cambios significativos en la expresión de *Fgfr1c* en aquellos tumores WD que nunca progresaron después de múltiples pases en ratones inmunodeficientes (Figura 38E).

Dado que los ensayos de inmunofluorescencia mostraron que la población de células tumorales que expresan FGFR1 incrementaba significativamente en los SCCs avanzados (Figura 38D), nuestros resultados indican que las CD34⁺- CSCs expresan niveles elevados de FGFR1c, y que el aumento de la expresión de este receptor en los PD/S-SCCs es debida a la expansión de las CSCs.

Por otra parte, las L-CSCs de la mayoría de linajes inducían la expresión de *Fgf2* y *Fgf7* (Figura 38F), lo cual correlacionaba con lo observado cuando se comparaba la expresión de estos factores en los PD/S-SCCs y WD-SCCs (ver Anexo). Estos resultados sugieren que las L-CSCs presentan una activación autocrina de la vía de FGFR1c.

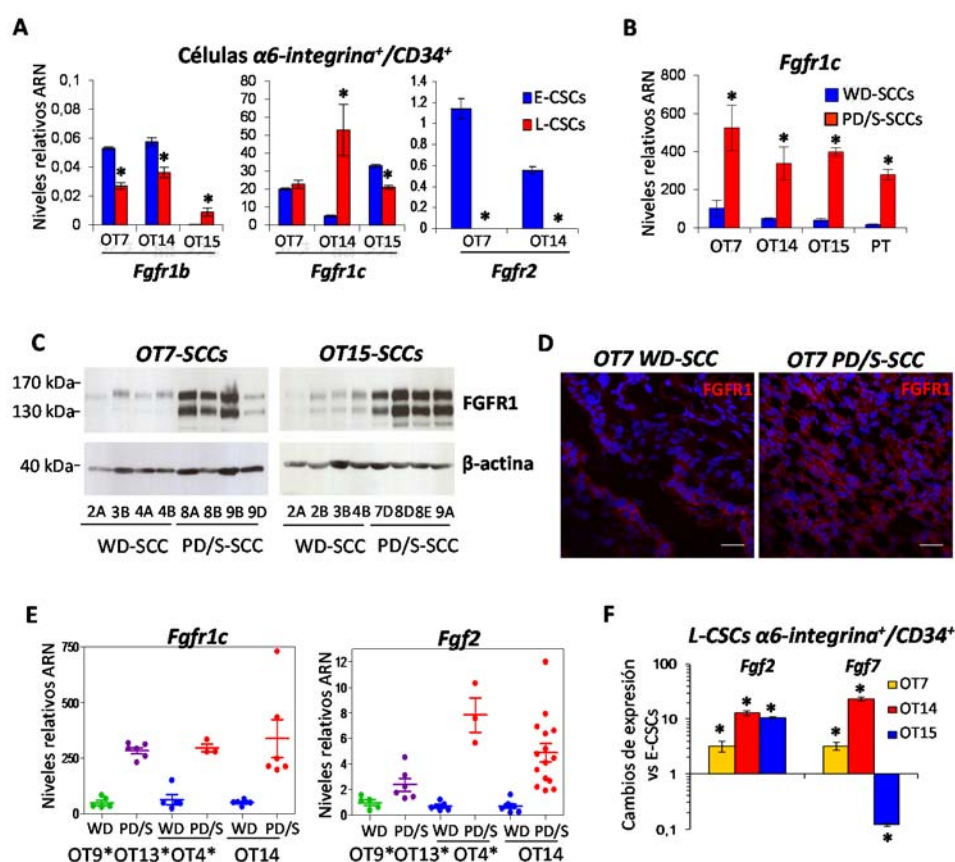


Figura 38. Las L-CSCs presentan una elevada expresión de FGFR1 e inducen la expresión de sus ligandos FGF2 y FGF7. **A, B)** Niveles de ARN (media $\pm$ SE) de los genes indicados, relativos a la expresión de *Gapdh* en E-CSCs y L-CSCs (**A**) (2 muestras por grupo) y en WD-SCCs y PD/S-SCCs de diferentes linajes (6-8 muestras por grupo), así como en tumores primarios (PT) (**B**) (4 muestras por grupo). **C)** Niveles de proteína FGFR1 en diferentes muestras de WD-SCCs y PD/S-SCCs de los linajes indicados. β -actina se incluyó como control de carga de proteínas. **D)** Imágenes representativas de la inmunodetección de células que expresan FGFR1 en WD-SCCs y PD/S-SCCs. Barra de escala, 30 μ m. **E)** Niveles de ARN (datos individuales y media $\pm$ SE) relativos a *Gapdh* de los genes indicados en muestras de diferentes linajes de SCCs. * Indica que los tumores de origen de estos linajes fueron SCCs espontáneos. **F)** Niveles de ARN (media $\pm$ SE) de los genes indicados, en L-CSCs relativos a E-CSCs de tres linajes tumorales. * Indica diferencias significativas entre los grupos (t-test, $p < 0,05$).

A continuación, evaluamos si esta vía de señalización regulaba la proliferación y la supervivencia de las CSCs de los WD-SCCs y PD/S-SCCs. En primer lugar, analizamos la expresión de *Fgfr1c* en las CSCs y en el resto de células tumorales aisladas de los WD-SCCs. Nuestros resultados mostraron una

mayor expresión de *Fgfr1c* en las células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ que en la población de células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁻ (ver Anexo). Sin embargo, la proliferación de las células WD no se modificaba de forma significativa en respuesta al tratamiento con FGF2 o a dosis crecientes de PD173074, un inhibidor específico de FGFR1 (Figuras 39A y 39B). En cambio, cuando la vía de EGFR se inhibía mediante el tratamiento con Gefitinib, la proliferación de las células WD se inducía de forma significativa en respuesta a FGF2 (Figura 39B). Estos resultados indican que la fuerte activación de la vía EGFR atenúa la señalización a través de FGFR1c en las células WD. Por el contrario, la proliferación de las células PD/S se inducía de forma significativa en presencia de FGF2 (Figura 39A, +FGF2), coincidiendo con un aumento de la fosforilación de FGFR, AKT y ERK1/2, y estos efectos eran inhibidos en respuesta a PD173074 (Figuras 39A y 39C). Además, observamos que en ausencia de FGF2 y en presencia del inhibidor, la proliferación de las células PD/S se reducía de forma significativa (Figura 39A, -FGF2). Estos resultados indican que la activación autocrina de la vía de FGFR1 promueve la proliferación de las L-CSCs de SCCs de piel en estadios avanzados.

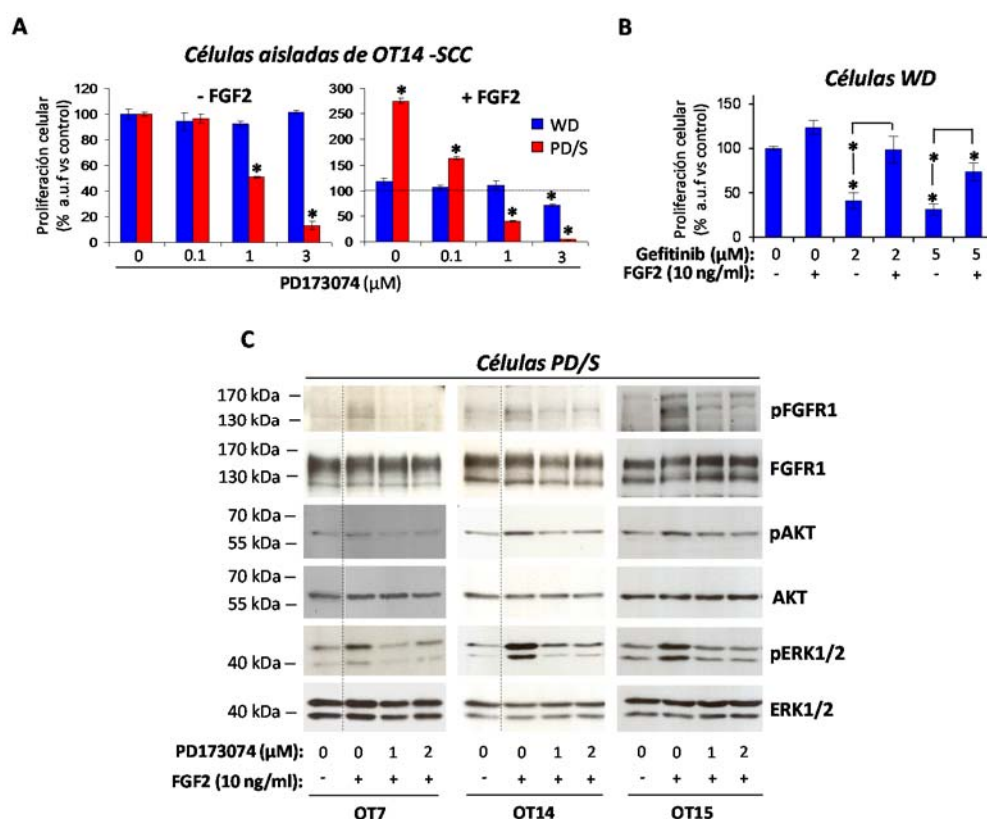


Figura 39. La activación autocrina de la vía de FGFR1 induce la proliferación de las L-CSCs. A) Proliferación de las células WD y PD/S (media de a.u.f. relativa al control $\pm$ SE) tras los tratamientos indicados, medida por MTT. **B)** Proliferación de las células WD (media de a.u.f. relativo al control $\pm$ SE) en ausencia o presencia de FGF2 (10 ng/ml) y dosis crecientes de Gefitinib, determinada mediante ensayos MTT. * Indica diferencias significativas entre los grupos comparados (t-test, $p < 0,05$). **C)** Análisis de la fosforilación de FGFR, AKT y ERK1/2 en células PD/S de los linajes indicados, en ausencia o presencia de FGF2 y PD173074. La línea punteada indica que estas muestras se analizaron en el mismo gel pero en carriles separados.

Con el fin de analizar el efecto de la inhibición de FGFR1 en el crecimiento tumoral, se implantaron PD/S-SCCs en ratones inmunodeprimidos, y estos fueron tratados diariamente con PD173074 o con solución control. Nosotros observamos que la inhibición de FGFR1 reducía de forma significativa el crecimiento de estos SCCs avanzados (Figura 40A). Esta reducción del crecimiento tumoral correlacionaba con una disminución de la proliferación celular, determinada por la cuantificación de células con histona 3 fosforilada (Ser10) (Figuras 40B y 40C), así como con una inducción de la apoptosis, indicada por el aumento de los niveles de caspasa-3 activa (Figura 40D). Para analizar el efecto del bloqueo de FGFR1 sobre el desarrollo de metástasis, los tumores fueron reseccionados cuando alcanzaron un tamaño crítico y el tratamiento con PD173074 continuó durante 8-10 días más, hasta que los ratones fueron sacrificados. El análisis microscópico de los pulmones demostró que el bloqueo de la vía de FGFR1 no reducía de forma significativa el número ni el tamaño de las lesiones metastásicas, comparado con las observadas en los ratones control (Figura 40E).

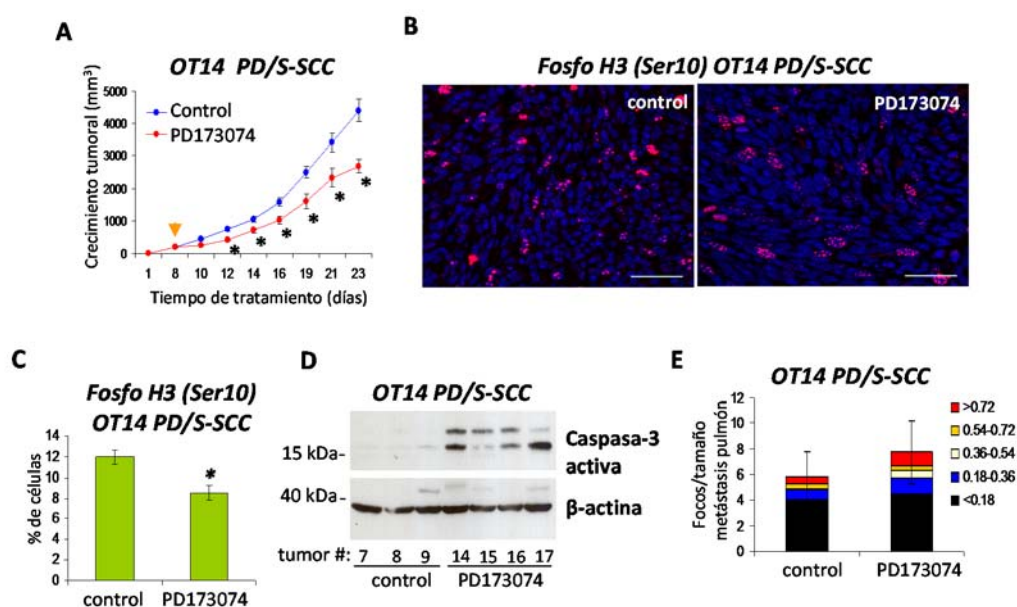


Figura 40. La activación autocrina de FGFR1 promueve el crecimiento tumoral. **A)** Cinética de crecimiento de PD/S-SCCs (media del tamaño del tumor $\pm$ SE) tratados con solución control o PD173074 (10 ratones por grupo). La flecha indica el inicio del tratamiento. **B)** Inmunodetección de células con histona H3 fosforilada (Ser10) en los tumores control y tratados con PD173074. Barra de escala, 30 μ m. **C)** Cuantificación del porcentaje de células en proliferación (media $\pm$ SE), mostrado en **B**. **D)** Niveles de caspasa-3 activada en tumores control y tratados con PD173074. Se usó β -actina como un control de carga de proteínas. **E)** Cuantificación de lesiones metastásicas (media $\pm$ SE) por sección pulmonar (categorizadas por tamaño; mm²) desarrolladas en ratones control y tratados con PD173074 (10 ratones por grupo). * Indica diferencias significativas entre los grupos comparados (t-test, $p < 0,05$).

Todos estos resultados indican que la activación autocrina de la vía de FGFR1 promueve el crecimiento de los SCC avanzados. Sin embargo, su inhibición no modifica significativamente el desarrollo de metástasis.

3. CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL DURANTE LA PROGRESIÓN DE LOS SCCs DE PIEL

3.1 Análisis de la expresión de citoquinas y receptores durante la progresión de los SCCs de piel

Estudios previos demostraron que las señales generadas por el microambiente tumoral pueden regular la proliferación y diseminación de las CSCs, y en consecuencia, promover la progresión tumoral (Balkwill 2004a). Por lo tanto, decidimos estudiar si durante la progresión de los SCCs se producían alteraciones en el microambiente tumoral, y concretamente en la expresión de citoquinas, que podrían ser responsables de los cambios en las CSCs descritos en nuestros estudios.

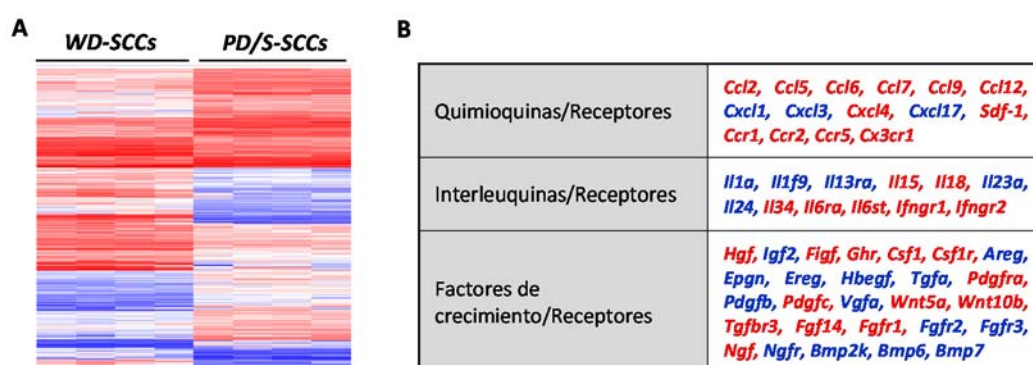


Figura 41. Citoquinas y receptores diferencialmente expresados en WD-SCCs y PD-SCCs. A) Análisis jerárquico de genes expresados diferencialmente ($\log_2 FC \geq 1$, FDR $p < 0.05$) entre PD/S-SCCs y sus respectivos precursores WD-SCCs de tres linajes diferentes de progresión. **B)** Selección de genes de citoquinas y receptores sobreexpresados (rojo) o con expresión disminuida (azul) en PD-SCCs respecto a los WD-SCCs.

Para ello, inicialmente se compararon los perfiles de expresión génica global de PD/S-SCCs y de sus precursores WD-SCCs de tres linajes diferentes, mediante un array de expresión génica. Este análisis nos permitió identificar citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento que se expresaban de forma diferencial en estos tumores (Figura 41).

Para validar estos resultados, seleccionamos algunas citoquinas y receptores, que previamente se habían asociado con la estimulación de la proliferación, migración celular y desarrollo de metástasis, y analizamos su expresión mediante qRT-PCR en WD-SCCs y PD/S-SCCs (Figura 42A).

Dado que los resultados del array indicaban que la expresión de algunos receptores de citoquinas estaba desregulada, ampliamos este estudio y analizamos la expresión de sus ligandos, así como la de otros receptores que podrían unirse a los ligandos identificados en el array (Figuras 41B y 42A).

Los resultados confirmaron que, mientras que *Ccr3*, *Ccr4* y *Cxcr2* presentaban una expresión muy baja o prácticamente indetectable en los SCCs avanzados (Figura 42C y datos no mostrados), la expresión

de los receptores *Ccr1*, *Ccr2*, *Ccr5*, *Cxcr4*, *Cxcr7*, *Cx3cr1*, *Csf1r*, *Il6st* e *Il6ra* se inducía en la mayoría de los PD/S-SCCs de los linajes de progresión estudiados (Figuras 42B-42D).

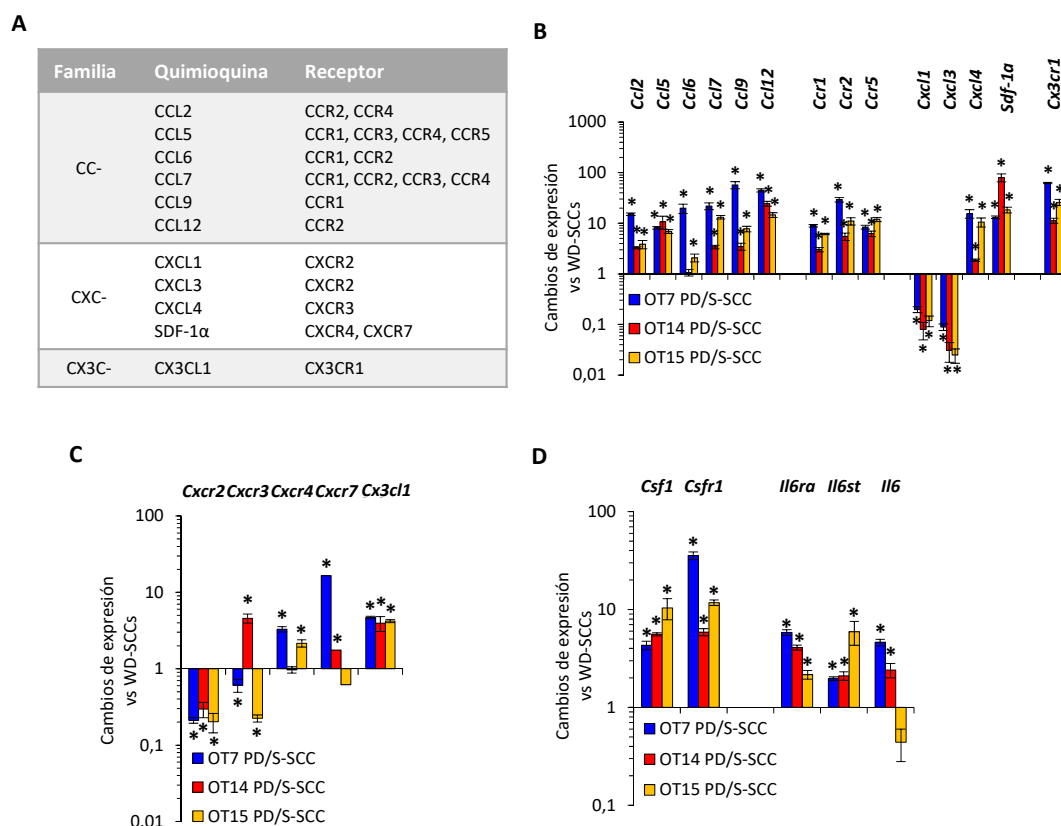


Figura 42. El perfil de expresión de citoquinas cambia durante la progresión de los SCCs de piel. A) Resumen de las quimioquinas analizadas y sus respectivos receptores. **B-D)** Niveles (media $\pm$ SE) de ARN de los genes indicados en los PD/S-SCCs respecto a sus respectivos WD-SCCs, cuantificados mediante qRT-PCR. Las diferencias significativas entre los grupos comparados son indicadas con * (t-test; $p < 0.05$).

Además, comprobamos que la expresión de sus ligandos *Ccl2*, *Ccl5*, *Ccl7*, *Ccl9*, *Ccl12*, *Il6*, *Cntf*, *Csf1*, *Cx3cl1* y *Cxcl12* (*Sdf-1a*) estaba también incrementada en estos tumores respecto a sus precursores WD-SCCs (Figuras 42B-42D), sugiriendo que la actividad de las vías mediadas por estas citoquinas podría estar inducida en los SCCs avanzados. Por el contrario, observamos una disminución significativa en la expresión de *Cxcl1* y *Cxcl3* en los PD/S-SCCs, indicando que la actividad de las vías mediadas por estas citoquinas estaba atenuada en los tumores avanzados.

3.2 Las poblaciones celulares del estroma cambian durante la progresión de los SCCs

Dado que estos análisis se realizaron con muestras tumorales que contenían células estromales, nuestros resultados no permitían determinar si los cambios de expresión de las citoquinas y sus receptores se producían exclusivamente en las células tumorales/CSCs y/o en las células del microambiente tumoral. Por lo tanto, inicialmente analizamos si el contenido de infiltrado inmune cambiaba durante la progresión tumoral en los diferentes linajes de SCC ortotópicos. Para ello,

cuantificamos el porcentaje de células CD45⁺ (linaje celular hematopoyético) presente en los WD-SCCs y PD/S-SCCs mediante citometría de flujo. Nuestros resultados muestran que la población de células CD45⁺ infiltrantes se reduce significativamente en los SCCs avanzados (Figuras 43A y 43B). Es importante destacar que los ratones atímicos utilizados para generar los linajes de progresión (Balbc/nude) son deficientes en linfocitos T, pero presentan niveles de linfocitos B y una respuesta inmune innata normales.

Con el fin de determinar si estas alteraciones en el infiltrado inmune podrían estar asociadas a la inmunodeficiencia de los ratones utilizados, analizamos el porcentaje de células inmunes (CD45⁺) en WD-SCCs y PD/S-SCCs generados tras el implante de células WD y PD/S en ratones singénicos inmunocompetentes. Los resultados demostraron que, similarmente a lo observado en los tumores generados en ratones atímicos, los PD/S-SCCs de ratones inmunocompetentes presentaban una reducción significativa del contenido de infiltrado inmune (Figura 43C). Aunque no hemos analizado si la escasa población de células inmunes de los PD/S-SCCs produce mayores niveles de determinadas citoquinas, nuestros resultados sugieren que otras células del estroma y/o las células tumorales serían las responsables del aumento de la producción de citoquinas observados en los SCCs avanzados.

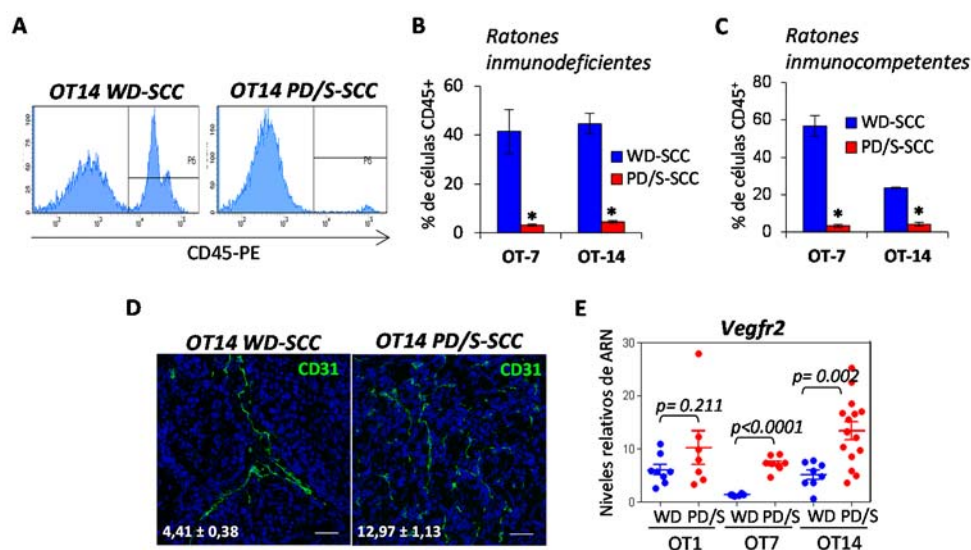


Figura 43. Caracterización del contenido de células inmune infiltrantes y de vasos sanguíneos en SCCs de diferentes estadios de progresión. **A)** Resultados representativos de la cuantificación de células inmunes CD45⁺ en WD-SCCs y PD/S-SCCs del linaje OT14. **B y C)** Los resultados indican el porcentaje de células CD45⁺ (media ± SE) en WD-SCCs y PD/S-SCCs de dos linajes tumorales generados en ratones inmunodeficientes (**B**) y en ratones inmunocompetentes (**C**). **D)** Imágenes representativas de la inmunodetección de células endoteliales CD31⁺ (barra de escala, 30 µm). El número (media ± SE) de vasos por sección se indica para cada tipo de tumor. **E)** Niveles de ARN de *Vegfr2* relativos a *Gapdh* en WD-SCCs y PD/S-SCCs de 3 linajes tumorales (datos individuales y media ± SE). Las diferencias significativas entre los grupos comparados son indicadas con * (t-test; p<0.05).

Por otra parte, cuantificamos el número de vasos sanguíneos en secciones de WD-SCCs y PD/SCCs de diferentes linajes, mediante la inmunodetección de células endoteliales CD31⁺. Nosotros

observamos que los PD/S-SCCs presentaban un incremento significativo del número de vasos respecto a los WD-SCCs (Figura 43D). Además, observamos que la expresión de *Vegfr2*, un receptor expresado en las células endoteliales, estaba significativamente incrementada en los tumores PD/S (Figura 43E), corroborando que en estos tumores se induce de forma significativa la angiogénesis. Dado que la expresión de *Vegfa* se reduce de forma dramática en estos tumores (nuestros datos previos no mostrados), el aumento de la angiogénesis observada en los PD/S-SCCs podría estar inducida por un incremento de citoquinas pro-angiogénicas, como *Sdf-1a* (Domanska et al. 2013; Azab et al. 2014), *Ccl2* o *Cx3cl* (Dimberg 2010), entre otras.

3.3 La expresión de citoquinas/receptores cambia en las células tumorales durante la progresión de los SCCs de piel

Para determinar si estos cambios de expresión de citoquinas se producían específicamente en las células tumorales, analizamos mediante qRT-PCR la expresión tanto de las citoquinas identificadas como de sus receptores, en las células WD y PD/S mantenidas en cultivo. Observamos que la expresión de *Ccl2*, *Ccl5*, *Ccl7*, *Cx3cl1*, *Il6*, *Csf1* y *Sdf-1a* (Figuras 44A-44E) estaba significativamente inducida en las células PD/S respecto a las células WD. Además, el nivel de expresión de estas citoquinas era similar al observado en sus respectivos PD/S-SCCs. Estos resultados indican sugieren que la inducción de la expresión de estas citoquinas se produce principalmente en las células tumorales de los PD/S-SCCs. No se detectó expresión de *Cxcl4*, *Ccl6* y *Ccl12* en ambas poblaciones de células tumorales (Figuras 44C y 44E), sugiriendo que estas citoquinas podrían estar siendo sintetizadas por las células estromales.

Por otra parte, la expresión de *Csfr1*, *Ccr2*, *Ccr3*, *Ccr4*, *Ccr5* y *Cx3cr1* era prácticamente indetectable en ambas poblaciones de células tumorales (Figuras 44A, 44D y 44F). Estos resultados sugieren que determinadas células del estroma (células endoteliales o fibroblastos) podrían inducir la expresión de estos receptores en los PD/S-SCCs, los cuales podrían activarse por los ligandos producidos por las células tumorales. Aunque la expresión de *Ccr1* era detectable tanto en células WD como PD/S (Figura 44D), sus niveles eran significativamente más bajos que los observados en sus respectivos tumores, indicando que las citoquinas *Ccl5*, *Ccl7* y *Ccl9* producidas por las células tumorales podrían estar actuando principalmente sobre las células del estroma.

Sin embargo, la expresión de los receptores de IL6 (*Il6st* y *Il6ra*) se incrementaba significativamente en las células PD/S (Figura 44B), alcanzando niveles similares a los observados en sus respectivos tumores. Cuando analizamos la expresión de los receptores de *Sdf-1a*, observamos que la expresión de *Cxcr4* se inducía significativamente en las células PD/S, mientras que las células WD y PD/S expresaban niveles elevados *Cxcr7* (Figuras 44E y 44F). Estos resultados sugieren que la activación

autocrina de las vías de IL6 y SDF-1 α podría promover el crecimiento tumoral y/o la metástasis en los SCCs avanzados.

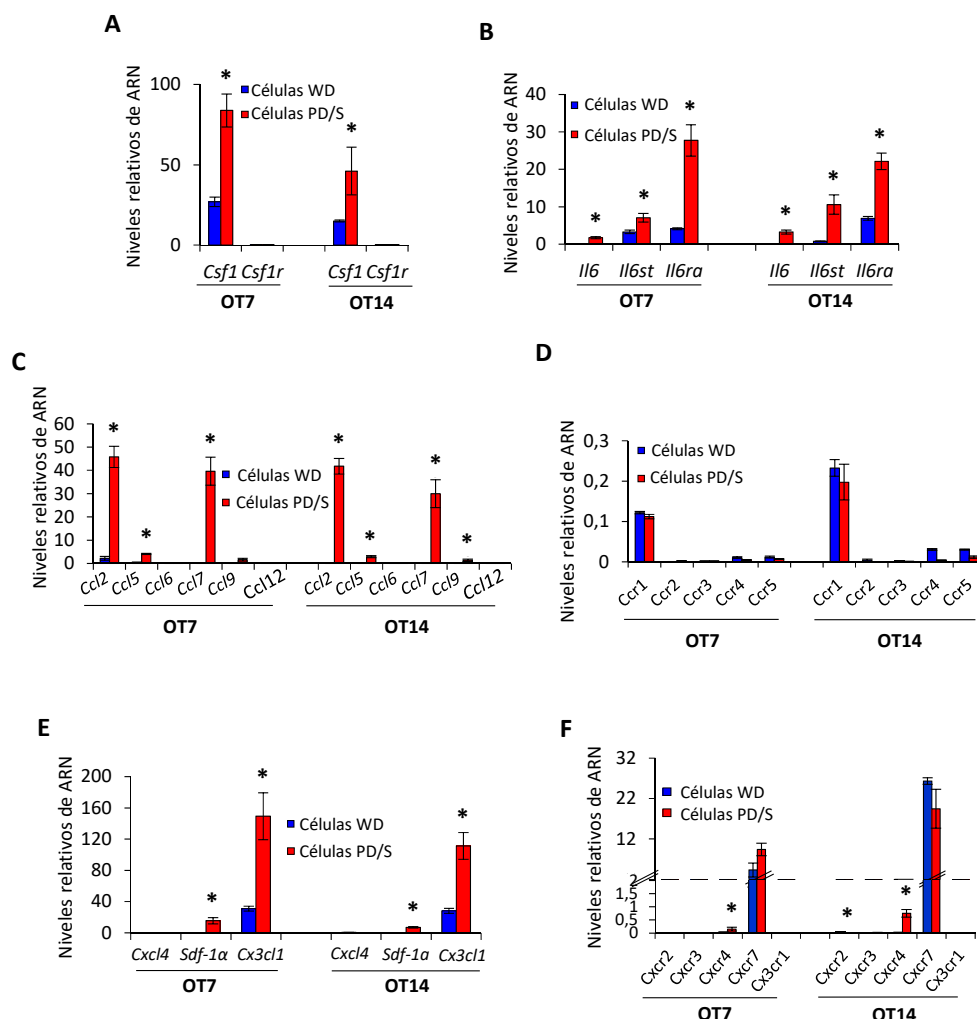


Figura 44. Análisis de la expresión de citoquinas y sus receptores en las células tumorales aisladas de WD-SCCs y PD/S-SCCs. A-F) Los resultados indican los niveles de ARN (media $\pm$ SE) de los genes indicados, relativos a *Gapdh*, en las células PD/S y WD de los linajes indicados, cuantificados mediante qRT-PCR. Las diferencias significativas entre los grupos comparados son indicadas con * (t-test; $p < 0.05$).

En este sentido, múltiples estudios demostraron la implicación de IL-6 y SDF-1 α en el desarrollo de metástasis en diferentes tipos de tumores (Sun et al. 2003; Balkwill 2004a; Grivennikov and Karin 2008; Yadav et al. 2011; Chang et al. 2013). Además, se ha descrito una interacción funcional entre las vías de PDGFR α y SDF-1 α que sería responsable de promover la migración celular y metástasis en glioblastoma y cáncer de mama (Liu et al. 2011; Sciacaluga et al. 2013). Dado que nuestros estudios demostraron que la activación de la vía de PDGFR α estimula la migración de las L-CSCs y el desarrollo de metástasis, decidimos centrar nuestros estudios en el análisis de la vía de SDF-1 α en los SCCs de piel avanzados.

4. IMPACTO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR SDF-1 α EN EL CRECIMIENTO DE LOS PD/S-SCCs Y EN EL DESARROLLO DE METÁSTASIS

4.1. La activación de la vía de PDGFR α induce la expresión de SDF-1 α en las CSCs de SCCs avanzados

Con el objetivo de analizar si la actividad de PDGFR α podía regular la vía de SDF-1 α en los PD/S-SCCs, comparamos mediante qRT-PCR la expresión de *Sdf-1a* en células PD/S que presentaban una fuerte expresión y activación de la vía de PDGFR α (sh-control), y en células PD/S con expresión interferida de este receptor (sh-PDGFR α) de diferentes linajes (Figura 45A). Nuestros resultados mostraron que la expresión de esta citoquina se reducía significativamente cuando la vía de PDGFR α estaba bloqueada (Figura 45B). De acuerdo con estos resultados, observamos que los niveles de SDF-1 α , analizados mediante ensayos de ELISA, disminuían en el medio de cultivo de las células sh-PDGFR α respecto al de las sh-control (Figura 45C).

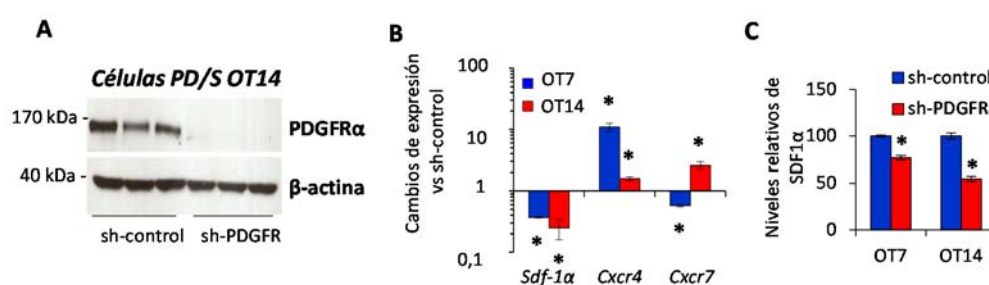


Figura 45. La inhibición de PDGFR α reduce la expresión y secreción de SDF-1 α . **A)** Expresión de PDGFR α en células PD/S control (sh-control) y transducidas con el sh-ARN de PDGFR α (sh-PDGFR α). β -actina se utilizó como control de carga. **B)** Los resultados (media $\pm$ SE) muestran los niveles de ARN de *Sdf-1a*, *Cxcr4* y *Cxcr7* en las células sh-PDGFR α , respecto a las células control (sh-control). **C)** Niveles de SDF-1 α (media $\pm$ SE) en el medio de cultivo de las células sh-PDGFR α respecto a las células sh-control. Las diferencias significativas entre los grupos comparados son indicadas con * (t-test; $p < 0.05$).

Por otra parte, observamos que la expresión *Cxcr4* se inducía de forma significativa en las células con una reducida actividad de PDGFR α , mientras que la expresión de *Cxcr7* se inducía o inhibía de forma variable en las células PD/S de diferentes linajes (Figura 45B). Es importante remarcar que a pesar de estos cambios, los niveles de expresión de *Cxcr7* fueron siempre superiores a los de *Cxcr4* en las diferentes células analizadas.

Estos resultados indican que la activación de la vía de PDGFR α induce la producción de SDF-1 α en las células PD/S, produciéndose una interacción funcional entre ambas vías. Por lo tanto, decidimos analizar la relevancia de la vía de SDF-1 α regulando la proliferación y diseminación de las L-CSCs y en definitiva, promoviendo el crecimiento y el desarrollo de metástasis en los PD/S-SCCs.

4.2. La vía de señalización mediada por SDF-1 α se induce de forma autocrina en las CSCs de los SCC avanzados

Aunque nuestros estudios previos demostraron que las células WD y PD/S mantenidas en cultivo estaban fuertemente enriquecidas en CSCs y conservaban sus características, quisimos comparar la expresión tanto de *Sdf-1a* como de sus receptores en las E-CSCs y L-CSCs, aisladas mediante FACS-sort de WD-SCCs y PD/S-SCCs. Los análisis de qRT-PCR demostraron que se producía una fuerte inducción en la expresión de *Sdf-1a* (Figura 46A), así como de su receptor *Cxcr7* en las L-CSCs, respecto a las E-CSCs (Figura 46B). Sin embargo, las L-CSCs presentaban una menor expresión de *Cxcr4* que las E-CSCs. Es importante remarcar que mientras que las células PD/S en cultivo expresaban niveles más elevados de *Sdf-1a* que las L-CSCs, la expresión de *Cxcr4* se reducía en las células PD/S comparada con las L-CSCs (Figuras 44F y 46B).

Estas observaciones sugieren que la expresión de esta citoquina y sus receptores podría modificarse por las condiciones de cultivo *in vitro* o que la expresión de estas proteínas podría estar modulada por otros factores del microambiente tumoral.

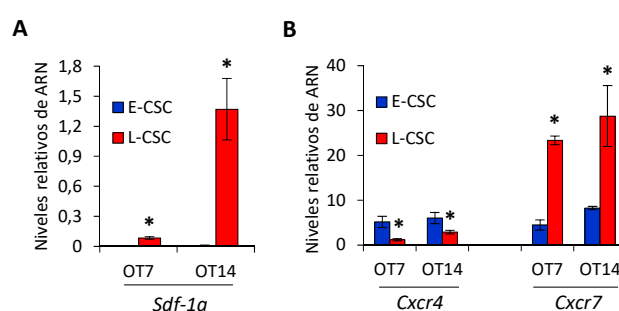


Figura 46. Las CSCs de los PD/S-SCCs inducen la expresión de *Sdf-1a* y *Cxcr7*. A y B) Los resultados (media $\pm$ SE) indican los niveles de ARN de *Sdf-1a* (A), *Cxcr4* y *Cxcr7* (B) relativo a la expresión de *Gapdh* en E-CSCs y L-CSCs procedentes de dos linajes de progresión tumoral. Las diferencias significativas entre los grupos comparados son indicadas con * (t-test; $p < 0.05$).

Además, analizamos la concentración de esta citoquina en el medio de cultivo de las células WD y PD/S mediante ensayos de ELISA. Coincidiendo con los resultados de qRT-PCR, observamos que las células PD/S sintetizaban y secretaban al medio mayores niveles de SDF-1 α que las células WD (Figura 47A).

Por otra parte, el análisis de tumores WD-SCCs y PD/S-SCCs mediante citometría de flujo, confirmó que los SCCs avanzados presentaban una población mayor de células tumorales $\alpha 6$ -integrina⁺/CXCR4⁺ y $\alpha 6$ -integrina⁺/CXCR7⁺ que los WD-SCCs (Figura 47B). Dado que las células PD/S sintetizaban elevados niveles de SDF-1 α y expresaba sus receptores, la vía de SDF-1 α podría estar activada de forma autocrina en las células tumorales, y más concretamente en las L-CSCs de los tumores avanzados.

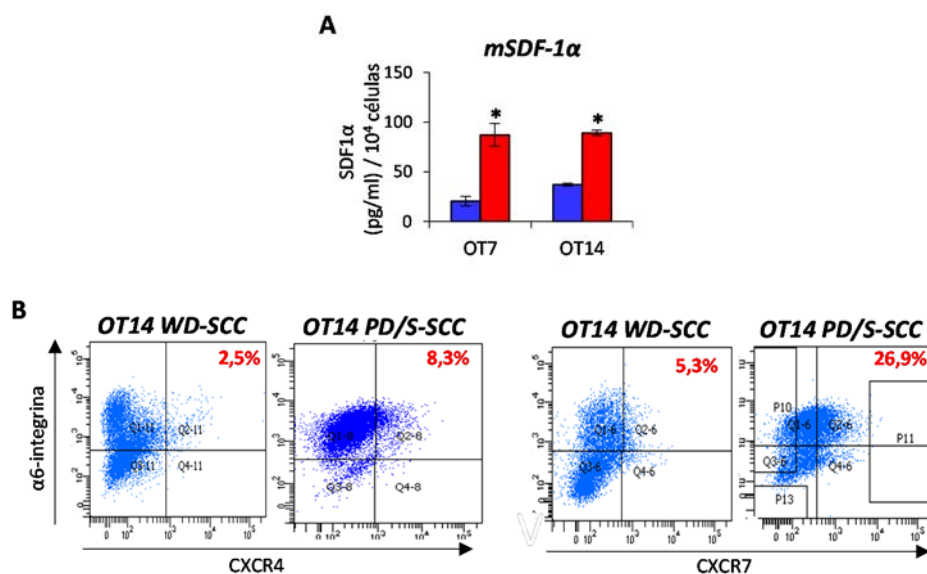


Figura 47. Análisis de la vía de señalización de SDF-1α en células aisladas de WD-SCCs y PD/S-SCCs. **A)** Los resultados muestran los niveles de SDF-1α analizados mediante ELISA en medio de cultivo de células aisladas de WD-SCCs (células WD) y de PD/S-SCCs (células PD/S). **B)** Resultados representativos de la cuantificación mediante citometría de flujo de células tumorales (α6-integrina⁺) que expresan CXCR4 y CXCR7 en WD-SCCs y PD/S-SCC del linaje OT14. Las diferencias significativas entre los grupos comparados son indicadas con * (t-test; p<0.05).

Para verificar esta hipótesis, inicialmente se analizó la fosforilación de algunos de los efectores de la vía SDF-1α en las células WD y PD/S. Los resultados mostraron que en condiciones basales (sin factores añadidos en el medio), la fosforilación de FAK y STAT3 estaba fuertemente inducida en las células PD/S comparado con las células WD (Figura 48A).

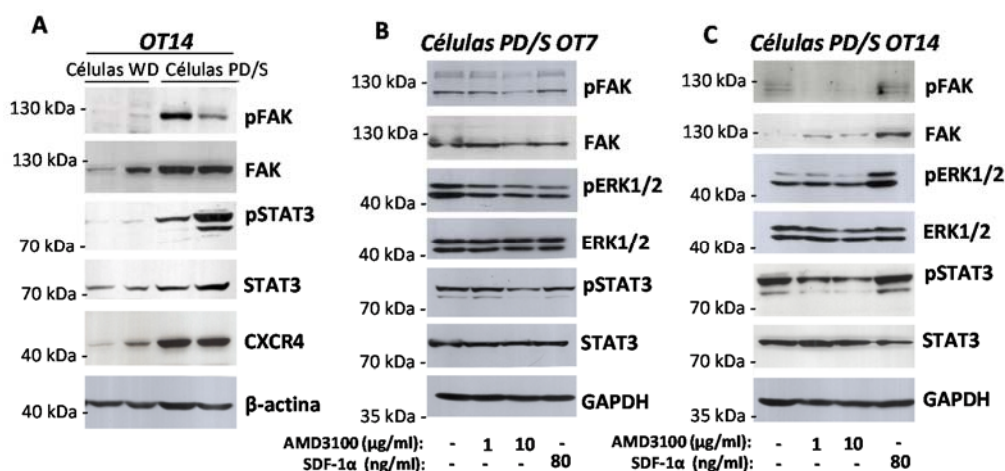


Figura 48. Las células PD/S activan de forma autocrina de la vía de SDF-1α. **A)** Resultados representativos de los niveles de CXCR4, así como de FAK, STAT3 y sus formas fosforiladas en células WD y PD/S. **B y C)** Niveles de ERK1/2, FAK, STAT3 y sus formas fosforiladas en células PD/S de tumores OT7 (**B**) y OT14 (**C**) crecidas en ausencia o presencia de las dosis indicadas de SDF-1α y AMD3100. Se utilizó β-actina (**A y B**) y GAPDH (**C**) como control de carga de proteínas.

El tratamiento con SDF-1 α no incrementó significativamente los niveles de pERK1/2, pFAK ni de pSTAT3 en las células PD/S (Figuras 48B y 48C). Sin embargo, en condiciones basales, la fosforilación de estos efectores disminuía en respuesta a AMD3100, un inhibidor antagonista de CXCR4 (Figuras 48B y 48C). Estos resultados indican que la vía de SDF-1 α se activa de forma autocrina en las L-CSCs de los tumores PD/S-SCCs.

4.3. La activación autocrina de la vía de SDF-1 α promueve la proliferación y migración de las L-CSCs

A continuación, analizamos si la vía de SDF-1 α regulaba la proliferación/supervivencia y la migración de las L-CSCs.

Inicialmente, analizamos la proliferación de las células PD/S en presencia o ausencia de SDF-1 α y AMD3100 en el medio, mediante ensayos de MTT. El tratamiento con SDF-1 α solo promovió ligeramente la proliferación de las células PD/S. Sin embargo, la proliferación de estas células se inhibió de forma significativa en respuesta de dosis crecientes de AMD3100, tanto en presencia como en ausencia de SDF-1 α (Figuras 49A y 49B).

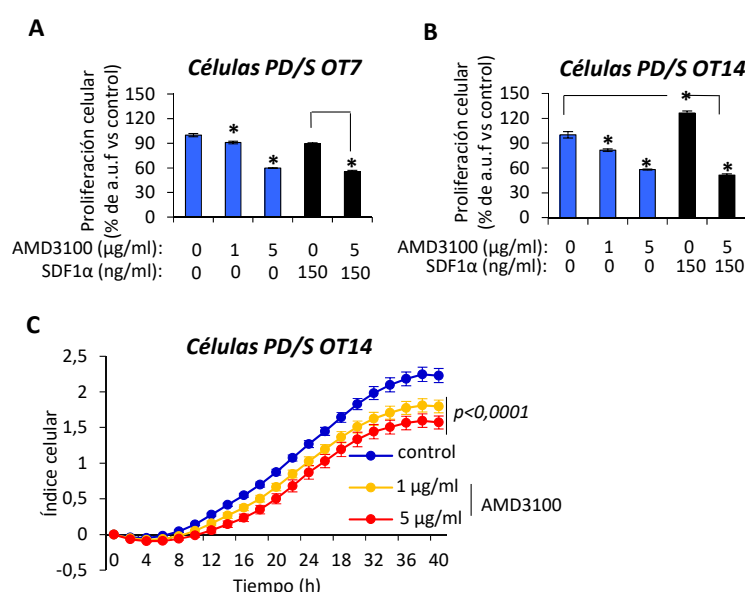


Figura 49. La activación autocrina de la vía de SDF-1 α promueve la proliferación y la invasión de células PD/S. **A y B)** La proliferación de las células PD/S de los linajes OT7 (**A**) y OT14 (**B**) fue analizada mediante ensayos de MTT en ausencia o presencia de las dosis indicadas de SDF-1 α y AMD3100. Los resultados indican el porcentaje de proliferación (media de a.u.f $\pm$ SE) en cada grupo respecto al grupo control. **C)** Los resultados muestran la capacidad de invasión de las células PD/S, indicada por el índice celular, analizada en tiempo real en ausencia o presencia de dosis crecientes de AMD3100. Las diferencias significativas entre los grupos comparados son indicadas con * (t-test; $p < 0.05$).

Por otra parte, evaluamos el papel de la vía de SDF-1 α en la migración e invasión de las células PD/S. Para ello, las células fueron sembradas en ausencia o presencia de AMD3100 en placas modificadas

Boyden cubiertas de matrigel. Nuestros resultados muestran que la capacidad de invasión y migración de estas células disminuía significativamente en respuesta a diferentes dosis de AMD3100 (Figura 49C).

En conjunto, estos resultados demuestran que la activación autocrina de SDF-1 α promueve la proliferación, así como la invasión y migración de las L-CSCs.

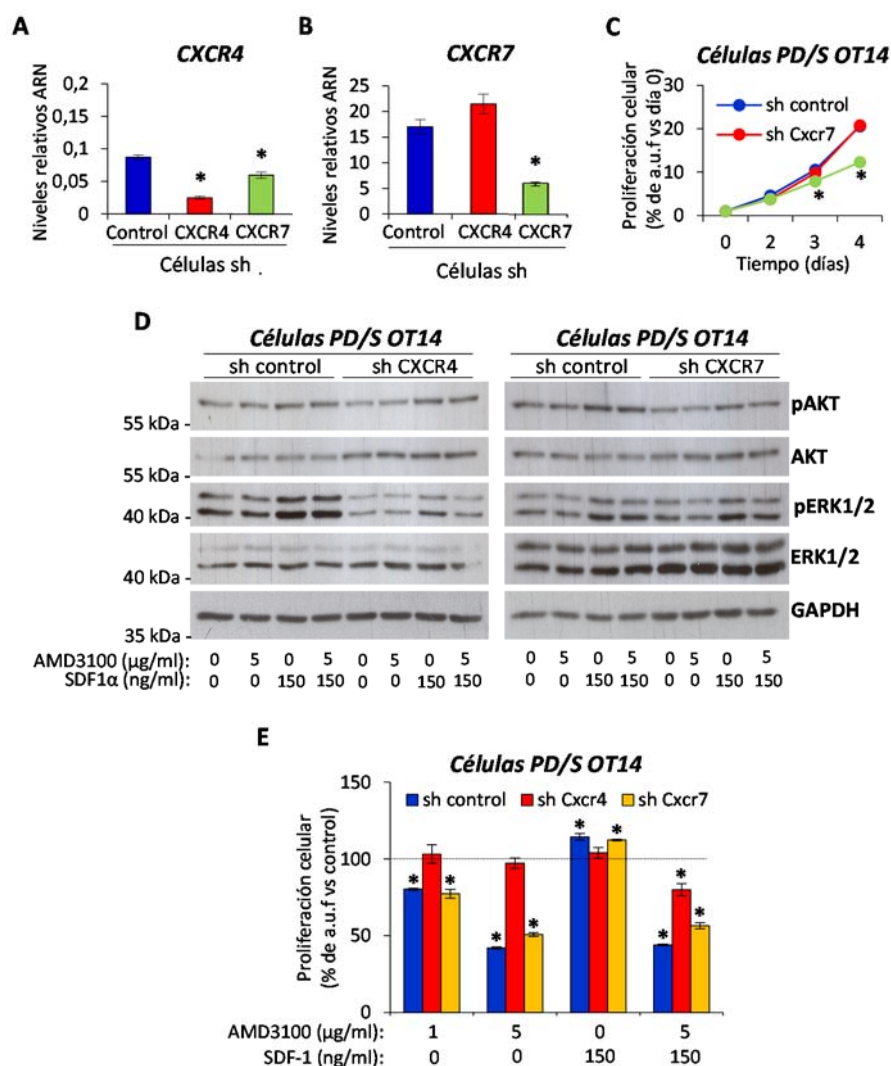


Figura 50. La inhibición de la actividad de CXCR4 reduce la proliferación de las células PD/S. **A y B)** Los resultados indican los niveles de ARN (media $\pm$ SE) de *Cxcr4* (**A**) y *Cxcr7* (**B**) relativos a la expresión de *Gapdh* en las células PD/S sh-control, sh-CXCR4 y sh-CXCR7. **C)** Proliferación (media de a.u.f. $\pm$ SE) de las células PD/S indicadas, analizadas mediante ensayos de MTT. **D)** Niveles de pAKT y pERK1/2 en las células indicadas. Se utilizó GAPDH como control de carga de proteínas. **E)** Los resultados indican la proliferación de las células sh-control, sh-CXCR4 y sh-CXCR7 (media $\pm$ SE) en presencia de las dosis indicadas de AMD3100 y SDF-1 α , relativo a sus respectivos controles (células crecidas en ausencia de citoquina e inhibidor, indicado por la línea punteada azul). Las diferencias significativas entre los grupos comparados son indicadas con * (t-test; $p < 0.05$).

A continuación, decidimos evaluar qué receptores (CXCR7 y/o CXCR4) eran los responsables de mediar los efectos de SDF-1 α en las células PD/S. Para ello, generamos células PD/S con la expresión interferida de CXCR7 (sh-CXCR7) y CXCR4 (sh-CXCR4). Mediante qRT-PCR

comprobamos que las células sh-CXCR4 y sh-CXCR7 mostraban una expresión disminuida de *Cxcr4* (28,5% de expresión vs sh-control; Figura 50A) y *Cxcr7* (48,1% de expresión vs sh-control; Figura 50B). Además, observamos que mientras que la expresión de *Cxcr7* se mantenía en las células sh-CXCR4, las células sh-CXCR7 presentaban una reducción de la expresión de *Cxcr4* (69,1% vs sh-control) (Figuras 50A y 50B). Por lo tanto, mientras que las células sh-CXCR4 eran solo deficientes en CXCR4, las células sh-CXCR7 eran deficientes en CXCR7 pero presentaban además una pequeña disminución de CXCR4, revelando estos resultados que la actividad de CXCR7 podría regular la expresión de *Cxcr4*.

Mediante ensayos de MTT comparamos la capacidad de proliferación de estas células y observamos que, mientras que las células sh-control y sh-CXCR7 proliferaban de forma similar, las células sh-CXCR4 presentaban una tasa de proliferación significativamente inferior a las células sh-control (Figura 50C), coincidiendo con una disminución de los niveles de pERK1/2 observados en las células PD/S sh-CXCR4 (Figura 50D). A pesar de que la pérdida de CXCR7 lleva asociada una disminución de CXCR4, ésta fue insuficiente para modificar la proliferación de las células sh-CXCR7.

A diferencia de las células sh-control y sh-CXCR7, la proliferación de las células sh-CXCR4 no se inhibía en respuesta a AMD3100 en condiciones basales (Figura 50E). Además, en respuesta a SDF-1 α , la inducción de pERK1/2 se conservaba en las células sh-CXCR7, mientras que estaba atenuada en las células sh-CXCR4 (Figura 50D). Estos resultados indican que AMD3100 actúa principalmente como un inhibidor de CXCR4, y que la activación de la vía de SDF-1 α /CXCR4 induce la proliferación de las células PD/S.

4.4. La activación de la vía de SDF-1 α promueve el crecimiento de los PD/S-SCCs y el desarrollo de metástasis

Para evaluar la relevancia de la vía de SDF-1 α *in vivo*, se inyectaron subcutáneamente células PD/S sh-control, así como células sh-CXCR4 y sh-CXCR7 en ratones inmunodeficientes, y se evaluó el impacto de la interferencia de estos receptores en el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. Los resultados de estos experimentos mostraron que el bloqueo de la actividad de CXCR7 no afectaba al crecimiento de los SCCs avanzados, mientras que una disminución de la actividad de CXCR4 inhibía significativamente el crecimiento tumoral (Figura 51A).

El análisis mediante citometría de flujo mostró que los tumores sh-CXCR4 presentaban una disminución significativa de células $\alpha 6$ -integrina⁺/CXCR4⁺, mientras que mantenían un porcentaje similar de células $\alpha 6$ -integrina⁺/CXCR7⁺ que los tumores sh-control. Sin embargo, la población de células $\alpha 6$ -integrina⁺/CXCR7⁺ y $\alpha 6$ -integrina⁺/CXCR4⁺ disminuía considerablemente en los tumores sh-CXCR7 (Figura 51B).

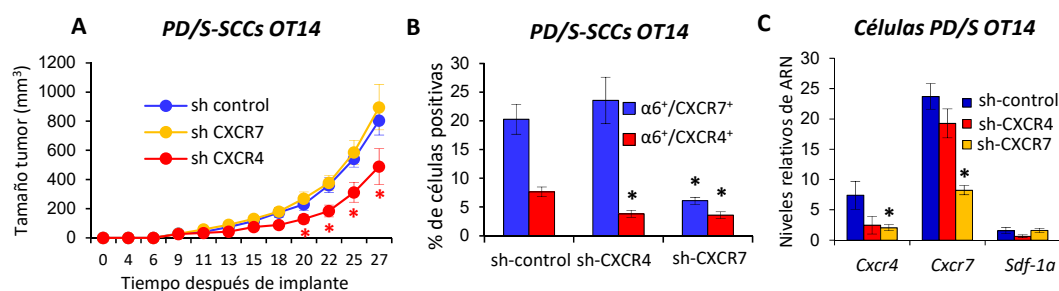


Figura 51. La interferencia de CXCR4 en las L-CSCs bloquea el crecimiento tumoral. **A)** Cinética de crecimiento de los tumores (media del tamaño del tumor $\pm$ SE) generados tras el implante de células sh-control, sh-CXCR4 y sh-CXCR7 en ratones inmunodeficientes. **B)** Los resultados indican el porcentaje de células $\alpha 6$ -integrina⁺ (media $\pm$ SE) con expresión de CXCR4 y CXCR7 en los tumores indicados, cuantificado mediante citometría de flujo. **C)** Niveles de ARN (media $\pm$ SE) de *Cxcr4*, *Cxcr7* y *Sdf-1a* relativos a *Gapdh* en células aisladas de los tumores sh-control, sh-CXCR4 y sh-CXCR7. Las diferencias significativas entre los grupos comparados son indicadas con * (t-test; $p < 0.05$).

De acuerdo con estos resultados, observamos que la expresión de *Cxcr7* se mantenía en las células tumorales $\alpha 6$ -integrina⁺ aisladas mediante FACS-sort de los tumores sh-CXCR4, mientras que la expresión de *Cxcr4* disminuía significativamente en las células $\alpha 6$ -integrina⁺ aisladas de los tumores sh-CXCR7 (Figura 51C). En estas condiciones, la expresión de *Sdf-1a* no se modificó significativamente en las células tumorales sh-CXCR4 y sh-CXCR7 (Figura 51C). Por lo tanto, estos resultados indican que, de forma similar a lo observado *in vitro*, *in vivo* la expresión de *Cxcr4* estaba regulada por la actividad de CXCR7.

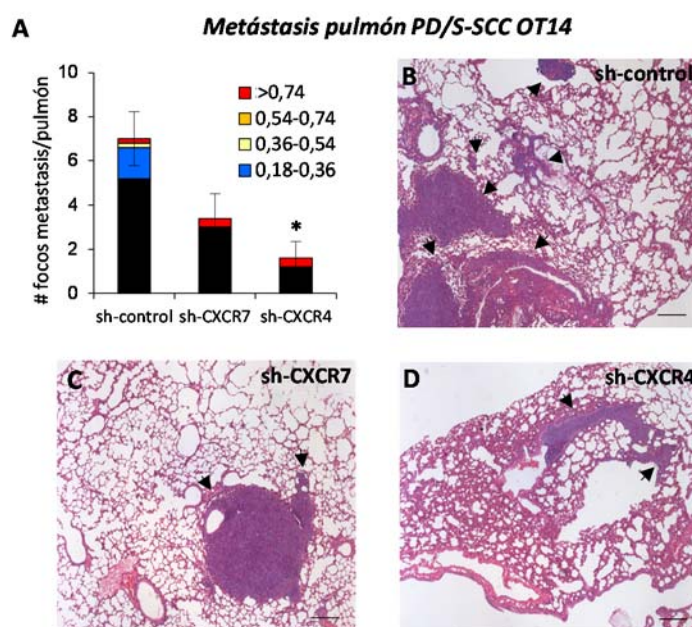


Figura 52. La interferencia de CXCR4 en las L-CSCs reduce el desarrollo de metástasis en PD/S-SCCs. **A)** Los resultados indican el valor medio ($\pm$ SE) de focos metastásicos detectados por sección pulmonar (categorizados por tamaño, mm²) en ratones implantados con células sh-control, sh-CXCR4 y sh-CXCR7. Las diferencias significativas entre los grupos comparados son indicadas con * (t-test; $p < 0,05$). **B-D)** Imágenes representativas de las lesiones metastásicas (indicadas con flechas) detectadas en los pulmones de los ratones indicados. Barra de escala, 200 μ m.

A continuación, estudiamos el efecto de la interferencia de CXCR4 y CXCR7 en el desarrollo de metástasis. Con el fin de detectar las lesiones metastásicas que crecían de forma asincrónica al tumor, los tumores sh-control, sh-CXCR4 y sh-CXCR7 fueron reseccionados cuando alcanzaron un tamaño similar (alrededor de 1 cm³), y 19 días después de resección se analizó el desarrollo de metástasis en los pulmones.

El análisis histológico de los pulmones reveló que los tumores sh-CXCR4 generaron significativamente menos lesiones metastásicas que los tumores sh-control. Aunque los tumores sh-CXCR7 desarrollaron un menor número de metástasis que los tumores sh-control, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 52).

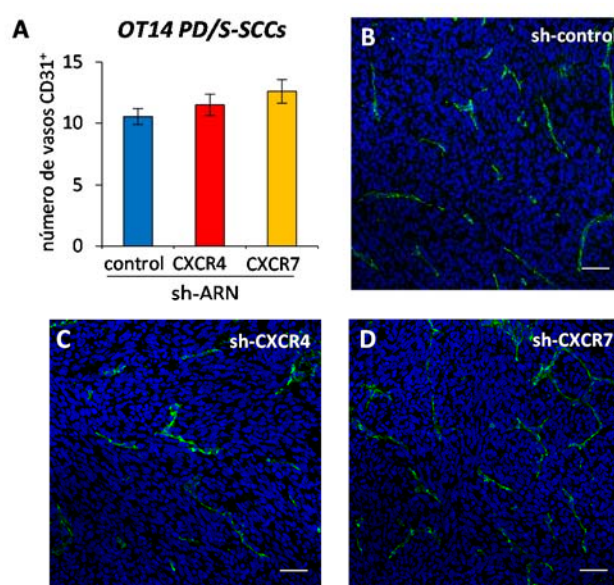
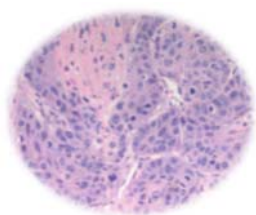


Figura 53. La interferencia de CXCR4 y CXCR7 en las L-CSCs no modifica la angiogénesis de los PD/S-SCCs. **A)** Los resultados indican el número de vasos con expresión CD31 (media $\pm$ SE) detectados en secciones de tumores generados tras el implante de células sh-control, sh.CXCR4 y sh-CXCR7. **B-D)** Imágenes representativas de los tumores indicados, mostrando los vasos sanguíneos detectados mediante marcaje con anticuerpos anti-CD31. Barra de escala: 40 μ m.

Dado que el desarrollo de metástasis podría estar condicionado por posibles alteraciones en la angiogénesis, cuantificamos el número de vasos CD31⁺ en secciones de tumores sh-control, sh-CXCR4 y sh-CXCR7 mediante ensayos de inmunohistoquímica. Nuestros resultados muestran que la inhibición de la actividad de CXCR4 y CXCR7 en las células tumorales no provocaba cambios en la formación de vasos sanguíneos en los PD/S-SCCs (Figura 53) e indican que la activación autocrina de la vía de SDF-1 α en las L-CSCs promueve el desarrollo de metástasis, y que este efecto es mediado principalmente por CXCR4.

Por lo tanto, el conjunto de nuestros resultados demuestran que la activación de la vía de PDGFR α en las L-CSCs induce la vía de SDF-1 α /CXCR4, la cual promueve la migración e invasión de estas células y el desarrollo de metástasis en los SCCs avanzados.

Discusión



Las células madre juegan un papel esencial en el mantenimiento y la reparación de los tejidos adultos. Así, mediante diferentes ensayos funcionales y de trazado de linaje, se ha demostrado el potencial de auto-renovación y diferenciación de las SCs. Estrategias similares se han aplicado en el estudio de tumores sólidos, demostrando la existencia de una población de células indiferenciadas, las CSCs. Actualmente, se considera que esta población sería la responsable del crecimiento tumoral a largo plazo y de las recidivas después de la terapia, así como del desarrollo de metástasis (Beck & Blanpain 2013). Dada la relevancia clínica de las CSCs, es importante determinar qué mecanismos regulan la proliferación, supervivencia y diseminación de esta población de células durante la progresión de los SCCs, con el fin de facilitar el diseño de nuevas terapias anti-tumorales dirigidas a erradicar esta población celular y bloquear el crecimiento agresivo y el desarrollo de metástasis asociado a los SCCs avanzados.

EL ORIGEN FOLICULAR DE LAS CÉLULAS MADRE EPIDÉRMICAS PUEDE FACILITAR LA PROGRESIÓN TUMORAL Y EL DESARROLLO DE PD-SCCs DE PIEL

El primer objetivo de la presente tesis doctoral se centró en determinar si el origen celular de estas lesiones, ya fuera la población de SCs de la IFE (K14⁺-SCs) o del bulge de los folículos (LGR5⁺-SCs) y su progenie, podría influir en la progresión de los SCCs y en el desarrollo de PD-SCCs en modelos de ratón K14-HPV16.

Los ratones K14-HPV16 sobreexpresan las oncoproteínas E6 y E7 del papilomavirus humano HPV16 en los queratinocitos basales, incluyendo las SCs de la IFE y de los folículos. La expresión de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV16 se ha asociado con el desarrollo de SCCs de piel tanto en humanos (Hama et al. 2006) como en ratón (Arbeit et al., 1994). Durante los primeros meses de vida, los ratones K14-HPV16 desarrollan hiperplasias y displasias en la piel, y un año después del nacimiento desarrollan SCCs (Coussens et al., 1996). En nuestros ratones (K14-HPV16 fondo mixto FVB/C57Bl6 F1), estos SCCs mostraron ser WD-SCCs (74%) y PD-SCCs (26%). Para acelerar el desarrollo de tumores, estos ratones fueron tratados con DMBA-TPA. En este caso, la mayoría de los tumores fueron WD-SCCs (95,3%), siendo los PD/S-SCCs menos frecuentes (4,69%) (ver Anexo).

Dado que todas las células basales (K14), expresaban E6/E7, es probable que los tumores generados fueran de origen policlonal, conteniendo células tumorales procedentes de la IFE y del folículo. Para determinar si las SCs de la IFE y del bulge, así como su progenie, contribuían al desarrollo de WD-SCCs o de PD-SCCs, trazamos el linaje de estas células mediante la expresión de YFP o LacZ. Los estudios realizados con el modelo de ratón E6/E7-K14CreYFP, que permite trazar las K14⁺-SCs de la IFE y su progenie, mostraron que la sobreexpresión de E6 y E7 induce una expansión de la

población de células K14-YFP⁺ en la IFE y la generación de SCCs. Nuestros estudios no permiten determinar si la población YFP⁺ expandida son SCs, generadas por una activación de las divisiones simétricas, o si se produce una expansión de su progenie, como serían las células progenitoras generadas a partir de divisiones asimétricas de las K14⁺-SCs. Por otra parte, los tumores que contenían células YFP⁺, generados tras el tratamiento con DMBA-TPA, fueron mayoritariamente WD-SCCs, indicando que esta población de K14⁺-SCs de la IFE y su progenie contribuyen en mayor medida al desarrollo de WD-SCCs que al desarrollo de PD-SCCs. Estos resultados estarían de acuerdo con estudios recientes que demuestran que la sobreexpresión de KRas^{G12D} y la pérdida de p53 en las K14⁺-SCs de la IFE generan principalmente WD-SCCs que conservan características de diferenciación epitelial, determinadas por la expresión de EpCAM y E-cadherina, entre otros marcadores (Latil et al. 2016).

Por otro lado, nuestros estudios previos demostraron que la sobreexpresión de E6/E7 induce la proliferación de las LGR5⁺-SCs del bulge de los folículos, la acumulación de su progenie en esta localización y la movilización de esta población aberrante a la IFE, donde participan en el desarrollo de SCCs de piel (da Silva-Diz et al. 2013). Estos resultados estarían de acuerdo con estudios previos que demostraron que la sobreexpresión de KRas^{G12D} y la pérdida de función de p53 en las SCs de los folículos, mutaciones que alteran la proliferación y/o diferenciación de esta población de células, conducen al desarrollo de SCCs (Lapouge et al. 2011; White et al. 2011). En el presente estudio, nosotros además demostramos que en respuesta a la sobreexpresión de E6/E7 las LGR5⁺-SCs del bulge y su progenie pueden contribuir tanto al desarrollo de WD-SCCs como de PD-SCCs. Sin embargo, observamos que la frecuencia de SCCs indiferenciados, generados a partir de las LGR5⁺-SCs era superior al que se genera a partir de las K14⁺-SCs y su progenie. Dado que previamente demostramos que los PD-SCCs se generan a partir de la progresión de los WD-SCCs, sugerimos que si el origen de las SCs es folicular, se favorecería la progresión desde WD-SCCs a PD-SCCs. En este sentido, recientemente se mostró que la sobreexpresión de KRas^{G12D} y la pérdida de p53 en las LGR5⁺-SCs, genera en mayor medida tumores con características mixtas (epiteliales y mesenquimales) (70%) y SCCs mesenquimales e indiferenciados (25%) que si estas mutaciones se inducen en la población de SCs de la IFE-K14⁺ (70% de los SCCs con características epiteliales) (Latil et al. 2016). Estos últimos estudios demostraron que las LGR5⁺-SCs de la piel normal presentan una organización de la cromatina y un perfil transcripcional que favorece la inducción de EMT y la adquisición de un fenotipo mesenquimal durante la generación de SCCs, dando lugar preferentemente a tumores PD-SCCs. Por el contrario, la organización de la cromatina y la expresión de p63 y otros factores de transcripción tales como Klf5 en las K14⁺-SCs de la IFE determinan la generación de tumores que conservan características de diferenciación epitelial, y en consecuencia, WD-SCCs (Latil et al. 2016).

La diferencia entre la frecuencia de PD-SCCs generados a partir de los LGR5⁺-SCs observada en nuestros estudios y la reportada por el grupo del Dr Blanpain podrían deberse al tipo de mutaciones

que induce la generación de estos tumores. Así, la expresión de KRas oncogénico y la pérdida de p53 en las LGR5⁺-SCs podrían activar procesos que aumentarían de forma significativa la progresión de SCCs hacia un fenotipo mesenquimal, mientras que en nuestro caso, este proceso podría ser más paulatino, siendo inducido por la pérdida de la función de las proteínas Rb y p53, provocado por la sobreexpresión de E6 y E7, y la adquisición de otras mutaciones durante el proceso tumorigénico. En este sentido, observamos que mientras que la mayoría de los SCCs inducidos por DMBA-TPA en los ratones K14-HPV16 presentaban mutaciones en HRas y solo un 6% de los tumores presentaban mutaciones en KRas (ninguna en KRas^{G12D}), alrededor del 50% de los SCCs generados de forma espontánea presentaban diferentes mutaciones en KRas (7% de estos tumores con KRas^{G12D}) (ver Anexo). Además, uno de los modelos generados no mostró mutaciones oncogénicas previamente descritas en HRas ni KRas, siendo igualmente capaz de progresar de WD-SCCs a PD-SCCs. Una progresión más paulatina permitiría en nuestro caso observar, en el momento del sacrificio de los ratones, una frecuencia más baja de PD-SCCs, siendo ésta similar a la de los WD-SCCs.

El conjunto de nuestros resultados muestra que, tanto la población de SCs de la IFE y su progenie, como la población de SCs del bulge del folículo y su progenie, pueden ser el origen de la formación de WD-SCCs y PD-SCCs en los ratones K14-HPV16. Sin embargo, es probable que las características de las SCs del folículo favorezcan más la progresión de WD-SCCs a PD-SCCs que si el origen de estas lesiones recae en las SCs de la IFE.

LAS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y FUNCIONALES DE LAS CSCs CAMBIAN DURANTE LA PROGRESIÓN DE LOS SCCs DE PIEL.

La generación de linajes de progresión de SCCs permitió a nuestro grupo demostrar que una gran parte de los WD-SCCs de piel con características epiteliales, progresan a tumores pobremente diferenciados, que eventualmente presentan morfología fusocelular y características mesenquimales (PD/S-SCCs), recapitulando la progresión tumoral descrita en otros modelos de SCCs de piel (White et al. 2013). Los PD/S-SCCs presentan un crecimiento más agresivo y una mayor capacidad para desarrollar metástasis a órganos distantes, con un menor tiempo de latencia que los WD-SCCs. Estas características reduce significativamente la supervivencia de los ratones portadores de estos tumores (da Silva-Diz et al. 2016).

Por otra parte, estudios previos describieron que SOX2 y las vías de señalización de WNT/ β -catenina, VEGF y TGF β controlan la auto-renovación y función de las CSCs en las primeras etapas de progresión de los SCCs de piel (Malanchi et al. 2008; Beck et al. 2011; Schober & Fuchs 2011). Sin embargo, al inicio de la presente tesis doctoral no se conocía si los mecanismos reguladores de las CSCs cambian durante la progresión tumoral, coincidiendo con el crecimiento más agresivo y la mayor capacidad para desarrollar metástasis que presentan los SCCs de estadios avanzados (Cherpelis et al. 2002).

La frecuencia y el perfil de expresión génica de las CSCs cambian durante la progresión de los SCCs de piel

Los resultados descritos en esta tesis demuestran que durante la progresión tumoral se produce una expansión de la población de CSCs $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ y una fuerte inducción del programa EMT, coincidiendo con lo descrito previamente en otros modelos de ratón (Lapouge et al. 2012). Es importante destacar que estos cambios se observaron también en PD/S-SCCs generados espontáneamente en los ratones K14-HPV16 inmunocompetentes, indicando que estos procesos no se producen como consecuencia del crecimiento de los SCCs durante largos períodos de tiempo en ratones inmunodeficientes. La inducción de EMT observada en los PD/S-SCCs estaba caracterizada por la pérdida de la expresión de E-cadherina, así como por el aumento en la expresión de Vimentina y de los factores de transcripción *Snai1*, *Twist*, *Zeb1* y *Zeb2*, los cuales inducen este proceso (Peinado et al. 2007; Acloque et al. 2009). Tanto la expansión de las CSCs como la fuerte inducción de EMT correlacionan con el crecimiento tumoral más agresivo y la mayor capacidad de generar metástasis que exhiben los PD/S-SCCs.

La caracterización molecular de los WD-SCCs y PD/S-SCCs demostró que, coincidiendo con la expansión de la población de las CSCs, se induce la expresión de otros marcadores de SCs epidérmicas (*CD34*, *Hmng3*, *Lrig1*) y embrionarias (*Sox2*, *Nanog*), mientras que la expresión de otros marcadores de SCs del folículo, como *Sox9* o *Cdh3* (P-cadherina) disminuye en los PD/S-SCCs. Estos resultados sugieren que la regulación de la expresión de estas proteínas podría favorecer la aparición del fenotipo indiferenciado y mesenquimal característico de los PD/S-SCCs. De acuerdo con la expansión de la población de células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ y una inducción de las características *stemness*, se observó un incremento significativo de la capacidad iniciadora de tumores en los PD/S-SCCs, corroborando lo descrito anteriormente en SCCs avanzados en otros modelos de ratones (Lapouge et al. 2012). Además, estos resultados estarían de acuerdo con estudios previos que demuestran que las características de *stemness* están ligadas a la activación del programa EMT en células tumorales de mama (Mani et al. 2008; Morel et al. 2008).

Por otra parte, nuestros resultados indican que la jerarquía celular descrita en WD-SCCs y otros tipos de tumores está alterada en los SCCs de estadios avanzados, ya que las células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ mostraron una capacidad similar de iniciación tumoral que las $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺, y ambas poblaciones mostraron la incapacidad para diferenciarse y adquirir características epiteliales. Sin embargo, nosotros centramos nuestros estudios en las células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺, ya que previamente se demostró que la capacidad iniciadora de tumor de las células CD34⁺ se reduce significativamente después de implantes seriados y sólo las células CD34⁺ mantienen la capacidad de auto-renovación y de propagar el tumor a largo plazo (Lapouge et al. 2012).

Además, nuestros resultados demuestran que las características de las CSCs cambian durante la progresión tumoral. Por una parte, observamos que la expresión del marcador epitelial EpCAM se reduce de forma significativa en las CSCs de los PD/S-SCCs. Por otra parte, la comparación de los perfiles de expresión génica de las $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺-CSCs aisladas de tumores WD-SCCs (E-CSCs) y las aisladas de PD/S-SCCs (L-CSCs), demostró que la expresión de un grupo importante de genes cambia durante la progresión. Estos análisis nos han permitido establecer una firma génica para las L-CSCs, caracterizada principalmente por la inducción de genes asociados con *stemness*, activación del programa EMT, proliferación celular, regulación negativa de la apoptosis, motilidad celular y el desarrollo de metástasis, así como por la disminución de la expresión de genes relacionados con la diferenciación celular, el mantenimiento de las uniones entre células y la adhesión celular. Estas observaciones, junto con la incapacidad de las L-CSCs para diferenciarse y adquirir características epiteliales sugieren que la expansión de CSCs puede ser consecuencia de una auto-renovación sostenida y de la inhibición de la diferenciación. Algunos de los genes de la firma génica de las L-CSCs también están similarmente desregulados en los PD/S-SCCs de piel generados en otros modelos de ratón, los cuales presentan características mesenquimales similares (Wong et al. 2013).

Además, observamos que la expresión de factores relacionados con las vías de señalización de WNT/ β -catenina, FGFR, PDGFR y EGFR, los cuales han sido asociados previamente con progresión tumoral en otros tipos de tumores (Clevers 2006; Demoulin & Essaghir 2014b; Dienstmann et al. 2014), estaban alterados en las L-CSCs, indicando que la alteración de estas vías podría regular la proliferación, supervivencia y diseminación de las CSCs, promoviendo el crecimiento agresivo y la mayor capacidad metastásica de los PD/S-SCCs.

La vía de señalización de WNT/ β -catenina está atenuada en los SCCs de piel avanzados

La vía de señalización de WNT/ β -catenina juega un papel importante en el mantenimiento de las SCs adultas y en el desarrollo embrionario. Además, se ha relacionado con tumorigénesis, progresión tumoral y metástasis en varios tipos de cáncer (Reya & Clevers 2005; Katoh & Katoh 2007).

En este sentido, estudios previos demostraron que la vía de señalización de β -catenina es necesaria para promover la proliferación de las CD34⁺-CSCs en estadios iniciales de progresión de los SCCs de piel de ratón (Malanchi et al. 2008). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que en estadios avanzados de progresión, se produce una drástica disminución en la expresión de β -catenina. Además, mediante la utilización de un vector reportero, demostramos que mientras que una población de células localizada en contacto directo con el estroma, donde se localizan las CSCs en los WD-SCCs (Schober & Fuchs 2011; Beck et al. 2011) presentaban actividad transcripcional de β -catenina, esta actividad se atenuaba drásticamente en los PD/S-SCCs. Estos resultados indican que la vía de señalización de la β -catenina no es esencial para promover la proliferación y la supervivencia de la población de CSCs expandida en los SCCs de estadios avanzados.

La inhibición de esta vía podría producirse como consecuencia de la reducción de la expresión de la β -catenina, pero además, podría estar relacionada con la disminución de la expresión de *Wnt-4* y la inducción de la expresión de *Wnt-5a* observada en nuestros resultados del array. Así, estudios previos han demostrado que la expresión de WNT-5a en células epiteliales del alveolo pulmonar, regula negativamente la vía canónica de WNT/ β -catenina, provocando una reducción en la capacidad de regeneración del pulmón (Baarsma et al. 2017). Por otro lado, se ha descrito que la inhibición de WNT-4 y la sobreexpresión de WNT-5a, son eventos que desencadenan la inducción de EMT en líneas celulares humanas de SCC oral (Taki et al. 2003).

Las CSCs de los SCCs avanzados presentan atenuada la vía de señalización de EGFR y activan de forma autocrina la vía de FGFR1 para promover su proliferación y el crecimiento de los PD/S-SCCs

La sobreexpresión de EGFR se ha asociado con un aumento de la proliferación y la invasión celular en diferentes tipos de tumores humanos, y correlaciona con un mal pronóstico en pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSLC) y de SCC de cabeza y cuello (HNSCC) (Hynes & Lane 2005; Carlos L. Arteaga & Engelman 2014). Nuestros datos muestran que las CSCs de WD-SCCs aisladas de diferentes linajes tumorales muestran una activación autocrina y paracrina de la vía de EGFR, la cual promueve su proliferación/supervivencia. Sin embargo, la expresión de los receptores *Egfr*, *ErbB2* y *ErbB3*, así como de sus principales ligandos en la epidermis, *Tgfa*, *Areg* y *Hbgef* (Piepkorn et al. 1995; Piepkorn et al. 1998), se reduce significativamente en las L-CSCs de los SCCs avanzados. Estos resultados son relevantes porque indican que la resistencia a terapias dirigidas contra EGFR, que se ha observado en algunos pacientes y que dan lugar a tumores recurrentes más agresivos (Yauch 2005; Sierra et al. 2010), podría estar mediada por un cambio en las vías reguladoras que controlan las CSCs durante la progresión tumoral.

Aunque nuestros resultados no permiten determinar los mecanismos implicados en la regulación negativa de las vías de WNT/ β -catenina y EGFR en los estadios avanzados de la progresión tumoral, es posible que ambas vías se regulen de una forma coordinada, de forma que alteraciones en una de ellas podría inducir la desregulación de la otra (Revisado en K. Zhang et al. 2012). A pesar de la atenuación de estas vías, los SCCs avanzados mostraron un mayor crecimiento y una mayor capacidad para desarrollar metástasis que los WD-SCCs, indicando que la activación de otras vías de señalización podrían ser las responsables de promover la proliferación y la supervivencia de las CSCs en los estadios más avanzados de progresión. En este sentido, observamos que las L-CSCs mostraban una activación autocrina de las vías de FGFR1 y PDGFR α , las cuales se han asociado con progresión y mal pronóstico en otros tipos tumorales (Jechlinger 2006; Turner & Grose 2010).

Aunque estudios previos demostraron la importancia de la señalización a través de FGFR promoviendo el desarrollo de tumores en piel (Petiot 2003; Turner & Grose 2010), se desconocía si

esta vía regulaba la proliferación de las CSCs y qué receptores de esta familia estaban implicados en este proceso. Nuestros resultados mostraron que FGFR1c es el receptor de esta familia más fuertemente expresado en las E-CSCs y L-CSCs. En este sentido, FGF2 y FGFR desempeñan un papel importante regulando la auto-renovación de las SCs embrionarias (Levenstein et al. 2006) y de las CSCs de glioblastoma (Haley & Kim 2014). A pesar de que las E-CSCs presentan una fuerte expresión de este receptor, la vía de EGFR es la responsable de estimular la proliferación de estas células. Sin embargo, las L-CSCs inducen de forma autocrina la vía de FGFR1c, la cual promueve la proliferación y supervivencia de estas células *in vitro* y el crecimiento tumoral agresivo de los PD/S-SCCs *in vivo*. Estos resultados indican que se produce un cambio en las vías de señalización que promueven la proliferación y supervivencia de las CSCs durante la progresión tumoral. Es importante destacar que se ha descrito un *switch* similar entre las vías de EGFR y FGFR en tumores que desarrollan resistencia a los tratamientos basados en inhibidores de EGFR en otros tipos tumorales (Sierra et al., 2010; Yauch et al., 2005). De acuerdo con la inducción de la vía de FGFR1 en SCCs avanzados, se ha observado que este receptor se sobreexpresa en líneas celulares que presentan el programa de EMT inducido (Nguyen et al. 2013), y la expresión o activación aberrante de FGFRs se ha asociado con la progresión tumoral y con una baja supervivencia en pacientes de cáncer de mama, de pulmón y de cerebro (Turner & Grose 2010).

Estos resultados podrían ser relevantes para facilitar la selección de terapias que actúen de forma más efectiva dependiendo del estadio de progresión tumoral en el que se encuentre el tumor. Así, una terapia dirigida a reducir el crecimiento de SCCs de piel avanzados mediante inhibidores de la vía de EGFR sería inefectiva, siendo más recomendada la utilización de inhibidores de FGFR para frenar el crecimiento de estos tumores.

Por otro lado, estudios recientes han relacionado la activación de FGFR1 con el desarrollo de metástasis. Concretamente, Wan et al., demostraron que la expresión de FGFR1 se inducía en metástasis óseas de tumores de próstata humanos (Wan et al. 2014). Sin embargo, nuestros datos muestran que la inhibición de la vía de FGFR1 no modifica la frecuencia de metástasis en los SCCs avanzados de diferentes linajes tumorales, indicando que la activación de esta vía promueve principalmente el crecimiento tumoral, sin afectar a la capacidad de diseminación de las CSCs.

La activación autocrina de la vía de PDGFR α promueve la diseminación de las L-CSCs y la metástasis en PD/S-SCCs

PDGFR no se expresa en queratinocitos normales ni en las células tumorales de SCCs de piel durante estadios tempranos (Pontén et al. 1994). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que las L-CSCs presentan una fuerte expresión de PDGFR α y de sus ligandos PDGFA y PDGFC y una activación autocrina de estas vías.

Estudios previos demostraron que la inducción de la vía PDGFR α está asociada al crecimiento tumoral y a un mal pronóstico en cáncer de mama y carcinoma hepatocelular (Jechlinger 2006; Wei et al. 2014). Las células de carcinoma hepatocelular aumentan la expresión de PDGFR α cuando la vía de β -catenina está inhibida, promoviendo proliferación celular vía PDGFR α /PIK3CA (Zhang et al. 2010). Asimismo, a diferencia de las células de cáncer de mama con características epiteliales, las CSCs de mama con el programa de EMT inducido muestran una sobreexpresión de PDGFR α , PDGFR β y PDGFC, y la activación autocrina de la vía PDGFR/PLC γ /PKC α , la cual promueve la proliferación de estas CSCs mesenquimales (Tam, Lu, Buikhuisen, Soh, Lim, Reinhardt, Wu, Jordan A Krall, et al. 2013). Contrariamente, la inducción autocrina de PDGFR α no promueve la proliferación de las L-CSCs ni el crecimiento de los PD/S-SCCs. Sin embargo, la inhibición farmacológica de PDGFR y el bloqueo de la expresión de PDGFR α en las L-CSCs reduce de forma significativa la capacidad de migración e invasión de estas células y el desarrollo de metástasis en SCCs de estadios avanzados.

Aunque estudios previos mostraron la relación de la vía de PDGFR α con el programa EMT (Jechlinger 2006; Liu et al. 2010; Wang et al. 2010), nuestros resultados demuestran que la inhibición de la vía de PDGFR α no provoca una atenuación del programa de EMT en las L-CSCs, ni reduce la frecuencia de CSCs. Sin embargo, la fuerte inducción del programa de EMT observado en las L-CSCs podría promover la inducción de la vía de FGFR1c y de la vía de PDGFR α , tal y como se ha descrito en otros tipos de tumores (Tam, et al. 2013; Zhu et al. 2014). Por lo tanto, todos estos resultados demuestran, que la vía de PDGFR α juega un importante papel promoviendo la migración y diseminación de las L-CSCs y, en definitiva, el desarrollo de metástasis.

En conjunto, todos estos resultados demuestran que durante la progresión tumoral, no sólo aumenta la frecuencia de las CSCs, sino que además cambian sus características y los mecanismos que regulan su proliferación, supervivencia y diseminación, coincidiendo con un crecimiento más agresivo y una mayor capacidad para desarrollar metástasis. Así, mientras que las vías de señalización de WNT/ β -catenina y EGFR promueven la proliferación de las CSCs en estadios tempranos de progresión, estas vías se atenúan en las CSCs de SCCs avanzados, y estas células inducen una activación autocrina de las vías de FGFR1c y PDGFR α , las cuales promueven el crecimiento agresivo de los PD/S-SCCs y el desarrollo de metástasis, respectivamente (Figura 55).

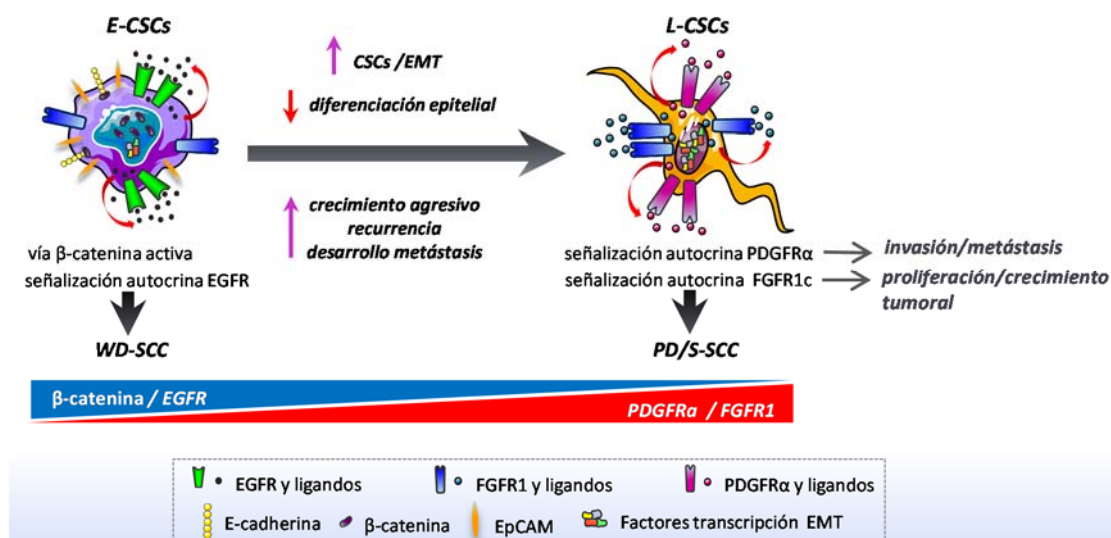


Figura 55. Resumen de los cambios identificados en las características y los mecanismos reguladores de las CSCs en las diferentes etapas de progresión de SCC de ratón. Durante las primeras etapas de progresión, las E-CSCs muestran características epiteliales y presentan una activación de las vías de β -catenina y EGFR, las cuales promueven la proliferación de estas células. Durante la progresión a PD/S-SCCs, se produce la pérdida de características de diferenciación epitelial, aumenta la frecuencia de las CSCs. Además, se produce una fuerte inducción del programa EMT. Las L-CSCs atenúan las vías de β -catenina y EGFR, mientras que inducen de forma autocrina las vías de FGFR1c y PDGFR α , las cuales promueven el crecimiento tumoral y la metástasis, respectivamente.

Sin embargo, quedan por resolver algunas preguntas, como qué mecanismos promueven la progresión de WD-SCCs a PD/S-SCCs y cómo se generan las L-CSCs. Nosotros sugerimos que la progresión de WD-SCCs a PD/S-SCCs podría estar promovida por alteraciones genéticas y/o epigenéticas que se producen en respuesta a señales procedentes del microambiente tumoral, las cuales podrían modificar la capacidad de diferenciación y los mecanismos que regulan a las CSCs. Dado que estos tumores podrían tener un origen celular heterogéneo, la progresión de los SCCs podría ser consecuencia de la expansión selectiva de las L-CSCs, que presentan ventajas proliferativas y que podrían estar presentes en una frecuencia muy reducida en los WD-SCCs. Sin embargo, el análisis mediante citometría de flujo de múltiples WD-SCCs, realizado durante esta tesis doctoral y posteriormente por otros miembros del grupo, no ha permitido identificar CSCs $\alpha 6$ -intergina⁺/CD34⁺/EpCAM⁻/PDGFR α ^{high} (firma que caracteriza a esta población de L-CSCs) en tumores tempranos. Además, cuando un número elevado de células tumorales aisladas de los WD-SCCs (más de un millón de células) fueron inyectadas en ratones inmunodeficientes, no se generaron PD/S-SCCs o tumores con regiones mesenquimales. Estas observaciones sugieren que durante la progresión tumoral se produciría una transformación o reprogramación de las E-CSCs, dando lugar a las L-CSCs, que debido a sus ventajas proliferativas y de supervivencia serían finalmente seleccionadas, dando lugar a PD/S-SCCs.

DURANTE LA PROGRESIÓN DE LOS SCCs DE PIEL SE PRODUCEN ALTERACIONES EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

Estudios previos han demostrado que las señales o factores procedentes del microambiente tumoral, como las citoquinas, promueven la proliferación y la diseminación de las CSCs y en consecuencia, el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis (Balkwill 2004a; Balkwill 2012). Por lo tanto, decidimos investigar si durante la progresión se producían alteraciones en la expresión de citoquinas que podrían ser responsables de los cambios observados en las CSCs.

Durante la progresión de los SCCs se producen cambios en la composición celular del estroma y en la producción de citoquinas.

El análisis de los perfiles de expresión de citoquinas y de sus receptores en los WD-SCCs y PD/S-SCCs mostró que durante la progresión se producen importantes cambios en las señales que permiten la comunicación entre las células tumorales y el estroma, y entre los diferentes componentes celulares del estroma. Así, los PD/S-SCCs presentaban una fuerte inducción de la expresión de los receptores de citoquinas *Ccr1*, *Ccr2*, *Ccr5*, *Cxcr4*, *Cxcr7*, *Cx3cr1*, *Csf1r*, *Il6st* e *Il6ra*, así como la de sus ligandos, indicando que estas vías estarían activas en los SCCs avanzados. Por otra parte, se observó una fuerte disminución de la expresión de *Cxcr2* y de sus ligandos *Cxcl1* y *Cxcl3*. Estas citoquinas han sido previamente asociadas con el reclutamiento de células inmunes (macrófagos, linfocitos y células dendríticas) y con la estimulación de la angiogénesis y la proliferación de diferentes tipo de células tumorales (Verbeke et al., 2011; Hannelien et al. 2012; Li et al., 2015). Por otra parte, observamos que el infiltrado inmune, formado por células CD45⁺, se reducía significativamente en los PD/S-SCCs generados tanto en ratones inmunodeficientes como en ratones singénicos inmunocompetentes. Estos resultados sugieren que la reducción observada de *Cxcl1* y *Cxcl3* podría conducir a una disminución del infiltrado inmune en los PD/S-SCCs. Sin embargo, sería necesario realizar más análisis para determinar los procesos o señales responsables de la disminución del reclutamiento de las células inmunes a los SCCs avanzados. Además, estos resultados sugieren que las células inmunes infiltrantes no serían las responsables del aumento de expresión de citoquinas observados en los SCCs avanzados, sino que probablemente la expresión de estas citoquinas estaría inducida en las células tumorales y/o el resto de células estromales.

Por otro lado, nuestros resultados demostraron que se produce un incremento significativo de la angiogénesis en los tumores avanzados, que podría estar inducido por el aumento de la expresión de algunas citoquinas pro-angiogénicas, como *Ccl2*, *Cx3cl1* (Dimberg 2010) o *Sdf-1a* (Domanska et al. 2013; Azab et al. 2014) por parte de las células tumorales y/o estromales de los PD/S-SCCs. En este sentido, el análisis de la expresión de citoquinas en las células tumorales aisladas de los WD-SCCs y PD/S-SCCs y cultivadas *in vitro*, mostró que la expresión de *Ccl2* y *Cx3cl1* se induce significativamente en las células PD/S respecto a las WD, siendo estos niveles similares a los detectados en los PD/S-

SCCs de origen. Por el contrario, la expresión de sus receptores fue prácticamente indetectable en las células tumorales PD/S. Estos resultados sugieren que estas citoquinas podrían ser producidas por las L-CSCs para promover la angiogénesis u otros procesos en los PD/S-SCCs. Así, se ha descrito que la expresión de *Ccl2* por las células tumorales induce el reclutamiento, la migración y la proliferación de células endoteliales (Lim et al. 2016), promoviendo la angiogénesis (Salcedo et al. 2000; Stamatovic et al. 2006).

Nuestros datos sugieren que las células estromales de los PD/S-SCCs (fibroblastos y células endoteliales) podrían expresar altos niveles de *Cxcl4*, *Ccl6*, *Ccl9* y *Ccl12*. Dado que sus receptores no se expresan, o se expresan en niveles muy bajos en las células tumorales, sugerimos que estas vías de señalización estarían activadas principalmente en las células estromales. En este sentido, se ha descrito que la activación de CCR1 (receptor de CCL6 y CCL9) en células estromales, promueve la supervivencia de las células tumorales en los nichos metastásicos en cáncer de mama y hepatocelular (Rodero et al. 2013; Yan et al. 2015). Por otro lado, CCL12 podría reclutar monocitos o células endoteliales que expresan su receptor al tumor, como ya se ha mostrado en cáncer de próstata (Lu et al. 2006).

Además, nuestros datos muestran una inducción de la expresión de *Ccl5*, *Ccl7* y *Csf1* en las células PD/S, las cuales presentan niveles de expresión similares a los observados en los PD/S-SCCs parentales. Sin embargo, la expresión de sus receptores fue prácticamente indetectable tanto en las células WD como en las PD/S de diferentes linajes. Por lo tanto, las citoquinas *Ccl5*, *Ccl7*, *Csf1*, producidas por las células tumorales, podrían estar reclutando fibroblastos u otras células del estroma tumoral que expresen sus receptores, como las células endoteliales (Ali & Lazennec 2007; Raman et al. 2007; Vindrieux et al. 2009), favoreciendo el crecimiento del tumor y la metástasis.

Finalmente, las células tumorales PD/S inducen la expresión de *Il6*, *Sdf-1a* y de sus respectivos receptores. Estos resultados indican que ambas vías podrían estar activadas en las L-CSCs, promoviendo la proliferación de estas células, sus características mesenquimales y/o su capacidad de migración, tal y como se ha mostrado en otros tipos tumorales (Sun et al. 2003; Balkwill 2004a; Grivnikov and Karin 2008; Yadav et al. 2011; Chang et al. 2013). En este sentido, la vía de IL-6 promueve el desarrollo de metástasis en diferentes tipos tumorales, a través de la inducción del programa de EMT (Grivnikov & Karin 2008; Yadav et al. 2011). La activación de la vía de IL6 induce además la auto-renovación y la resistencia a la radioterapia de las CSCs de pulmón (Chen et al. 2015), así como la conversión de células tumorales no-CSCs a CSCs en cáncer de mama, a través de la vía JAK1-STAT3 (Kim et al. 2013). Por lo tanto, será interesante determinar la relevancia de la vía de IL6 en la inducción los cambios descritos en las CSCs durante la progresión de los SCCs de piel en futuros experimentos.

Respecto a la vía de SDF-1 α , nuestros resultados demuestran que CXCR4 se expresa en las L-CSCs, las cuales inducen además de forma significativa la expresión CXCR7, respecto a las E-CSCs. Sin embargo, observamos que la expresión de CXCR4 podría alterarse por las condiciones de cultivo *in vitro*, tal y como ya se había propuesto previamente en otras células tumorales (Zhang et al. 2007). Así, observamos que la expresión de este receptor era más elevada en L-CSCs aisladas de PD/S-SCCs (situación comparable a las condiciones *in vivo*), que en las L-CSCs mantenidas en cultivo. Estas observaciones sugieren que la expresión de CXCR4 podría regularse por señales procedentes del microambiente tumoral (Orimo et al. 2005).

La activación autocrina de la vía de PDGFR α induce la vía de SDF1 α en las L-CSCs, la cual estimula el crecimiento tumoral y la metástasis en SCCs avanzados

Dado que nuestros resultados mostraban que las L-CSCs inducen la expresión de SDF-1 α , y esta citoquina se ha relacionado con la migración de células tumorales y el desarrollo de metástasis (Sun et al. 2003; Teicher & Fricker 2010), decidimos analizar si existía una relación funcional entre ésta vía y la mediada por PDGFR α , la cual es responsable de promover la invasión en las L-CSCs y el desarrollo de metástasis en los PD/S-SCCs. Nuestros resultados muestran que la activación de la vía de PDGFR α estimula la producción de SDF-1 α en las L-CSCs. Estos resultados estarían de acuerdo con trabajos previos que demostraron que la relación funcional entre las vías de señalización de PDGF y de SDF-1 α induce la migración celular y la metástasis en cáncer de mama y glioblastoma (Liu et al. 2011; Sciacaluga et al. 2013). Por lo tanto, nos centramos en estudiar si SDF-1 α jugaba un papel relevante en la generación de metástasis, actuando como un efector de la vía de PDGFR α .

Nuestros datos indican que las L-CSCs activan de forma autocrina la vía de SDF-1 α . La inhibición farmacológica de CXCR4 bloqueó, en condiciones basales, la proliferación y la capacidad de invasión de estas células *in vitro*. Además, la interferencia de la expresión de CXCR4, redujo significativamente la proliferación de las células PD/S *in vitro*, así como el crecimiento de los tumores avanzados y el desarrollo de metástasis, mientras que el bloqueo de la expresión de CXCR7 no afectó significativamente ambos procesos. Estos resultados indican que la activación de la vía SDF-1 α /CXCR4 promueve el crecimiento de los PD/S-SCCs y el desarrollo de metástasis.

Dado que las L-CSCs expresan niveles elevados de CXCR7, una pregunta importante es qué función desempeña este receptor en la vía de SDF-1 α . Nuestros resultados indican que CXCR7 regula los niveles de expresión de CXCR4 tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, la disminución de la expresión de CXCR7 dio lugar a una reducción de la expresión de CXCR4, la cual fue insuficiente para bloquear el crecimiento de los PD/S-SCCs, aunque redujo parcialmente la generación de metástasis. En este sentido, se ha descrito que estos receptores pueden regular de una forma compleja la vía de SDF-1 α . Así, se ha propuesto que CXCR7, que tiene una afinidad superior por SDF-1 α que CXCR4 (Würth et al. 2014), actuaría como un *scavenger*, regulando los niveles de SDF-1 α e impidiendo que se unan a

CXCR4 (Naumann et al. 2010). La formación de heterodímeros CXCR7-CXCR4 podría además favorecer la internalización de CXCR4 (Würth et al. 2014; Levoe et al. 2009). Por otra parte, una reducción de CXCR7 podría favorecer las uniones SDF-1 α -CXCR4 y la internalización de este receptor, modulando en consecuencia la señalización mediada por SDF-1 α , como se ha descrito en otros tumores (Wang et al. 2011; Sánchez-Alcañiz et al. 2011). Sin embargo, nosotros observamos una reducción de los niveles de ARN de CXCR4 en respuesta a una expresión disminuida de CXCR7, indicando que esta regulación se produce a nivel transcripcional en los PD/S-SCCs.

Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la activación de la vía de PDGFR α en las L-CSCs estimula la síntesis de SDF-1 α y la activación autocrina de CXCR4, lo cual induce la proliferación y diseminación de estas células, y en consecuencia el crecimiento de los SCCs avanzados y el desarrollo de metástasis. Sin embargo, nuestros resultados previos mostraron que la activación de la vía de PDGFR α no promueve la proliferación celular ni el crecimiento de los PD/S-SCCs. Para esclarecer esta discrepancia, en los últimos meses mis compañeros de grupo han generado células PD/S con una expresión interferida de SDF-1 α . La caracterización de estas células sh-SDF-1 α mostró que el bloqueo de la expresión de SDF-1 α no afecta el crecimiento de los PD/S-SCCs, pero reduce de forma significativa el desarrollo de metástasis, recapitulando los efectos producidos por la inhibición de PDGFR α .

Aunque sería necesario realizar más experimentos para determinar los mecanismos a través de los cuales SDF-1 α induce la invasión y la proliferación en las L-CSCs, nosotros proponemos que la activación de PDGFR α estimula la producción de SDF-1 α y la activación autocrina de CXCR4, lo cual promueve la diseminación de las L-CSCs y el desarrollo de metástasis a órganos distantes (Figura 56). En este sentido, estudios realizados en células de melanoma y cáncer de próstata mostraron que la activación autocrina de las vías de IL-8 y SDF-1 α promueve la metástasis de estas células a tejidos distantes y favorece su proliferación en estos nichos metastásicos (Kakinuma 2006; Waugh & Wilson 2008).

Las diferencias observadas entre los efectos de la interferencia de SDF-1 α y CXCR4 sobre la proliferación y el crecimiento tumoral, podría deberse a que, tras la interferencia de SDF-1 α , o el bloqueo de la señalización de PDGFR α , se suprimiría la activación autocrina del CXCR4, pero las células todavía podrían responder al ligando que podría ser sintetizado por las células del estroma, y estimular así la proliferación de las células tumorales a través de CXCR4. Sin embargo, el bloqueo de la expresión de CXCR4 impediría que las células tumorales respondieran al SDF-1 α producido de forma autocrina o paracrina. En este sentido, se ha descrito que los fibroblastos estromales producen SDF-1 α , el cual activa el receptor CXCR4 de las células tumorales de mama, promoviendo así el crecimiento tumoral (Orimo et al. 2005). Por lo tanto, mientras que la activación autocrina o paracrina de SDF-1 α -CXCR4 podría promover el crecimiento tumoral, la activación autocrina de CXCR4 sería

necesaria para promover la generación de metástasis a órganos distantes (Figura 56). Por otra parte, es probable que diferentes vías estén actuando de forma coordinada para promover la proliferación de las L-CSCs. Así, nuestros estudios demostraron que tanto la vía de FGFR1 como la mediada por SDF-1 α /CXCR4 jugarían un papel importante promoviendo la proliferación de las L-CSCs y el crecimiento de los PD/S-SCCs. Es posible que exista una interacción funcional entre estas vías, o incluso entre otras vías todavía no identificadas, que potenciaría el crecimiento agresivo de estos tumores.

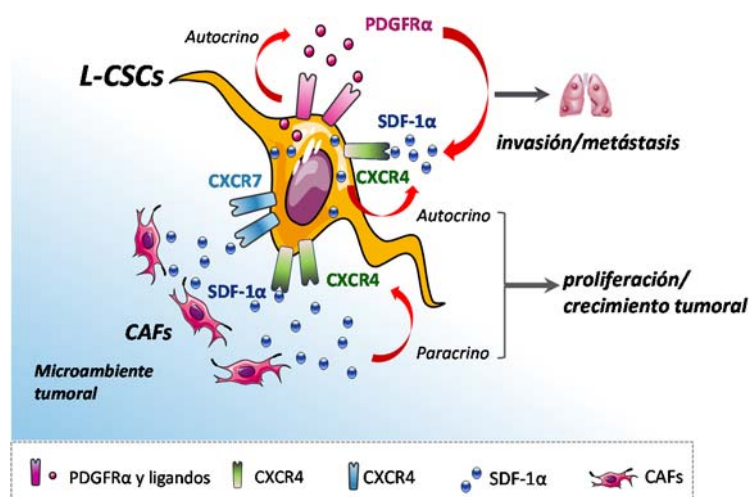


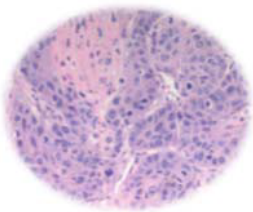
Figura 56. Modelo de los mecanismos de acción de SDF-1 α para promover el crecimiento tumoral y la metástasis en PD/S-SCCs. La activación autocrina de la vía de PDGFR α induce la síntesis de SDF-1 α y la activación autocrina de CXCR4, lo cual promueve la diseminación de las L-CSCs y el desarrollo de metástasis en pulmón. La activación autocrina y paracrino SDF-1 α , a través de su receptor CXCR4, induce la proliferación de las L-CSCs, así como crecimiento tumoral. El receptor CXCR7 actuaría regulando la expresión de CXCR4.

El conjunto de todos nuestros resultados demuestra que durante la progresión de los SCCs de piel, no sólo se produce una inducción del programa de EMT y una expansión de la población de CSCs, sino que además cambian las características de las CSCs, dando lugar a tumores indiferenciados, con características mesenquimales y con una elevada capacidad metastásica. Además, durante la progresión cambian los mecanismos que regulan la proliferación, supervivencia y diseminación de estas células. Así, mientras que β -catenina y EGFR regulan la proliferación de las CSCs de WD-SCCs, estas vías se atenúan en las CSCs de los SCCs avanzados, las cuales activan de forma autocrina la vía de FGFR1 para promover el crecimiento agresivo de estos tumores. Además, el crecimiento de estos tumores está potenciado por la activación de la vía de SDF-1 α /CXCR4 en las L-CSCs. Nuestros resultados demuestran además que la activación autocrina de la vía de PDGFR α , promueve la diseminación de las L-CSCs y el desarrollo de metástasis a través de la producción de SDF-1 α , el cual activaría de forma autocrina CXCR4 en las L-CSCs, estimulando la diseminación de estas células a tejidos distantes.

A pesar de que tanto las SCs de la IFE como las SCs que residen en los folículos y su progenie pueden contribuir al desarrollo de PD/S-SCCs, el origen folicular de las SCs podría favorecer la progresión

desde WD-SCCs a PD/S-SCCs. Aunque actualmente no conocemos los mecanismos genéticos o epigenéticos que promueven esta progresión, los importantes cambios observados en la composición celular del estroma y de citoquinas sugieren que estas alteraciones en el microambiente tumoral podrían jugar un papel relevante induciendo cambios en la regulación de las CSCs y promoviendo la progresión de los SCCs de piel.

Conclusiones

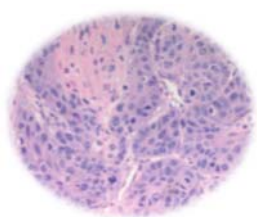


A partir de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, concluimos:

1. Las células madre que residen en la epidermis interfolicular y en el bulge de los folículos pilosos y su progenie contribuyen al desarrollo de SCCs de piel en los ratones K14-HPV16.
2. Las células madre de la epidermis interfolicular y su progenie contribuyen principalmente al desarrollo de WD-SCCs, mientras que las células madre LGR5⁺ del folículo piloso y su progenie contribuyen de forma similar al desarrollo de WD-SCCs y PD-SCCs. Dado que los PD-SCCs pueden generarse por la progresión de los WD-SCCs, sugerimos que el origen folicular de las células madre podría favorecer la progresión de los SCCs.
3. Durante la progresión de los SCCs de piel se produce una fuerte expansión de la población de cancer stem cells (CSCs) $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ y de células iniciadoras de tumores, coincidiendo con la generación de SCCs indiferenciados, que presentan características mesenquimales y una elevada capacidad para desarrollar metástasis a órganos distantes.
4. Las características y las vías de señalización que regulan a las CSCs cambian durante la progresión tumoral. Así, las vías de β -catenina y EGFR, que están inducidas en las CSCs de los WD-SCCs (E-CSCs), se atenúan en las CSCs de los PD/S-SCCs (L-CSCs), mientras que estas células inducen de forma autocrina las vías de señalización mediadas por FGFR1 y PDGFR α .
5. La proliferación de las L-CSCs y el crecimiento de los SCCs avanzados se estimula a través de la activación de la vía de FGFR1, mientras que la activación de PDGFR α induce la capacidad de migración e invasión de las L-CSCs y promueve el desarrollo de metástasis en los PD/S-SCCs.
6. Durante la progresión de los SCCs de piel se producen importantes alteraciones en el microambiente tumoral, como una reducción significativa del porcentaje de células inmunes que infiltran el tumor, un incremento de la angiogénesis y cambios en la expresión de un gran número de citoquinas y de sus respectivos receptores.
7. Las L-CSCs inducen la expresión de *Ccl2*, *Ccl5*, *Ccl7*, *Csf1* y *Cx3cl1*. Dado que la expresión de sus receptores fue prácticamente indetectable en estas células, sugerimos que estas citoquinas podrían actuar reclutando o regulando células del estroma, como fibroblastos y células endoteliales. Además, las CSCs de los PD/S-SCCs inducen la expresión de *Il6* y *Sdf-1a* y sus receptores.
8. Las CSCs de los SCCs avanzados expresan CXCR4 e inducen significativamente la expresión de CXCR7.
9. La actividad de PDGFR α estimula la síntesis de SDF-1 α en las L-CSCs, permitiendo la activación autocrina de la vía de SDF-1 α .

10. SDF-1 α promueve, a través de su interacción con CXCR4, la proliferación e invasión de las L-CSCs y en consecuencia, el crecimiento de los PD/S-SCCs y el desarrollo de metástasis.

Bibliografía



- Acevedo, V.D. et al., 2007. Inducible FGFR-1 Activation Leads to Irreversible Prostate Adenocarcinoma and an Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Cell*, 12(6), pp.559–571.
- Acloque, H. et al., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), pp.1438–49.
- Akiyama, M., Smith, L.T. & Holbrook, K.A., 1996. Growth Factor and Growth Factor Receptor Localization in the Hair Follicle Bulge and Associated Tissue in Human Fetus. *Journal of Investigative Dermatology*, 106(3), pp.391–396.
- Alam, M. & Ratner, D., 2001. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 344(13), pp.975–983.
- Alcantara Llaguno, S. et al., 2009. Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model. *Cancer Cell*, 15(1), pp.45–56.
- Alcolea, M.P. & Jones, P.H., 2014. Lineage analysis of epidermal stem cells. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(1).
- Ali, S. & Lazennec, G., 2007. Chemokines: novel targets for breast cancer metastasis. *Cancer metastasis reviews*, 26(3–4), pp.401–20.
- Allavena, P. et al., 2011. Chemokines in cancer related inflammation. *Experimental Cell Research*, 317(5), pp.664–673.
- Allen, S.J., Crown, S.E. & Handel, T.M., 2007. Chemokine:Receptor Structure, Interactions, and Antagonism. *Annual Review of Immunology*, 25(1), pp.787–820.
- Almendro, V., Marusyk, A. & Polyak, K., 2012. Cellular Heterogeneity and Molecular Evolution in Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 8(1), p.121023133009008.
- Alonso, L. & Fuchs, E., 2003. Stem cells of the skin epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 Suppl, pp.11830–11835.
- Alonso, L. & Fuchs, E., 2006. The hair cycle. *Journal of Cell Science*, 119(3), pp.391–393.
- Altenburg, J.D. et al., 2007. A Naturally Occurring Splice Variant of CXCL12/Stromal Cell-Derived Factor 1 Is a Potent Human Immunodeficiency Virus Type 1 Inhibitor with Weak Chemotaxis and Cell Survival Activities. *Journal of Virology*, 81(15), pp.8140–8148.
- Andrae, J., Gallini, R. & Betsholtz, C., 2008a. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. , pp.1276–1312.

- Andrae, J., Gallini, R. & Betsholtz, C., 2008b. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & Development*, 22(10), pp.1276–1312.
- Appiah-Kubi, K. et al., 2016. Platelet-derived growth factor receptor/platelet-derived growth factor (PDGFR/PDGF) system is a prognostic and treatment response biomarker with multifarious therapeutic targets in cancers. *Tumor Biology*, 37(8), pp.10053–10066.
- Arai, H. et al., 2003. Detection of amplified oncogenes by genome DNA microarrays in human primary esophageal squamous cell carcinoma: comparison with conventional comparative genomic hybridization analysis. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 146(1), pp.16–21.
- Arbeit, J.M. et al., 1994. Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Journal of virology*, 68(7), pp.4358–68.
- Arteaga, C.L. & Engelman, J.A., 2014. ERBB Receptors: From Oncogene Discovery to Basic Science to Mechanism-Based Cancer Therapeutics. *Cancer Cell*, 25(3), pp.282–303.
- Arteaga, C.L. & Engelman, J.A., 2014. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer cell*, 25(3), pp.282–303.
- Arwert, E.N., Hoste, E. & Watt, F.M., 2012. Epithelial stem cells, wound healing and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(March), pp.170–180.
- Azab, A.K. et al., 2014. CXCR7-dependent angiogenic mononuclear cell trafficking regulates tumor progression in multiple myeloma. *Blood*, 124(12), pp.1905–14.
- Baarsma, H.A. et al., 2017. Noncanonical WNT-5A signaling impairs endogenous lung repair in COPD. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(1), pp.143–163.
- Balkwill, F., 2004a. Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer*, 4(7), pp.540–550.
- Balkwill, F., 2004b. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Seminars in cancer biology*, 14(3), pp.171–9.
- Balkwill, F. & Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet (London, England)*, 357(9255), pp.539–45.
- Balkwill, F.R., 2012. The chemokine system and cancer. *The Journal of Pathology*, 226(2), pp.148–157.
- Bartolome, R.A., 2006. Activation of Vav/Rho GTPase Signaling by CXCL12 Controls Membrane-Type Matrix Metalloproteinase-Dependent Melanoma Cell Invasion. *Cancer Research*, 66(1), pp.248–258.

- Beck, B. et al., 2011. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature*, 478(7369), pp.399–403.
- Beck, B. et al., 2015. Different levels of Twist1 regulate skin tumor initiation, stemness, and progression. *Cell Stem Cell*, 16(1), pp.67–79.
- Beck, B. & Blanpain, C., 2013. Unravelling cancer stem cell potential. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), pp.727–738.
- Ben-Baruch, A., 2009. Site-specific metastasis formation: chemokines as regulators of tumor cell adhesion, motility and invasion. *Cell adhesion & migration*, 3(4), pp.328–33.
- Betsholtz, C., 2004. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 15(4), pp.215–228.
- Bickenbach, J.R., McCutcheon, J. & Mackenzie, I.C., 1986. Rate of loss of tritiated thymidine label in basal cells in mouse epithelial tissues. *Cell and tissue kinetics*, 19(3), pp.325–33.
- Blanpain, C., 2013. Tracing the cellular origin of cancer. *Nature Cell Biology*, 15(2), pp.126–134.
- Blanpain, C. & Fuchs, E., 2009. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(3), pp.207–217.
- Blanpain, C. & Fuchs, E., 2006. Epidermal stem cells of the skin. *Annual review of cell and developmental biology*, 22, pp.339–73.
- Blanpain, C. & Simons, B.D., 2013. Unravelling stem cell dynamics by lineage tracing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), pp.489–502.
- Bleul, C.C. et al., 1996. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *The Journal of experimental medicine*, 184(3), pp.1101–9.
- Bleul, C.C., Schultze, J.L. & Springer, T.A., 1998. B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement. *The Journal of experimental medicine*, 187(5), pp.753–62.
- Bonnet, D. & Dick, J.E., 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7), pp.730–737.
- Boumahdi, S. et al., 2014. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature*, 511(7508), pp.246–250.
- Braun, K.M. et al., 2003. Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment:

- visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development*, 130(21), p.5241 LP-5255.
- Brazil, D.P., Yang, Z.-Z. & Hemmings, B.A., 2004. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts☆. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(5), pp.233–242.
- Burns, J.M. et al., 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(9), pp.2201–2213.
- Burton, K.A., Ashack, K.A. & Khachemoune, A., 2016. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review of High-Risk and Metastatic Disease. *American journal of clinical dermatology*, (September).
- Campbell, J.S. et al., 2005. Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(9), pp.3389–3394.
- Cao, Y., 2013. Multifarious functions of PDGFs and PDGFRs in tumor growth and metastasis. *Trends in Molecular Medicine*, 19(8), pp.460–473.
- Carraway III, K.L. et al., 1997. Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature*, 387(6632), pp.512–516.
- Castellone, M.D. et al., 2004. Functional expression of the CXCR4 chemokine receptor is induced by RET/PTC oncogenes and is a common event in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*, 23(35), pp.5958–5967.
- Celià-Terrassa, T. et al., 2012. Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *Journal of Clinical Investigation*, 122(5), pp.1849–1868.
- Chang, H. et al., 1997. Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature*, 387, pp.509–512.
- Chang, Q. et al., 2013. The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. *Neoplasia*, 15(7), pp.848–862.
- Chang, S.S. & Califano, J., 2008. Current status of biomarkers in head and neck cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 97(8), pp.640–643.
- Chen, J. et al., 2012. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, 488(7412), pp.522–526.
- Chen, P.-H., Chen, X. & He, X., 2013. Platelet-derived growth factors and their receptors: Structural

- and functional perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834(10), pp.2176–2186.
- Chen, Y. et al., 2015. IL-6 signaling promotes DNA repair and prevents apoptosis in CD133+ stem-like cells of lung cancer after radiation. *Radiation Oncology*, 10(1), p.227.
- Cheng, J. et al., 2013. Platelet-derived growth factor-BB accelerates prostate cancer growth by promoting the proliferation of mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(7), pp.1510–1518.
- Cherpelis, B.S., Marcusen, C. & Lang, P.G., 2002. Prognostic Factors for Metastasis in Squamous Cell Carcinoma of the Skin. *Dermatologic Surgery*, 28(3), pp.268–273.
- Chitu, V. & Stanley, E.R., 2006. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 18(1), pp.39–48.
- Choi, Y.S. et al., 2013. Distinct Functions for Wnt/ β -Catenin in Hair Follicle Stem Cell Proliferation and Survival and Interfollicular Epidermal Homeostasis. *Cell Stem Cell*, 13(6), pp.720–733.
- Chow, M.T. & Luster, A.D., 2014. Chemokines in Cancer. *Cancer Immunology Research*, 2(12), pp.1125–1131.
- Clarke, I.D. & Dirks, P.B., 2003. A human brain tumor-derived PDGFR- α deletion mutant is transforming. *Oncogene*, 22(5), pp.722–733.
- Clevers, H., 2006. Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*, 127(3), pp.469–480.
- Coussens, L.M. et al., 1999. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes & development*, 13(11), pp.1382–97.
- Coussens, L.M., Hanahan, D. & Arbeit, J.M., 1996. Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice. *The American journal of pathology*, 149(6), pp.1899–917.
- D'Apuzzo, M. et al., 1997. The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *European Journal of Immunology*, 27(7), pp.1788–1793.
- Demoulin, J.-B. & Essaghiri, A., 2014a. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25(3), pp.273–283.
- Demoulin, J.-B. & Essaghiri, A., 2014b. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer

- cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25(3), pp.273–283.
- Dienstmann, R. et al., 2014. Genomic aberrations in the FGFR pathway: Opportunities for targeted therapies in solid tumors. *Annals of Oncology*, 25(3), pp.552–563.
- Dimberg, A., 2010. Chemokines in Angiogenesis. In O. Bruserud, ed. *The Chemokine System in Experimental and Clinical Hematology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 59–80.
- Ding, H. et al., 2004. A specific requirement for PDGF-C in palate formation and PDGFR- α signaling. *Nature Genetics*, 36(10), pp.1111–1116.
- Domanska, U.M. et al., 2013. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 49(1), pp.219–30.
- Driessens, G. et al., 2012. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature*, 488(7412), pp.527–530.
- Du, B. & Shim, J., 2016. Targeting Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules*, 21(8), p.965.
- Dunn, G.P., Koebel, C.M. & Schreiber, R.D., 2006. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*, 6(11), pp.836–848.
- Falcon, S. & Gentleman, R., 2007. Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics*, 23(2), pp.257–258.
- Ferguson, K.M. et al., 2003. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Molecular Cell*, 11(2), pp.507–517.
- Fischer, a N.M. et al., 2007. PDGF essentially links TGF-beta signaling to nuclear beta-catenin accumulation in hepatocellular carcinoma progression. *Oncogene*, 26(23), pp.3395–3405.
- Forsberg, K. et al., 1993. Platelet-derived growth factor (PDGF) in oncogenesis: development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing PDGF-BB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(2), pp.393–7.
- Franco, R. et al., 2013. Current treatment of cutaneous squamous cancer and molecular strategies for its sensitization to new target-based drugs. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 13(1), pp.51–66.
- Fuchs, E. & Raghavan, S., 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet*, 3(3), pp.199–209.

- Fuerer, C. & Nusse, R., 2010. Lentiviral vectors to probe and manipulate the Wnt signaling pathway. *PLoS one*, 5(2), p.e9370.
- Füllgrabe, A. et al., 2015. Dynamics of Lgr6+ Progenitor Cells in the Hair Follicle, Sebaceous Gland, and Interfollicular Epidermis. *Stem Cell Reports*, 5(5), pp.843–855.
- Furuhashi, M. et al., 2004. Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumors and an associated increase in tumor growth rate. *Cancer research*, 64(8), pp.2725–33.
- Gautier, L. et al., 2004. Affy - Analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics*, 20(3), pp.307–315.
- Ghittoni, R. et al., 2010. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*, 40(1), pp.1–13.
- Graham, G.J. et al., 2012. The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. *Immunology Letters*, 145(1–2), pp.30–38.
- Greco, V. et al., 2009. A Two-Step Mechanism for Stem Cell Activation during Hair Regeneration. *Cell Stem Cell*, 4(2), pp.155–169.
- Griffith, J.W., Sokol, C.L. & Luster, A.D., 2014. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*, 32, pp.659–702.
- Grivennikov, S. & Karin, M., 2008. Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis? *Cancer cell*, 13(1), pp.7–9.
- Guasch, G. et al., 2007. Loss of TGFbeta signaling destabilizes homeostasis and promotes squamous cell carcinomas in stratified epithelia. *Cancer Cell*, 12.
- Guo, F. et al., 2016. CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene*, 35(7), pp.816–826.
- Gutschalk, C.M. et al., 2013. GM-CSF enhances tumor invasion by elevated MMP-2, -9, and -26 expression. *Cancer Medicine*, 2(2), pp.117–129.
- Guy, P.M. et al., 1994. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(August), pp.8132–8136.
- Haley, E.M. & Kim, Y., 2014. The role of basic fibroblast growth factor in glioblastoma multiforme

- and glioblastoma stem cells and in their in vitro culture. *Cancer Lett.*, 346(1), pp.1–5.
- Hallinan, N. et al., 2016. Targeting the fibroblast growth factor receptor family in cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 46, pp.51–62.
- HAMA, N., OHTSUKA, T. & YAMAZAKI, S., 2006. Detection of mucosal human papilloma virus DNA in bowenoid papulosis, Bowen's disease and squamous cell carcinoma of the skin. *The Journal of Dermatology*, 33(5), pp.331–337.
- Hansen, L.A. et al., 2000. The epidermal growth factor receptor is required to maintain the proliferative population in the basal compartment of epidermal tumors. *Cancer Research*, 60(13), pp.3328–3332.
- Haugsten, E.M. et al., 2010. Roles of Fibroblast Growth Factor Receptors in Carcinogenesis. *Molecular Cancer Research*, 8(11), p.1439 LP-1452.
- Heldin, C.-H., 2013. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell communication and signaling: CCS*, 11, p.97.
- Heldin, C.H. & Westermark, B., 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.*, 79(4), pp.1283–1316.
- Henry, J. et al., 2012. Update on the epidermal differentiation complex. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 17, pp.1517–32.
- Heppner, G.H., 1984. Tumor heterogeneity. *Cancer research*, 44(6), pp.2259–65.
- Hombach, V. et al., 1995. [Recurrent stenosis following coronary angioplasty. Clinical, cell biological and molecular aspects]. *Zeitschrift für Kardiologie*, 84(1), pp.5–21.
- Hong, I.-S., 2016. Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(7), p.e242.
- Hsu, Y.-C., Li, L. & Fuchs, E., 2014. Transit-Amplifying Cells Orchestrate Stem Cell Activity and Tissue Regeneration. *Cell*, 157(4), pp.935–949.
- Hu, S.C.-S. et al., 2014. CXCR7 expression correlates with tumor depth in cutaneous squamous cell carcinoma skin lesions and promotes tumor cell survival through ERK activation. *Experimental dermatology*.
- Humpert, M.-L. et al., 2014. CXCR7 influences the migration of B cells during maturation. *European Journal of Immunology*, 44(3), pp.694–705.

- Hunter, C.A. & Jones, S.A., 2015. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*, 16(5), pp.448–457.
- Hwang, R.F. et al., 2003. Inhibition of Platelet-Derived Growth Factor Receptor Phosphorylation by STI571 (Gleevec) Reduces Growth and Metastasis of Human Pancreatic Carcinoma in an Orthotopic Nude Mouse Model. *Clinical Cancer Research*, 9(17).
- Hynes, N.E. & Lane, H. a, 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature reviews. Cancer*, 5(5), pp.341–54.
- Ito, M. et al., 2005. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nature medicine*, 11(12), pp.1351–1354.
- Jaks, V. et al., 2008. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat Genet*, 40(11), pp.1291–1299.
- Janowski, M., 2009. Functional diversity of SDF-1 splicing variants. *Cell adhesion & migration*, 3(3), pp.243–249.
- Jechlinger, M., 2006. Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, 116(6), pp.1561–1570.
- Jensen, K.B. et al., 2009. Lrig1 Expression Defines a Distinct Multipotent Stem Cell Population in Mammalian Epidermis. *Cell Stem Cell*, 4(5), pp.427–439.
- Jensen, U.B. et al., 2008. A distinct population of clonogenic and multipotent murine follicular keratinocytes residing in the upper isthmus. *Journal of Cell Science*, 121(5), pp.609–617.
- Joseph, N.M. & Morrison, S.J., 2016. Toward an Understanding of the Physiological Function of Mammalian Stem Cells. *Developmental Cell*, 9(2), pp.173–183.
- Joyce, J. a & Pollard, J.W., 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews. Cancer*, 9(4), pp.239–52.
- Juarez, J. & Bendall, L., 2004. SDF-1 and CXCR4 in normal and malignant hematopoiesis. *Histology and Histopathology*, 19(1), pp.299–309.
- Kaimori, A. et al., 2007. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem*, 282(30), pp.22089–22101.
- Kakinuma, T., 2006. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *Journal of Leukocyte Biology*, 79(4), pp.639–651.

- Kalluri, R. & Weinberg, R.A., 2009a. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), pp.1420–1428.
- Kalluri, R. & Weinberg, R.A., 2009b. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), pp.1420–1428.
- Karlsson, L., Bondjers, C. & Betsholtz, C., 1999. Roles for PDGF-A and sonic hedgehog in development of mesenchymal components of the hair follicle. *Development (Cambridge, England)*, 126(12), pp.2611–21.
- Katoh, M. & Katoh, M., 2007. WNT Signaling Pathway and Stem Cell Signaling Network. *Clinical Cancer Research*, 13(14), pp.4042–4045.
- Kauvar, A.N.B. et al., 2015. Consensus for Nonmelanoma Skin Cancer Treatment, Part II. *Dermatologic Surgery*, 41(11), pp.1214–1240.
- Kim, S.-Y. et al., 2013. Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells. *Cellular Signalling*, 25(4), pp.961–969.
- Kong, D. et al., 2008. Platelet-derived growth factor-D overexpression contributes to epithelial-mesenchymal transition of PC3 prostate cancer cells. *Stem cells*, 26(6), pp.1425–1435.
- Kretzschmar, K. & Watt, F.M., 2012. Lineage tracing. *Cell*, 148(1–2), pp.33–45.
- Kurrey, N.K. et al., 2009. Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells*, 27.
- Lanigan, S. & Zaidi, Z., 2010. Dermatology in Clinical Practice. , pp.101–123.
- Lapouge, G. et al., 2011. Identifying the cellular origin of squamous skin tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), pp.7431–6.
- Lapouge, G. et al., 2012. Skin squamous cell carcinoma propagating cells increase with tumour progression and invasiveness. *The EMBO journal*, 31(24), pp.4563–75.
- Lataillade, J.J., Domenech, J. & Le Bousse-Kerdilès, M.C., 2004. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 couple plays multiple roles on haematopoietic progenitors at the border between the old cytokine and new chemokine worlds: Survival, cell cycling and trafficking. *European Cytokine Network*, 15(3), pp.177–188.
- Latil, M. et al., 2016. Cell-Type-Specific Chromatin States Differentially Prime Squamous Cell

- Carcinoma Tumor-Initiating Cells for Epithelial to Mesenchymal Transition. *Cell Stem Cell*.
- Lazennec, G. & Richmond, A., 2010. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, 16(3), pp.133–144.
- Lee, B.-C. et al., 2004. Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. *Molecular cancer research : MCR*, 2(6), pp.327–38.
- Levenstein, M.E. et al., 2006. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(3), pp.568–74.
- Levoye, A. et al., 2009. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*, 113(24), pp.6085–6093.
- Levy, V. et al., 2007. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(7), pp.1358–1366.
- Lim, S.Y. et al., 2016. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget*, 7(19), pp.28697–710.
- Lin, E.Y. et al., 2001. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *The Journal of experimental medicine*, 193(6), pp.727–40.
- Lippitz, B.E., 2013. Cytokine patterns in patients with cancer: A systematic review. *The Lancet Oncology*, 14(6), pp.218–28.
- Liu, H. et al., 2010. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42), pp.18115–18120.
- Liu, J. et al., 2011. PDGF-D Improves Drug Delivery and Efficacy via Vascular Normalization, But Promotes Lymphatic Metastasis by Activating CXCR4 in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(11), pp.3638–3648.
- Lu, Y. et al., 2006. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) acts as a paracrine and autocrine factor for prostate cancer growth and invasion. *The Prostate*, 66(12), pp.1311–1318.
- Luster, A.D., 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England journal of medicine*, 338(7), pp.436–45.

- Lyle, S. et al., 1998. The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *Journal of Cell Science*, 111(21), p.3179 LP-3188.
- Madan, V., Lear, J.T. & Szeimies, R.M., 2010. Non-melanoma skin cancer. *Lancet*, 375(9715), pp.673–685.
- Malanchi, I. et al., 2008. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on [bgr]-catenin signalling. *Nature*, 452(7187), pp.650–653.
- Mani, S.A. et al., 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133.
- Mascre, G. et al., 2012. Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. *Nature*, 489(7415), pp.257–262.
- Massagué, J., 2008. TGF β in cancer. *Cell*, 134.
- Mellado, M. et al., 2001. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annual review of immunology*, 19, pp.397–421.
- Mills, A.A. et al., 1999. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, 398(6729), pp.708–713..
- Mitchell, T.J. & John, S., 2005. Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas. *Immunology*, 114(3), pp.301–312.
- Moody, C.A. & Laimins, L.A., 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*, 10(8), pp.550–560.
- Morel, A.-P.P. et al., 2008. Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS One*, 3(8), p.e2888.
- Morris, R.J. et al., 2004. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol*, 22(4), pp.411–417.
- Morrison, S.J. & Spradling, A.C., 2008. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell*, 132(4), pp.598–611.
- Moustakas, A. & Heldin, C.H., 2005. Non-Smad TGF-beta signals. *Journal of Cell Science*, 118(16), pp.3573–3584.
- Muller, A. et al., 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410(6824), pp.50–56.

- de Munnik, S.M. et al., 2015. Modulation of cellular signaling by herpesvirus-encoded G protein-coupled receptors. *Frontiers in Pharmacology*, 6(MAR), pp.1–27.
- Nassar, D. & Blanpain, C., 2016. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11(1), pp.47–76.
- Naumann, U. et al., 2010. CXCR7 Functions as a Scavenger for CXCL12 and CXCL11 G. Pockley, ed. *PLoS ONE*, 5(2), p.e9175.
- Nguyen, L. V et al., 2012. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer*, 12(2), pp.133–143.
- Nguyen, P.T. et al., 2013. The FGFR1 inhibitor PD173074 induces mesenchymal-epithelial transition through the transcription factor AP-1. *British journal of cancer*, 109(8), pp.2248–58.
- Nicola, N.A., 1994. Cytokine Pleiotropy and Redundancy - a View from the Receptor. *Stem Cells*, 12, pp.3–14.
- Nieto, M.A. & Cano, A., 2012. The epithelial--mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin Cancer Biol*, 22.
- Nijhof, J.G.W. et al., 2006. The cell-surface marker MTS24 identifies a novel population of follicular keratinocytes with characteristics of progenitor cells. *Development (Cambridge, England)*, 133(15), pp.3027–3037.
- Nikolic, T. et al., 2014. The DNA-binding factor Ctf critically controls gene expression in macrophages. *Cellular and Molecular Immunology*, 11(1), pp.58–70.
- Normanno, N. et al., 2006. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366(1), pp.2–16.
- Normanno, N. et al., 2003. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: A novel approach to cancer treatment. *Endocrine-Related Cancer*, 10(1), pp.1–21.
- Nowak, J.A. et al., 2008. Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell Stem Cell*, 3(1), pp.33–43.
- O'Hayer, K.M., Brady, D.C. & Counter, C.M., 2009. ELR+ CXC chemokines and oncogenic Ras-mediated tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 30(11), pp.1841–1847.
- Ocaña Oscar, H. et al., 2012. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell*, 22.
- Olayioye, M. a et al., 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development

- and cancer. *The EMBO journal*, 19(13), pp.3159–3167.
- Orimo, A. et al., 2005. Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell*, 121(3), pp.335–348.
- Oshima, H. et al., 2001. Morphogenesis and Renewal of Hair Follicles from Adult Multipotent Stem Cells. *Cell*, 104(2), pp.233–245.
- Osório, L., Long, F. & Zhou, Z., 2016. Uncovering the stem cell hierarchy by genetic lineage tracing in the mammary gland. *AIMS Genetics*, 3(2), pp.130–145.
- Ostendorf, T., 2003. A Fully Human Monoclonal Antibody (CR002) Identifies PDGF-D as a Novel Mediator of Mesangioproliferative Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(9), pp.2237–2247.
- Pablos, J.L. et al., 1999. Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *The American journal of pathology*, 155(5), pp.1577–86.
- Padua, D. & Massague, J., 2009. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell research*, 19.
- Pardal, R., Clarke, M.F. & Morrison, S.J., 2003. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature reviews. Cancer*, 3(12), pp.895–902.
- Park, J.B. et al., 2012. Phospholipase signalling networks in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(11), pp.782–792.
- Pastushenko, I. et al., 2015. Skin Stem Cells: At the Frontier Between the Laboratory and Clinical Practice. Part 1: Epidermal Stem Cells. *Actas dermo-sifiliograficas*, 106(9), pp.725–732.
- Patel, P. et al., 2010. Platelet derived growth factor B and epithelial mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells. *Matrix Biol*, 29(2), pp.97–106.
- Paulsson, J. & Micke, P., 2014. Prognostic relevance of cancer-associated fibroblasts in human cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 25, pp.61–68.
- Peinado, H., Olmeda, D. & Cano, A., 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*, 7(6), pp.415–428.
- Petiot, A., 2003. A crucial role for Fgfr2-IIIb signalling in epidermal development and hair follicle patterning. *Development*, 130(22), pp.5493–5501.
- Phillips, J.M. et al., 2011. Curcumin inhibits skin squamous cell carcinoma tumor growth in vivo.

- Otolaryngol Head Neck Surg*, 145, pp.58–63.
- Piepkorn, M. et al., 1995. Expression of amphiregulin is regulated in cultured human keratinocytes and in developing fetal skin. *The Journal of investigative dermatology*, 105(6), pp.802–9.
- Piepkorn, M., Pittelkow, M.R. & Cook, P.W., 1998. Autocrine regulation of keratinocytes: The emerging role of heparin- binding, epidermal growth factor-related growth factors. *Journal of Investigative Dermatology*, 111(5), pp.715–721.
- Pietras, K. et al., 2013. PDGF receptors as cancer drug targets. *Trends in Molecular Medicine*, 25(3), pp.273–283.
- Pontén, F. et al., 1994. Epithelial-Stromal Interactions in Basal Cell Cancer: The PDGF System. *Journal of Investigative Dermatology*, 102(3), pp.304–309.
- Popa, C. et al., 2007. The role of TNF- in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *The Journal of Lipid Research*, 48(4), pp.751–762.
- Potten, C.S. & Morris, R.J., 1988. Epithelial stem cells in vivo. *Journal of cell science. Supplement*, 10, pp.45–62.
- Proudfoot, A.E.I., 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*, 2(2), pp.106–115.
- Quail, D.F. & Joyce, J.A., 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 19(11), pp.1423–1437.
- Quan, C. et al., 2015. Dermal fibroblast expression of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) promotes epidermal keratinocyte proliferation in normal and diseased skin. *Protein and Cell*, 6(12), pp.890–903.
- Rajagopal, S. et al., 2010. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the “decoy” receptor CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2), pp.628–32.
- Raman, D. et al., 2007. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett*, 256(2), pp.137–165.
- Reya, T. et al., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), pp.105–11.
- Reya, T. & Clevers, H., 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035), pp.843–850.
- Rhee, H., Polak, L. & Fuchs, E., 2006. Lhx2 maintains stem cell character in hair follicles. *Science*, 312(5782), pp.1946–9.

- Ricci, C. & Ferri, N., 2015. Naturally occurring PDGF receptor inhibitors with potential anti-atherosclerotic properties. *Vascular Pharmacology*, 70, pp.1–7.
- Richmond, A., Yang, J. & Su, Y., 2009. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 22(2), pp.175–186.
- Rodero, M.P. et al., 2013. Control of both myeloid cell infiltration and angiogenesis by CCR1 promotes liver cancer metastasis development in mice. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 15(6), pp.641–8.
- Rossi, D. & Zlotnik, A., 2000. THE BIOLOGY OF CHEMOKINES AND THEIR RECEPTORS. , (6), pp.217–242.
- Ruan, J. et al., 2013. Imatinib disrupts lymphoma angiogenesis by targeting vascular pericytes. *Blood*, 121(26), pp.5192–5202.
- Saavedra Ramírez, P.G., Vásquez Duque, G.M. & González Naranjo, L.A., Interleukin-6: friend or foe? Basis to understand its utility as a therapeutic target. *Iatreia*, 24(2), pp.157–166.
- Sahu, N. & Grandis, J.R., 2011. New advances in molecular approaches to head and neck squamous cell carcinoma. *Anti-cancer drugs*, 22(7), pp.656–664.
- Saint, S., Bâtiment, E. & Fliche, A., 2011. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, 16(3), pp.133–144.
- Salcedo, R. et al., 2000. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*, 96(1), pp.34–40.
- Samarasinghe, V., Madan, V. & Lear, J.T., 2011. Management of high-risk squamous cell carcinoma of the skin. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 11(5), pp.763–769.
- Sánchez-Alcañiz, J.A. et al., 2011. Cxcr7 Controls Neuronal Migration by Regulating Chemokine Responsiveness. *Neuron*, 69(1), pp.77–90.
- Sánchez-Martín, L., Sánchez-Mateos, P. & Cabañas, C., 2013. CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends in molecular medicine*, 19(1), pp.12–22.
- Sánchez-Tilló, E. et al., 2011. β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(48), pp.19204–9.
- Santos, M. et al., 2002. The Expression of Keratin K10 in the Basal Layer of the Epidermis Inhibits

- Cell Proliferation and Prevents Skin Tumorigenesis. *Journal of Biological Chemistry* , 277(21), pp.19122–19130.
- Sarrio, D. et al., 2012. Epithelial and Mesenchymal Subpopulations Within Normal Basal Breast Cell Lines Exhibit Distinct Stem Cell/Progenitor Properties. *STEM CELLS*, 30(2), pp.292–303.
- Sarvaiya, P.J. et al., 2013. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget*, 4(12), pp.2171–85.
- Savagner, P., 2010. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 21 Suppl 7(suppl_7), p.vii89-92.
- Scala, S., 2015. Molecular pathways: Targeting the CXCR4-CXCL12 Axis-Untapped potential in the tumor microenvironment. *Clinical Cancer Research*, 21(19), pp.4278–4285.
- Scaltriti, M. & Baselga, J., 2006. The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway : A Model for Targeted Therapy The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway : A Model for Targeted Therapy. *Clin Cancer Res*, 12(18), pp.5268–5272.
- Schepers, A.G. et al., 2012. Lineage Tracing Reveals Lgr5+ Stem Cell Activity in Mouse Intestinal Adenomas. *Science*, 337(6095), pp.730–735.
- Schneider, M.R. et al., 2008. Beyond wavy hairs: the epidermal growth factor receptor and its ligands in skin biology and pathology. *The American journal of pathology*, 173(1), pp.14–24.
- Schober, M. & Fuchs, E., 2011. Tumor-initiating stem cells of squamous cell carcinomas and their control by TGF- β and integrin/focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26), pp.10544–9.
- Sciacaluga, M. et al., 2013. Functional cross talk between CXCR4 and PDGFR on glioblastoma cells is essential for migration. *PloS one*, 8(9), p.e73426.
- Seshacharyulu, P. et al., 2013. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(1), pp.15–31.
- Seshacharyulu, P. et al., 2012. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(1), pp.15–31.
- Shi, Y. et al., 2006. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Research*, 16(2), pp.126–133.
- Shirozu, M. et al., 1995. Structure and Chromosomal Localization of the Human Stromal Cell-

- Derived Factor 1 (SDF1) Gene. *Genomics*, 28(3), pp.495–500.
- Sibilia, M. et al., 2000. The EGF receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development. *Cell*, 102(2), pp.211–20.
- Siegle, J.M. et al., 2014. SOX2 is a cancer-specific regulator of tumour initiating potential in cutaneous squamous cell carcinoma. *Nature communications*, 5, p.4511.
- Sierra, J.R., Cepero, V. & Giordano, S., 2010. Molecular mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase targeted therapy. *Molecular cancer*, 9, p.75.
- da Silva-Diz, V. et al., 2016. Cancer Stem-like Cells Act via Distinct Signaling Pathways in Promoting Late Stages of Malignant Progression. *Cancer Research*, 76(5), pp.1245–1259.
- da Silva-Diz, V. et al., 2012. Progeny of Lgr5-expressing hair follicle stem cell contributes to papillomavirus-induced tumor development in epidermis. *Oncogene*, (May 2012), pp.3732–3743.
- da Silva-Diz, V. et al., 2013. Progeny of Lgr5-expressing hair follicle stem cell contributes to papillomavirus-induced tumor development in epidermis. *Oncogene*, 32(32), pp.3732–3743.
- da Silva, J.M. et al., 2016. Significance of chemokine and chemokine receptors in head and neck squamous cell carcinoma: A critical review. *Oral Oncology*, 56, pp.8–16.
- Skobe, M. & Fusenig, N.E., 1998. Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(3), pp.1050–5.
- Smit, M.A. & Peeper, D.S., 2010. Epithelial-mesenchymal transition and senescence: Two cancer-related processes are crossing paths. *Aging*, 2(10), pp.735–741.
- Smith, J.S. et al., 2000. Amplification of the platelet-derived growth factor receptor-A (PDGFRA) gene occurs in oligodendrogliomas with grade IV anaplastic features. *J Neuropathol.Exp.Neurol.*, 59(6), pp.495–503.
- Solanas, G. & Benitah, S.A., 2013. Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(11), pp.737–748.
- Soriano, P., 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature genetics*, 21(1), pp.70–71.
- Soriano, P., 1997. The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development (Cambridge, England)*, 124(14), pp.2691–700.

- De Sousa E Melo, F. et al., 2013. Cancer heterogeneity--a multifaceted view. *EMBO reports*, 14(8), pp.686–95.
- Sporn, M.B. & Roberts, A.B., 1986. Peptide growth factors and inflammation, tissue repair, and cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 78(2), pp.329–332.
- Stamatovic, S.M. et al., 2006. CCL2 regulates angiogenesis via activation of Ets-1 transcription factor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(4), pp.2651–61.
- Stankic, M. et al., 2013. TGF- β -Id1 signaling opposes Twist1 and promotes metastatic colonization via a mesenchymal-to-epithelial transition. *Cell reports*, 5(5), pp.1228–42.
- Steinestel, K. et al., 2014. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition. *Clinical and Translational Medicine*, 3(1), pp.1–13.
- Stern, D.F., 2000. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast Cancer Research*, 2(3), pp.1–8.
- Strutz, F. et al., 2002. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int*, 61(5), pp.1714–1728.
- STRUYF, S., PROOST, P. & VAN DAMME, J., 2003. Regulation of the Immune Response by the Interaction of Chemokines and Proteases. In *Advances in Immunology*. pp. 1–44.
- Sun, X. et al., 2010. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(4), pp.709–722.
- Sun, Y.X. et al., 2003. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *Journal of Cellular Biochemistry*, 89(3), pp.462–473.
- Taki, M. et al., 2003. Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Cancer Science*, 94(7), pp.593–597.
- Talbot, L.J., Bhattacharya, S.D. & Kuo, P.C., 2012. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(2), pp.117–136.
- Tam, W.L., Lu, H., Buikhuisen, J., Soh, B.S., Lim, E., Reinhardt, F., Wu, Z.J., Krall, J.A., et al., 2013. Protein Kinase C α Is a Central Signaling Node and Therapeutic Target for Breast Cancer Stem Cells. *Cancer Cell*, 24(3), pp.347–364.
- Tam, W.L., Lu, H., Buikhuisen, J., Soh, B.S., Lim, E., Reinhardt, F., Wu, Z.J., Krall, J.A., et al., 2013.

- Protein kinase C α is a central signaling node and therapeutic target for breast cancer stem cells. *Cancer cell*, 24(3), pp.347–64.
- Taniguchi, K. & Karin, M., 2014. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Seminars in Immunology*, 26(1), pp.54–74.
- Taylor, G. et al., 2000. Involvement of Follicular Stem Cells in Forming Not Only the Follicle but Also the Epidermis. *Cell*, 102(4), pp.451–461.
- Teicher, B.A. & Fricker, S.P., 2010. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(11), pp.2927–2931.
- Thiery, J.P. et al., 2016. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), pp.871–890.
- Thiery, J.P., 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews. Cancer*, 2(6), pp.442–454.
- Thiery, J.P. & Sleeman, J.P., 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(2), pp.131–42.
- Toffalini, F. & Demoulin, J., 2010. New insights into the mechanisms of hematopoietic cell transformation by activated receptor tyrosine kinases. *Blood*, 116(14), pp.2429–2437.
- Tomita, T. et al., 2000. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor upregulates matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and membrane type-1 MMP (MT1-MMP) in human head and neck cancer cells. *Cancer letters*, 156(1), pp.83–91.
- Tomita, Y., Akiyama, M. & Shimizu, H., 2006. PDGF isoforms induce and maintain anagen phase of murine hair follicles. *Journal of Dermatological Science*, 43(2), pp.105–115.
- Trempeus, C.S. et al., 2003. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *The Journal of investigative dermatology*, 120(4), pp.501–11.
- Tsai Jeff, H. et al., 2012. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell*, 22.
- Tumbar, T. et al., 2004. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5656), pp.359–63.
- Turner, N. & Grose, R., 2010. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*, 10(2), pp.116–129.

- Vandercappellen, J., Van Damme, J. & Struyf, S., 2008. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer letters*, 267(2), pp.226–44.
- Vasioukhin, V. et al., 1999. The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15), pp.8551–6.
- Vindrieux, D., Escobar, P. & Lazennec, G., 2009. Emerging roles of chemokines in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 16(3), pp.663–673.
- Visvader, J.E., 2011. Cells of origin in cancer. *Nature*, 469(7330), pp.314–322.
- Visvader, J.E. & Lindeman, G.J., 2012. Cancer stem cells: Current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*, 10(6), pp.717–728.
- Visvader, J.E. & Lindeman, G.J., 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews. Cancer*, 8(10), pp.755–68.
- Wan, X. et al., 2014. Prostate cancer cell-stromal cell crosstalk via FGFR1 mediates antitumor activity of dovitinib in bone metastases. *Science Translational Medicine*, 6(252), p.252ra122-252ra122.
- Wang, X. et al., 2013. The role of cancer stem cells in cancer metastasis: new perspective and progress. *Cancer epidemiology*, 37(1), pp.60–3.
- Wang, Y. et al., 2011. CXCR4 and CXCR7 Have Distinct Functions in Regulating Interneuron Migration. *Neuron*, 69(1), pp.61–76.
- Wang, Z. et al., 2010. Emerging roles of PDGF-D signaling pathway in tumor development and progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1806(1), pp.122–130.
- Watt, F.M. & Jensen, K.B., 2009. Epidermal stem cell diversity and quiescence. *EMBO Molecular Medicine*, 1(5), pp.260–267.
- Waugh, D.J.J. & Wilson, C., 2008. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(21), pp.6735–6741.
- Wei, T. et al., 2014. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha promotes tumor progression and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 5(21), pp.10307–10317.
- Wellner, U. et al., 2009. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nature cell biology*, 11(12), pp.1487–1495.

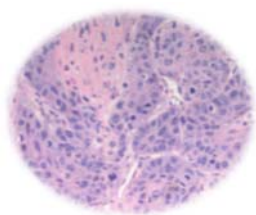
- Wendt, M.K. et al., 2014. Fibroblast growth factor receptor splice variants are stable markers of oncogenic transforming growth factor β 1 signaling in metastatic breast cancers. *Breast Cancer Research*, 16(2), p.3381.
- Wesche, J., Haglund, K. & Haugsten, E.M., 2011. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochemical Journal*, 437(2), pp.199–213.
- White, A.C. et al., 2011. Defining the origins of Ras/p53-mediated squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(18), pp.7425–7430.
- White, R.A. et al., 2013. Epithelial stem cell mutations that promote squamous cell carcinoma metastasis. *The Journal of clinical investigation*, 123(10), pp.4390–404.
- Whiteside, T.L., 2008. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27(45), pp.5904–5912.
- Witz, I.P. & Levy-Nissenbaum, O., 2006. The tumor microenvironment in the post-PAGET era. *Cancer Letters*, 242(1), pp.1–10.
- Wong, C.E. et al., 2013. Inflammation and Hras signaling control epithelial-mesenchymal transition during skin tumor progression. *Genes & Development*, 27(6), pp.670–682.
- Woo, W.-M. & Oro, A.E., 2011. SnapShot: Hair Follicle Stem Cells. *Cell*, 146(2), p.334–334.e2.
- Wu, P.-S., Egger, B. & Brand, A.H., 2008. Asymmetric stem cell division: Lessons from Drosophila. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(3), pp.283–293.
- Würth, R. et al., 2014. CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8(May), p.144.
- Xian, W. et al., 2005. Pleiotropic effects of FGFR1 on cell proliferation, survival, and migration in a 3D mammary epithelial cell model. *The Journal of cell biology*, 171(4), pp.663–673.
- Yadav, A. et al., 2011. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. *Molecular cancer research : MCR*, 9(12), pp.1658–67.
- Yan, H.H. et al., 2015. CCL9 induced by TGF- β signaling in myeloid cells enhances tumor cell survival in the premetastatic organ. *Cancer research*, 75(24), pp.5283–5298.
- Yang, A. et al., 1999. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial

- development. *Nature*, 398(6729), pp.714–718.
- Yang, J. et al., 2010. Fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in keratinocytes control the epidermal barrier and cutaneous homeostasis. *The Journal of Cell Biology*, 188(6), pp.935–952.
- Yang, M.-H. et al., 2010. Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nature cell biology*, 12(10), pp.982–92.
- Yarden, Y., 2001. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European journal of cancer*, 37 Suppl 4, pp.S3–S8.
- Yarden, Y. & Sliwkowski, M.X., 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(2), pp.127–137.
- Yauch, R.L., 2005. Epithelial versus Mesenchymal Phenotype Determines In vitro Sensitivity and Predicts Clinical Activity of Erlotinib in Lung Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 11(24), pp.8686–8698.
- Yi, F., Jaffe, R. & Prochownik, E. V., 2003. The CCL6 chemokine is differentially regulated by c-Myc and L-Myc, and promotes tumorigenesis and metastasis. *Cancer research*, 63(11), pp.2923–32.
- Youssef, K.K. et al., 2010. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nature cell biology*, 12(3), pp.299–305.
- Yu, H. & Jove, R., 2004. The stats of cancer - New molecular targets come of age. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), pp.97–105.
- Zhang, D. et al., 1997. Neuregulin-3 (NRG3): A Novel Neural Tissue-Enriched Protein that Binds and Activates ErbB4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(18), pp.9562–9567.
- Zhang, K. et al., 2012. Wnt/beta-Catenin Signaling in Glioma. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 7(4), pp.740–749.
- Zhang, L. et al., 2007. Tissue microenvironment modulates CXCR4 expression and tumor metastasis in neuroblastoma. *Neoplasia*, 9(1), pp.36–46.
- Zhang, X.-F. et al., 2010. Conditional β -catenin loss in mice promotes chemical hepatocarcinogenesis: Role of oxidative stress and platelet-derived growth factor receptor α /phosphoinositide 3-kinase signaling. *Hepatology*, 52(3), pp.954–965.
- Zhu, D.Y. et al., 2014. Twist1 correlates with poor differentiation and progression in gastric

adenocarcinoma via elevation of FGFR2 expression. *World journal of gastroenterology*, 20(48), pp.18306–18315.

Zlotnik, A. & Yoshie, O., 2012. The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity*, 36(5), pp.705–716.

Anexo



Cancer Stem-like Cells Act via Distinct Signaling Pathways in Promoting Late Stages of Malignant Progression

Victoria da Silva-Diz¹, Pilar Simón-Extremuera¹, Adrià Bernat-Peguera¹, Jana de Sostoa¹, Maria Urpí¹, Rosa M. Penín², Diana Pérez Sidelnikova³, Oriol Bermejo³, Joan Maria Viñals³, Annie Rodolosse⁴, Eva González-Suárez¹, Antonio Gómez Moruno¹, Miguel Ángel Pujana⁵, Manel Esteller^{1,6,7}, Alberto Villanueva⁵, Francesc Viñals^{5,6}, and Purificación Muñoz¹

Abstract

Cancer stem-like cells (CSC) play key roles in long-term tumor propagation and metastasis, but their dynamics during disease progression are not understood. Tumor relapse in patients with initially excised skin squamous cell carcinomas (SCC) is characterized by increased metastatic potential, and SCC progression is associated with an expansion of CSC. Here, we used genetically and chemically-induced mouse models of skin SCC to investigate the signaling pathways contributing to CSC function during disease progression. We found that CSC regulatory mechanisms change in advanced SCC, correlating with aggressive tumor growth and enhanced metastasis. β -Catenin and EGFR signaling,

induced in early SCC CSC, were downregulated in advanced SCC. Instead, autocrine FGFR1 and PDGFR α signaling, which have not been previously associated with skin SCC CSC, were upregulated in late CSC and promoted tumor growth and metastasis, respectively. Finally, high-grade and recurrent human skin SCC recapitulated the signaling changes observed in advanced mouse SCC. Collectively, our findings suggest a stage-specific switch in CSC regulation during disease progression that could be therapeutically exploited by targeting the PDGFR and FGFR1 pathways to block relapse and metastasis of advanced human skin SCC. *Cancer Res*; 76(5); 1245–59. ©2015 AACR.

Introduction

Skin squamous cell carcinoma (SCC) is the second most common nonmelanoma skin cancer in humans. Eight percent to 10% of patients suffer tumor relapse after surgical excision, which is associated with an enhanced propensity to metastasize and with poor survival (1). SCC development in humans and mice is a multistage process ending in the generation of invasive tumors (2). Most invasive tumors conserve some epithelial traits and are considered to be well-differentiated

SCCs (WD-SCCs). However, some tumors have poorly differentiated features (PD-SCCs) and are eventually spindle-shaped, these traits being associated with enhanced recurrence and metastasis (1, 3). Currently, advanced and metastatic skin SCCs are mostly treated with radiotherapy or classical chemotherapy, which have limited clinical benefits (4). Furthermore, the mechanisms that control SCC growth and metastasis at different stages of progression remain unclear, limiting the possibilities for targeted therapy.

Solid tumors may be hierarchically organized and contain cancer stem cells (CSC), which drive long-term tumor growth and disease progression (5, 6) and are responsible for relapse after therapy (7, 8). CSCs are also the most likely candidates for metastasis-initiating activities, as they may induce epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), which promotes tumor cell migration (9, 10). Mouse skin SCC cells expressing CD34 and $\alpha 6$ -integrin are enriched in tumor-initiating and long-term tumor-propagating cells compared with the bulk of tumor cells, and they are able to recapitulate the phenotypic cell diversity of parental tumors in engraftment assays (11, 12). Sox2 expression is induced in CSCs of SCCs to promote CSC self-renewal and skin SCC growth (13, 14). Wnt/ β -catenin, TGF β , and VEGF signaling pathways regulate CD34⁺-CSC features at early stages of progression (11, 15, 16). Moreover, skin SCC progression is associated with an expansion of the CD34⁺-CSC population (12, 16). However, it is not known whether signaling pathways regulating CSC function switch during progression. In this study, we demonstrate that CSC features and regulatory mechanisms change during late stages of skin SCC progression to promote aggressive tumor growth and metastasis.

¹Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain. ²Pathology Service, Hospital Universitario de Bellvitge/IDIBELL, Barcelona, Spain. ³Plastic Surgery Unit, Hospital Universitario de Bellvitge/IDIBELL, Barcelona, Spain. ⁴Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Barcelona, Spain. ⁵Laboratory of Translational Research, Catalan Institute of Oncology (ICO/IDIBELL), Barcelona, Spain. ⁶Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona-IDIBELL, Barcelona, Spain. ⁷Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

P. Simón-Extremuera and A. Bernat-Peguera contributed equally to this article.

Corresponding Author: Purificación Muñoz, Bellvitge Biomedical Research Institute, Avda. Gran Via de L'Hospitalet 199-203, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08907, Spain. Phone: 34-932607179; Fax: 34-932607219; E-mail: p.munoz@idibell.cat

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1631

©2015 American Association for Cancer Research.

Materials and Methods

Mouse models

K14-HPV16^{Tg/+} mice (FVB/C57/Bl6 F1; ref. 17) were used as models of SCC development. K14-HPV16^{Tg/+} mice were treated with 7,12—dimethylbenz(a)anthracene/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (DMBA/TPA), as previously described (18). To generate ortho-SCC (OT-SCC) lineages, small pieces of spontaneous or DMBA/TPA-induced tumor (2–4 mm³) were implanted in the back skin of nude mice (Harlan Laboratories). Tumor sizes were measured every week ($V = \pi/6 \times L \times W^2$). When they reached a critical size, they were surgically excised and a small piece was serially engrafted in each new immunodeficient mouse. Resected mice were checked daily until they presented symptoms of poor health, whereupon they were sacrificed and checked for the presence of metastatic lesions. Animal housing, handling, and all procedures involving mice were approved by the Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL) Ethics Committee (Barcelona, Spain), in accordance with the Spanish national regulations.

Human skin SCC samples

Samples of human skin SCCs were supplied by the Plastic Surgery and Pathology Units of the Hospital Universitario de Bellvitge (IDIBELL, Barcelona Spain) and the Spanish Hospital Platform Biobank Network (RetBioH; www.redbiobancos.es). The protocol of sample collection was supervised and approved by the Ethical Committee of Clinical Research of Hospital Universitario de Bellvitge (IDIBELL). All patients were informed beforehand and their signed consent to participate was obtained.

Isolation of SCC cells and flow cytometry analysis

Tumor cells were isolated from SCC and analyzed for flow cytometry as previously described (19). For detailed protocols, see Supplementary Methods.

Cell cultures and treatments

Tumor cells (hematopoietic lineage and endothelial-negative cells) isolated from PD/S-SCCs (PD/S cells) were grown in basic medium composed of DMEM-F12 medium (Gibco, Life Technologies) with B27 (Gibco, Life Technologies) and penicillin/streptomycin (PAA Laboratories) in a humidified 37°C, 5% CO₂ incubator. Tumor cells isolated from WD-SCCs (WD cells), were grown in basic medium with EGF (20 ng/mL; Sigma). Protocols for determining cell proliferation and lentiviral transduction are described in detail in Supplementary Methods.

Tumor cell grafting and *in vivo* treatments

To limiting dilution assays, tumor cells isolated from WD-SCCs and PD/S-SCCs were serially diluted, mixed with 1×10^6 newborn dermal fibroblasts, and subcutaneously injected in nude mice (Harlan Laboratories). Tumor growth was monitored for 8 to 12 weeks. The tumor-initiating cell frequency was calculated using ELDA software (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/ellda>). A similar frequency of tumor-initiating cells was obtained when Matrigel (BD Biosciences) was coinjected with tumor cells (1:1 v/v) instead of dermal fibroblasts (data not shown). To determine the effect of PDGFR α knockdown on tumor growth and metastasis, 4×10^3 sh-control and sh-PDGFR α PD/S cells were subcutaneously injected in immunodeficient mice, as described above. Tumors were excised when they reached a critical size, and the mice were sacrificed 20 days later. Lungs were recovered to

quantify metastasis lesions. For pharmacologic inhibition of FGFR1 and PDGFR α , mice carrying orthotopically engrafted PD/S-SCCs were randomly assigned to a control or inhibitor treatment group. Imatinib (150 mg/kg; diluted in water; LC Laboratories) was orally administrated daily, and PD173074 (25 mg/kg; diluted in 50 mmol/L lactic acid; LC Laboratories) was daily intraperitoneally injected. Control groups were treated with the respective vehicle. OT-SCCs were excised, and resected mice were treated with their respective control or inhibitor solution and sacrificed 8 to 10 days later. Lungs and other organs were collected for the assessment of metastasis development.

In vitro invasion assays

Invasion assays were performed in CIM-16 plates (ACEA Biosciences) coated with 5% Matrigel (Factor-Reduced; BD Biosciences). Bottom chamber wells with DMEM 10% FBS and top chamber wells with serum-free medium were assembled and equilibrated for 1 hour at 37°C. PD/S cells (8×10^4), previously treated without (control) or with imatinib (4 μ mol/L) for 48 hours, and sh-control and PDGFR α -knockdown PD/S cells were seeded onto the top chamber and placed in the xCELLigence system. The cell index represents the capacity for cell invasion. In addition, sh-control, PDGFR α knockdown, and PD/S cells treated for 48 hours with different doses of imatinib were included in Matrigel and seeded in replicates on previously Matrigel-coated 96-well plates with 100 μ L of basic medium without or with imatinib. Images were captured 24 hours later using an inverted phase microscope, and spheres containing ≥ 4 invasion structures longer than 25 μ m were quantified.

Histology, IHC, and immunoblotting assays

Tumor samples were fixed in 4% formaldehyde overnight at 4°C, paraffin-embedded, and sectioned at 4 μ m. For immunofluorescence or immunohistochemical staining, we followed the protocols previously described in ref. 19. Whole-cell extracts for Western blot assays were prepared from tumors and isolated cells as previously described (see Supplementary Methods; ref. 20).

Reverse transcription, qPCR, and microarray analysis

Total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen), and reverse transcription and qPCR were carried out as previously described (see Supplementary Methods; ref. 19). cDNA amplification by picoprofiling was performed as previously described (21). Seven micrograms cDNA was used for hybridization in an Affymetrix Mouse Genome 430 PM Strip Array. Data array analyses are described in Supplementary Methods.

Sequencing analysis

Mutations in Hras (Q61L) and Kras (G12V, G12A, G12D, G13R, G13D, Q61L, and Q61H) were analyzed by pyrosequencing assays. The set of primers for PCR amplification and sequencing were designed with PyroMark Assay Design Software (Qiagen). PCR products were pyrosequenced and allele mutations were quantified with the Pyromark Q24 System (Qiagen), following the manufacturer's instructions.

Accession number

The gene expression data described in this study have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database under accession number GSE59439.

Results

Generation and characterization of lineages of skin SCC progression

To determine whether the aggressive growth and enhanced metastasis of advanced SCCs are associated with changes in CSC features, we generated mouse models of skin SCC progression based on tumors developed in K14-HPV16 mice. K14-HPV16 mice express E6 and E7 oncoproteins from the HPV16 papillomavirus in basal keratinocytes, and 30% of them develop spontaneous SCCs during their first year (3, 19), 27% of which were undifferentiated and/or spindle tumors. To promote SCC development, these mice were treated with DMBA/TPA. At the end of the treatment, all mice developed multiple invasive SCCs, most of them showing epithelial traits, while spindle-shaped tumors were more infrequent (4.65%), as previously reported in other mouse strains (22). Single small pieces from several SCC samples (spontaneous or DMBA/TPA-induced) were orthotopically grafted onto the back skin of nude mice. Samples of each OT-SCCs were serially engrafted in nude mice over several passages, generating SCC lineages (Supplementary Table S1). After the first engraftment, OT-SCCs recapitulated the histopathologic features of the parental tumors (Supplementary Fig. S1A). However, after serial engraftments, 62.5% of the WD-SCCs showing epithelial differentiation features (tumor cells organized in nests containing keratin pearls) progressed to moderated SCCs (MD-SCC), which evolved to PD-SCCs that frequently contained focal spindle regions, and finally to mesenchymal-shaped spindle tumors, in which the epithelial phenotype was completely lost (Supplementary Fig. S1A; Supplementary Table S1). Therefore, PD and spindle SCCs can be generated by the malignant advance of WD-SCCs.

K14 expression was strongly reduced and K8 expression was upregulated in PD-SCCs and spindle tumors (Supplementary Figs. S1C and S1D; ref. 3). On the basis of keratin expression and histopathologic features, SCCs from each lineage were classified as WD-SCCs or PD and spindle SCCs (PD/S-SCCs). PD/S-SCCs grew significantly faster than their respective WD-SCC precursors in all tumor lineages (Supplementary Fig. S1E). Nude mice carrying PD/S-SCCs showed reduced survival due to more frequent lower-latency metastasis occurring mainly in the lungs and occasionally in regional lymph nodes, kidney, and liver (Supplementary Figs. S1F–S1H).

Analysis of *Ras* genes showed that *Hras* was frequently mutated in primary DMBA/TPA-induced SCCs (*Hras* Q61L; 75% of tumors; refs. 23, 24). This mutation was infrequent in spontaneous SCCs, but 57.14% of them instead exhibited a distinct percentage of alleles with activating mutations in the *Kras* gene (G13R, G12A, G12D, and Q61L; Supplementary Fig. S1B; ref. 25). The intratumor genetic heterogeneity was frequently maintained in the respective OT-SCCs (data not shown), and some WD-SCCs (OT14 lineage) were able to progress to PD/S-SCCs in the absence of previously described *Hras*- or *Kras*-activating mutations.

Limiting dilution assays showed that the frequency of tumor-initiating cells was dramatically increased in OT7 and OT14 PD/S-SCCs compared with their WD-SCC precursors (Fig. 1A). SCCs with an epithelial and mesenchymal phenotype were respectively generated by tumor-initiating cells of parental WD-SCCs and PD/S-SCCs (Fig. 1B), suggesting that tumor-initiating cells of WD-SCCs, but not those of PD/S-SCCs, retained the ability to differentiate into an epithelial shape. As reported in other mouse models (11, 12), $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells (hematopoietic and

endothelial lineage negative cells) isolated from orthotopic WD-SCCs were significantly enriched in tumor-initiating cells relative to $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells or to the overall tumor cell population (Fig. 1A and Supplementary Fig. S2A). Moreover, tumors derived from PD/S-SCC $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ grew significantly faster than tumors generated from WD-SCC $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells (Supplementary Fig. S2B). These results indicate that the ability of CD34⁺-CSCs to promote tumor growth changes significantly during progression. Although a similar tumor-initiating capability and impaired epithelial differentiation was observed in $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ and $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells isolated from PD/S-SCCs (Supplementary Fig. S2A; data not shown), previous reports demonstrated that, in contrast to CD34⁺ cells, CD34⁺-CSCs present long-term self-renewal capability in advanced SCCs and are considered as long-term tumor-propagating cells (12). Therefore, we compared the frequency and molecular features of the $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells from advanced tumors and from their respective WD-SCC precursors. We found that PD/S-SCCs of different lineages, derived from spontaneous or DMBA/TPA-induced WD-SCCs, showed a significant increase in the percentage of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells as compared with their respective precursors (Fig. 1C and D). A similar expansion in this cell population was observed in spontaneous PD/S-SCCs (Supplementary Fig. S2C).

In accordance with the loss of epithelial traits, the expression of the EpCAM epithelial marker was significantly downregulated in $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells of PD/S-SCCs (Fig. 1E and F and Supplementary Fig. S2C), implying that CSC features change during tumor progression. In addition, diminished expression of *Cdh1* (E-cadherin), and upregulation of *vimentin* and the EMT-inducer transcription factors *Snail*, *Twist*, *Zeb1*, and *Zeb2* were detected in PD/S-SCCs from different lineages and in spontaneous PD/S-SCCs (Fig. 1G and Supplementary Figs. S2D and S2E), as reported in other mouse models (22). Thus, an expansion of CSCs and robust induction of EMT occur during OT-SCC progression, along with a switch from epithelial-to-mesenchymal features and enhanced metastasis capability.

It is important to highlight that the tumors that did not progress to PD/S-SCC during serial engraftment did not exhibit an expansion of CSCs or further induction of EMT (OT9 in Supplementary Fig. S2F), indicating that these events are not a consequence of long-term growth in immunodeficient mice. These results validate the OT-SCC lineages as models for characterizing CSC alterations during tumor progression.

$\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ CSC features change during SCC progression

To determine whether alterations in features of CSCs can contribute to tumor progression, we compared the global gene expression profiles of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells isolated from PD/S-SCCs (late CSC, L-CSC) and their respective precursor WD-SCCs (early CSC, E-CSC) from different lineages. This analysis revealed 1,839 genes differentially expressed (by 2-fold or more; FDR < 5%) in L-CSCs compared with E-CSCs, giving rise to a gene signature for CSCs in advanced and mesenchymal SCCs (Fig. 2A; Supplementary Table S2). Genes overexpressed in this signature were mainly those associated with proliferation, morphogenesis, negative regulation of apoptosis, cytoskeleton organization, motility, and metastasis, whereas underexpressed genes were linked to cell differentiation, cell adhesion, and tight junction

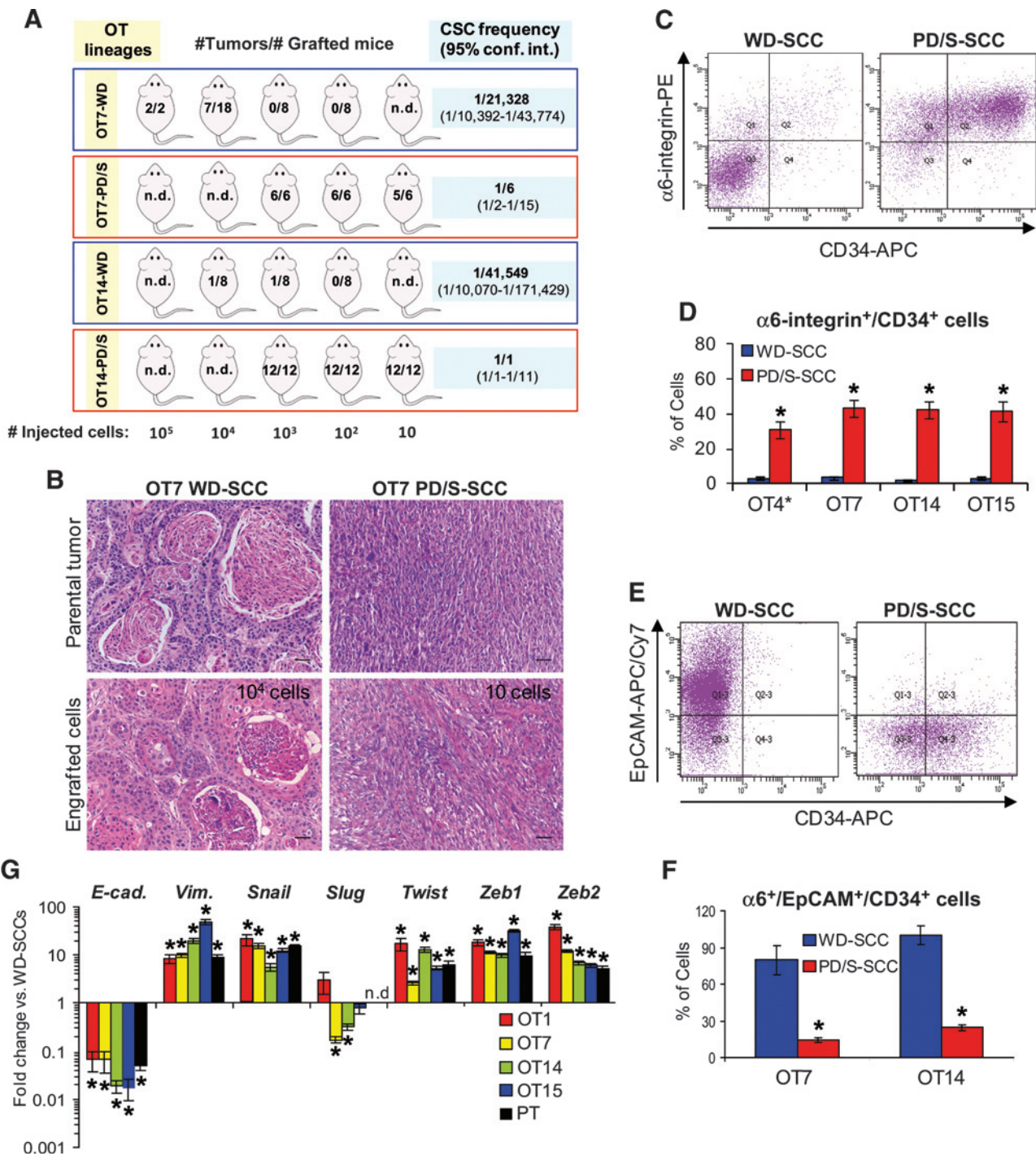


Figure 1. Strong induction of EMT and expansion of CSCs is observed in advanced SCCs of different lineages of progression. A, serial dilutions of tumor cells isolated from WD-SCCs and PD/S-SCCs from the indicated lineages (OT) were injected into immunodeficient mice (6–18 mice per dilution). The number of mice developing tumors, frequency of CSCs, and confidence intervals (conf. int.) for each condition is shown (n.d., not determined). B, representative images showing histopathologic features of parental and regenerated tumors after the engraftment of the indicated number of tumor cells. Scale bar, 30 μ m. C and D, quantification of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells in OT WD-SCCs and PD/S-SCCs by flow cytometry. D, means ($\pm$ SE) of the percentages of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells in the indicated tumors. OT4* is SCC lineage derived from a spontaneous WD-SCC. E and F, mean $\pm$ SE of the percentages of $\alpha 6$ -integrin⁺/EpCAM⁺/CD34⁺ cells in WD-SCCs and PD/S-SCCs (6–8 tumors per group), as quantified by flow cytometry. G, qRT-PCR results showing the levels (mean $\pm$ SE) of the indicated mRNAs in PD/S-SCCs relative to WD-SCCs (six samples per group) in different lineages (OT) and in primary SCCs (PT) spontaneously developed in K14-HPV16 mice (four samples per group). *, significant differences between WD-SCCs and PD/S-SCCs (*t* test; *P* < 0.05). E-cad., E-cadherin; Vim., vimentin.

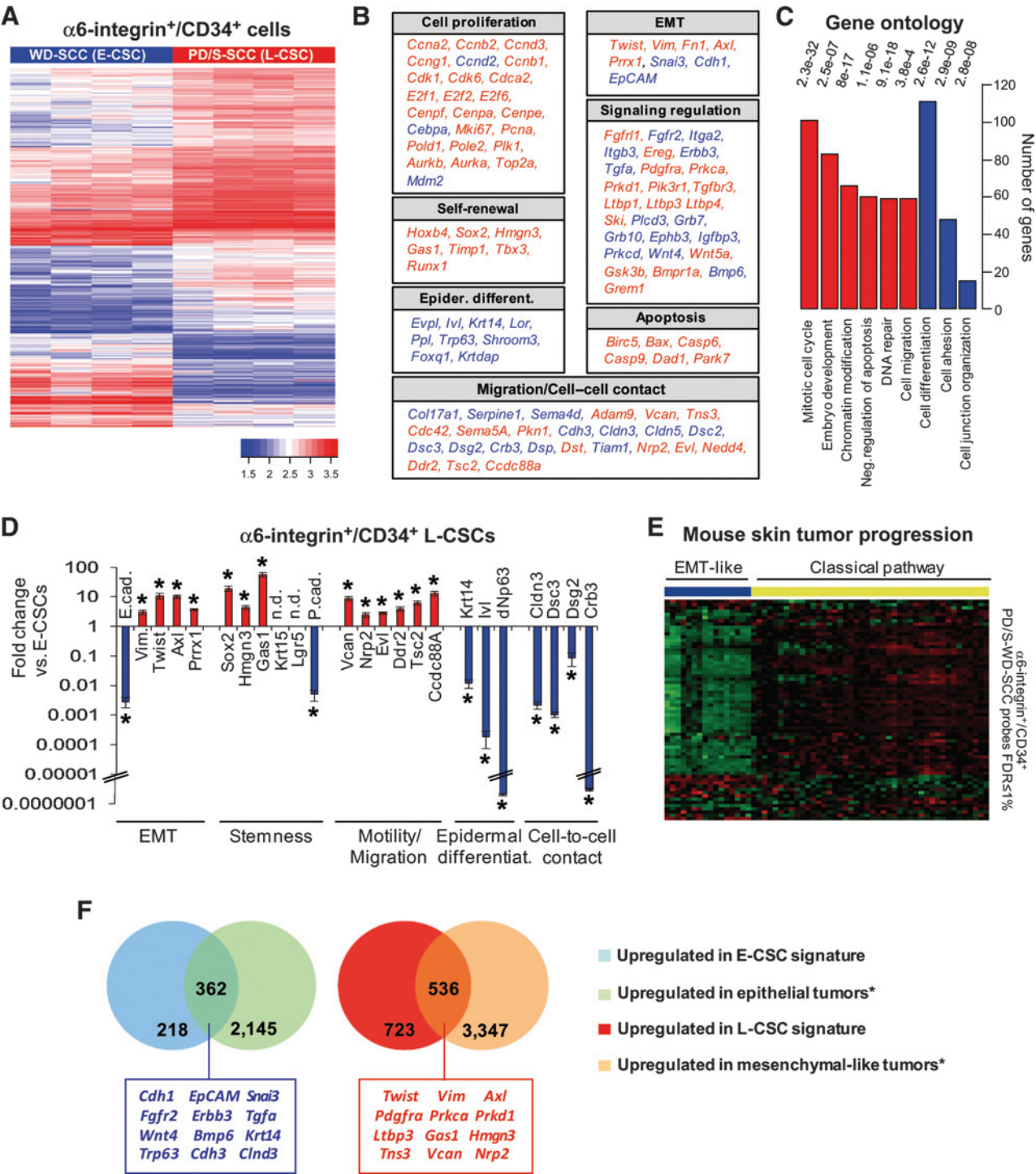


Figure 2. CSC gene signature changes during SCC progression. A, hierarchical gene-cluster analysis of genes differentially expressed ($\log_2$ FC ≥ 1 ; FDR $P < 0.05$) between $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ CSCs of PD/S-SCCs (L-CSC) and their respective WD-SCC precursors (E-CSC; four CSC samples per group) from three lineages. B, selected set of genes overexpressed (red) or underexpressed (blue) in L-CSCs relative to E-CSCs. C, gene ontology enrichment analysis of genes differentially expressed in L-CSCs compared with E-CSCs. D, mean ($\pm$ SE) mRNA levels relative to *Gapdh* expression of the indicated genes in L-CSCs and E-CSCs (three samples per group). n.d., the expression of these genes was not detected in E-CSCs or L-CSCs. *, significant differences between groups (t test; $P < 0.05$). E, heatmap representation of differentially expressed genes in L-CSCs that identify genes in the previously reported EMT-like mouse SCC signature (22). F, Venn diagrams showing the overlap of genes from the L-CSC signature and those associated with epithelial-like SCCs and mesenchymal-like SCCs (22). A selected number of these overlapping genes is indicated.

maintenance (Fig. 2B–D). *Sox2*, *Hmgn3*, and *Gas1* stem cell markers were overexpressed, whereas *Cdh3* (P-cadherin) was underexpressed in L-CSCs compared with E-CSCs. *Krt15* and *Lgr5* was undetectable in both populations of CSCs (Fig. 2B and D). In addition, E-cadherin expression was strongly downregulated and *vimentin*, *Twist*, and *Axl* significantly overexpressed in L-CSCs, indicating that stemness and EMT were enhanced in these CSCs relative to E-CSCs. The overexpression of self-renewal-promoting genes and the underexpression of differentiation-related genes (Fig. 2D), together with the impaired differentiation capability of tumor-initiating cells of advanced tumors, suggest that an imbalance between self-renewal and differentiation is produced in CSCs during late stages of progression. Some of the altered genes described in this signature were also similarly deregulated in unrelated skin PD-SCCs, as unsupervised clustering correctly identified skin SCCs with an EMT-like status in other mouse SCC models (Fig. 2E; ref. 22). Indeed, a large subset of genes overexpressed in L-CSCs (536/1,259 genes) and in E-CSCs (362/578 genes) was also upregulated in EMT-like SCCs and in epithelial-like SCCs, respectively, in this DMBA/TPA-induced SCC model (Fig. 2F).

Furthermore, the expression of key factors related to WNT, FGFR, PDGFR, and EGFR pathways, which were previously associated with progression in other tumor types (26–28), was also signifi-

cantly altered in our L-CSC signature (Fig. 2B). This suggests that alterations in these pathways may be associated with CSC expansion, aggressive tumor growth, and metastasis in advanced SCCs.

β-Catenin signaling is downregulated in advanced skin SCCs

β-Catenin signaling is essential for sustaining CSC features in the early stages of skin SCCs (11), therefore we compared β-catenin expression in WD-SCCs and PD/S-SCCs. Most epithelial cells showed β-catenin labeling at the cell surface and more than 25% showed β-catenin nuclear staining in WD-SCCs (Fig. 3A and B). In contrast, there was considerable reduction of β-catenin overall and of its active form (non-phosphorylated Ser37/Thr41) in the respective PD/S-SCCs (Fig. 3C). Moreover, β-catenin transcriptional activity was analyzed by transducing tumor cells isolated from early and advanced SCCs (Supplementary Figs. S3A–S3C) with a β-catenin reporter construct (29). WD-SCCs and PD/S-SCCs were regenerated by engrafting transduced WD and PD cells into nude mice. We detected a subset of EGFP-expressing cells with β-catenin transcriptional activity at the base of the nest in WD-SCCs (Fig. 3D), where CD34⁺-CSCs reside (11, 15, 16). However, EGFP-expressing cells were absent from PD/S-SCCs (Fig. 3D). Therefore, although β-catenin activity plays an important role in SCC generation and growth in early SCCs, this pathway is switched off in advanced SCCs.

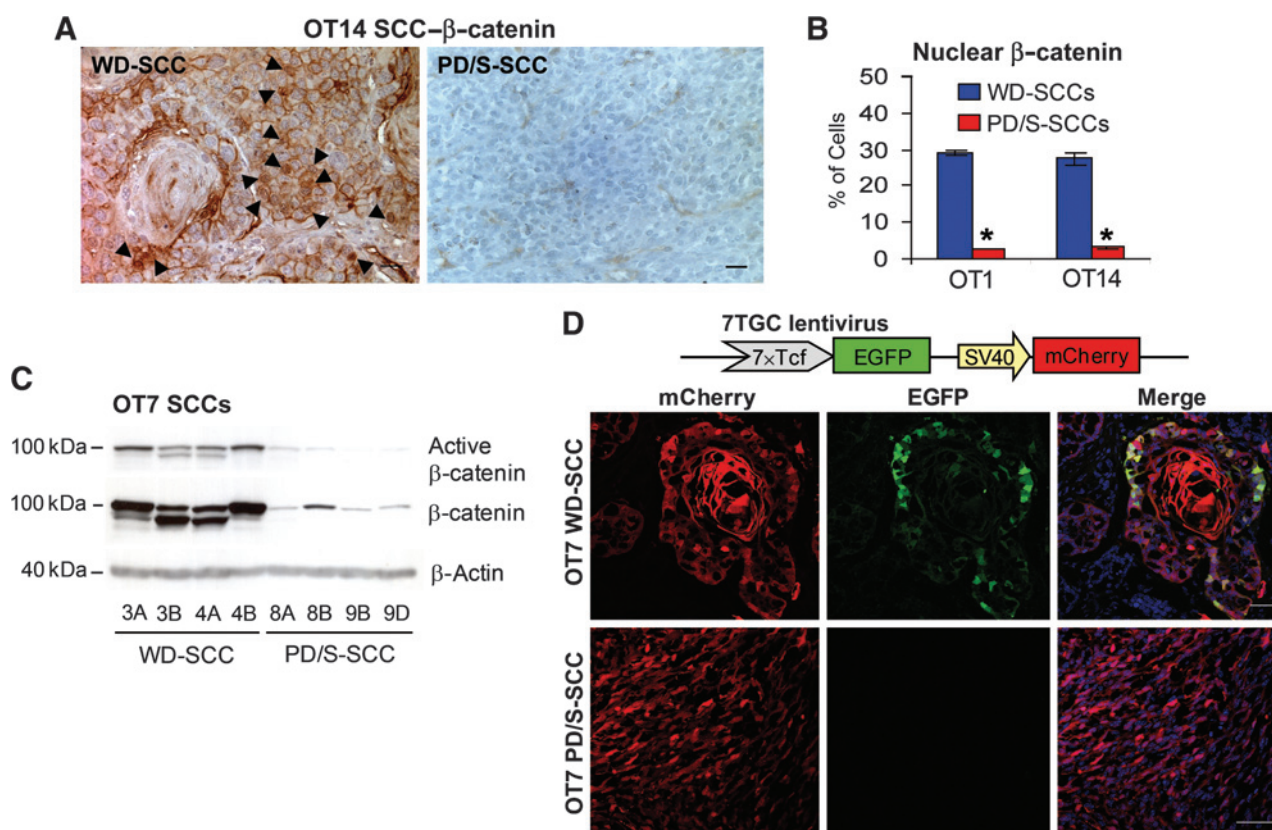
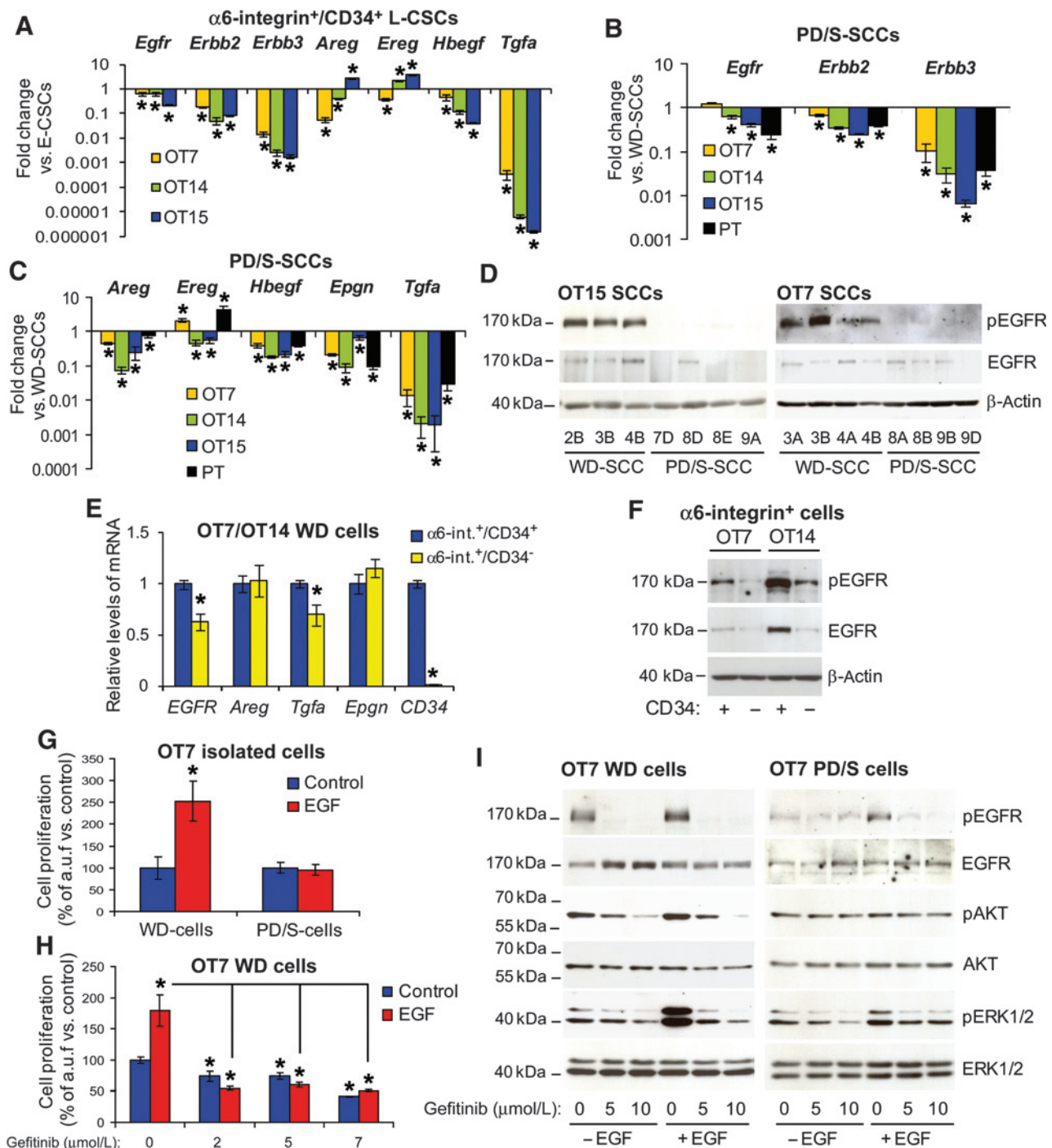
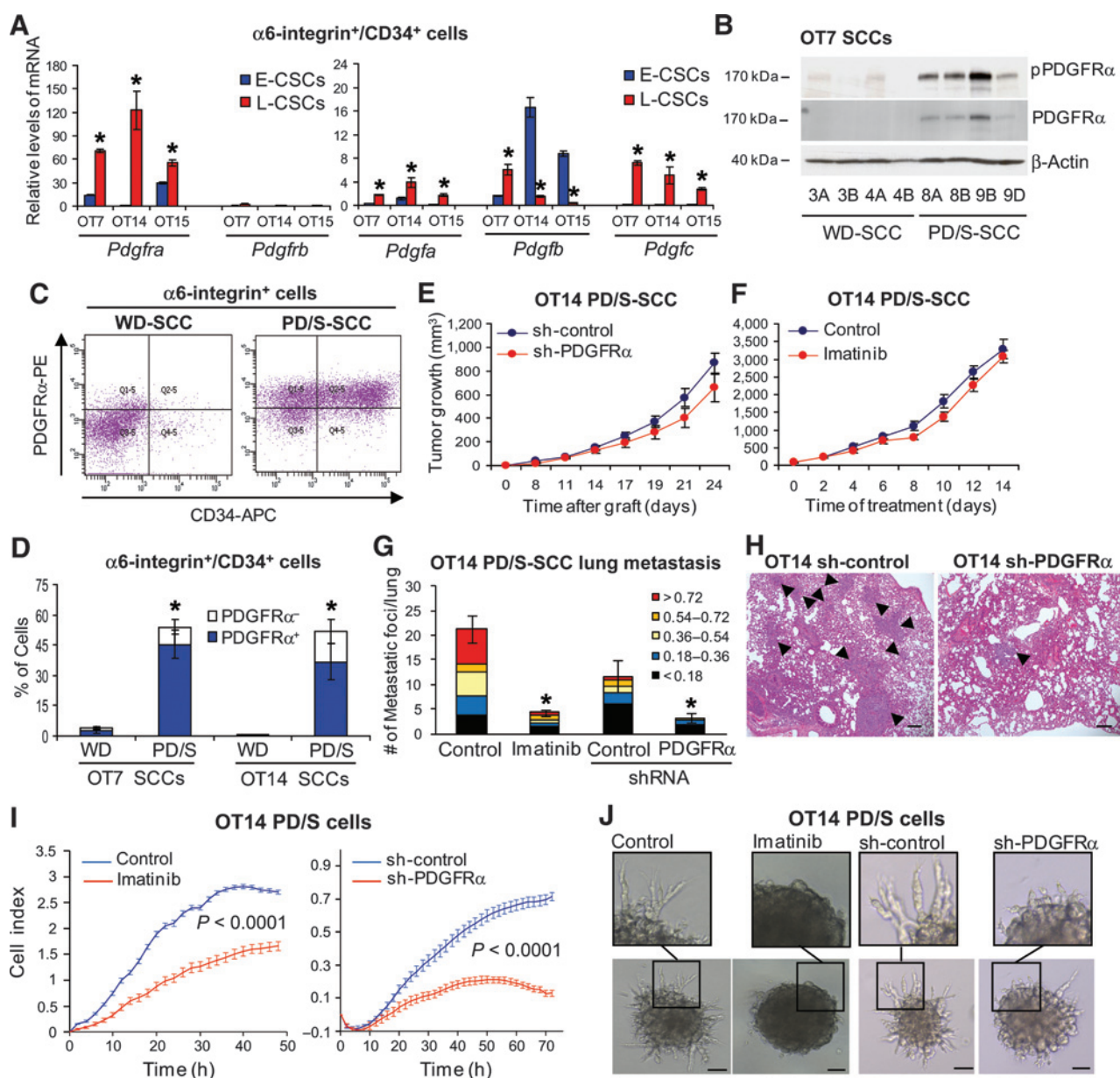


Figure 3. β-Catenin signaling is attenuated during late stages of SCC progression. A, β-catenin cell localization by IHC assays. Arrowheads, cells with β-catenin at nuclei. Scale bar, 30 μm. B, quantification of cells (mean ± SE; three samples per group) with β-catenin at nuclei in WD-SCCs and PD/S-SCCs of the indicated lineage. C, levels of β-catenin and its active form in WD-SCCs and PD/S-SCCs. β-Actin was used as a protein-loading control. Sample number identifies tumor passage and letters indicate independent tumor replicates. D, top, schema of the construct used to determine β-catenin transcriptional activity; bottom, representative images showing transduced cells (red) and cells with induced β-catenin signaling (green cells) in WD-SCCs and PD/S-SCCs. Scale bar, 30 μm.

**Figure 4.**

E-CSC-induced EGFR signaling is downregulated in CSCs of advanced SCCs. A–C, levels of the indicated mRNAs (mean $\pm$ SE) in L-CSCs relative to E-CSCs (A; three samples per group) and in PD/S-SCCs relative to WD-SCCs (B and C; 6–8 samples per group) in the indicated tumor lineages (OT) and spontaneous primary SCCs (PT; four samples per group). D, EGFR and its phosphorylated form in WD-SCCs and PD/S-SCCs. E, mean ($\pm$ SE) mRNA levels relative to *Gapdh* expression of the indicated genes and populations of WD cells (three samples per group). F, levels of EGFR and its phosphorylated form in the indicated populations of WD cells. G, cell proliferation upon EGF treatment, as measured by MTT. Means ($\pm$ SE) indicate arbitrary units of fluorescence (a.u.f.) in EGF-treated cells relative to cells growing without factor. H and I, effect of gefitinib on proliferation (H; mean $\pm$ SE of a.u.f.; two samples per group) of cells treated without or with EGF, and EGFR, AKT, and ERK1/2 phosphorylation (I). Note that the time of exposure was increased to detect EGFR and p-EGFR in PD/S cells. *, significant differences between groups (*t* test; *P* < 0.05). β -Actin was used as a protein-loading control in D and F.

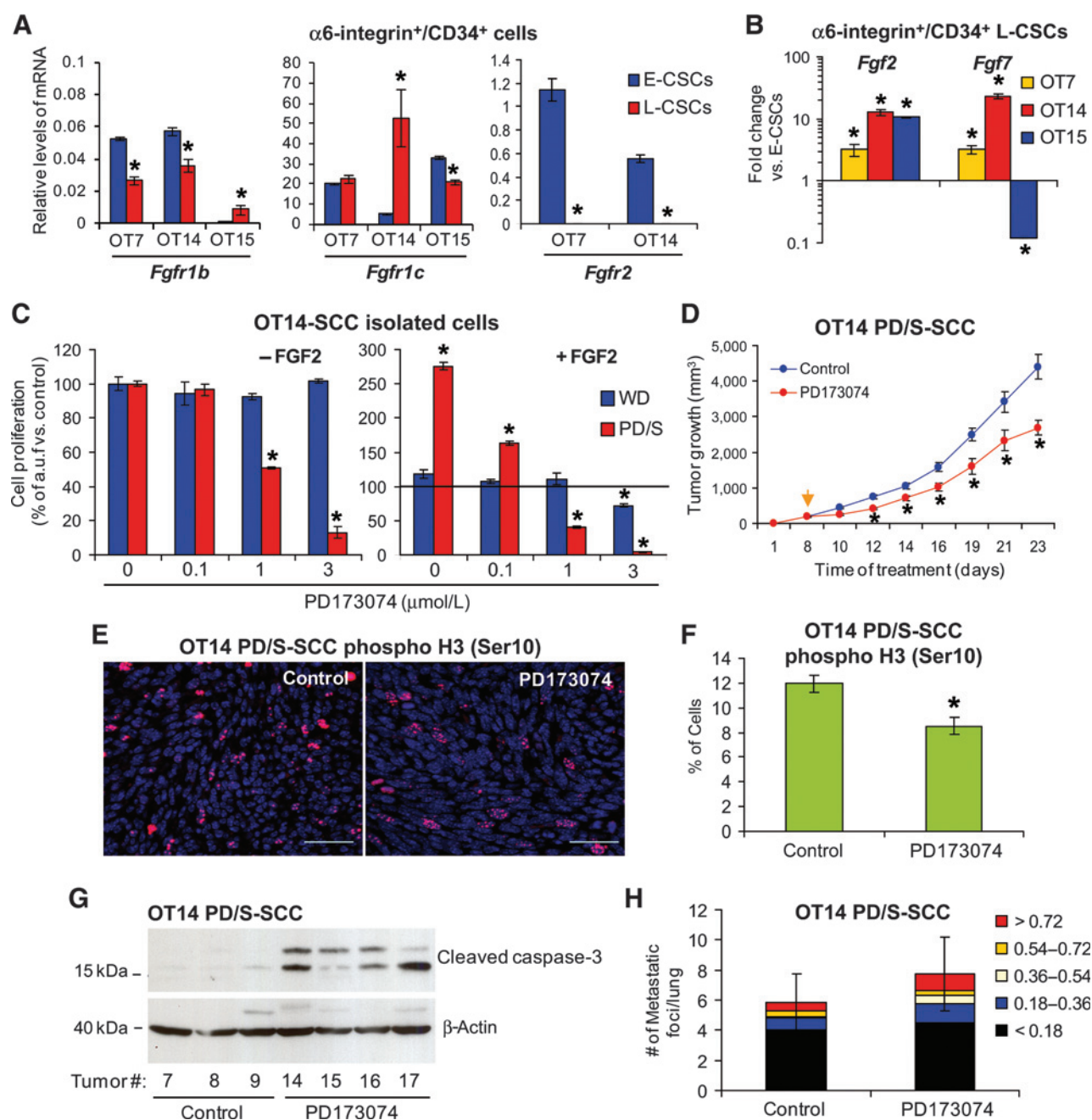
**Figure 5.**

Autocrine PDGFR α signaling induced in CSCs of advanced SCCs promotes metastasis. A, expression of indicated genes relative to *Gapdh* mRNA (mean $\pm$ SE) in E-CSCs and L-CSCs (two samples per group). B, PDGFR α protein and its phosphorylated form in WD-SCCs and PD/S-SCCs. β -Actin is shown as a protein-loading control. Sample number identifies the tumor passage and letters indicate independent tumor replicates. C and D, quantification of $\alpha 6$ -integrin⁺ cells expressing CD34 and PDGFR α in WD-SCCs and PD/S-SCCs by flow cytometry. D, percentage (mean $\pm$ SE) of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells with or without PDGFR α expression in the indicated tumors (5–6 samples per group). E and F, growth kinetics (mean $\pm$ SE of tumor size) of PDGFR α -expressing (sh-control) and PDGFR α -knocked-down (sh-PDGFR α) PD/S-SCCs (E; 8 tumors per group) and PD/S-SCCs treated with vehicle or imatinib (F; 10 mice per group). G, mean $\pm$ SE of metastatic foci per lung section (categorized by size, mm²) in mice injected with sh-control or sh-PDGFR α PD/S tumor cells (4 mice per group) and in control and imatinib-treated mice (10 mice per group). *, significant differences between the groups (*t* test; *P* < 0.05). H, metastatic lesions (indicated by black arrowheads) in the lungs of mice grafted with sh-control and sh-PDGFR α PD/S tumor cells. Scale bar, 200 μ m. I, comparison of the invasion capacity (indicated as cell index) in control and upon PDGFR α signaling inhibition in xCELLigence real-time cell analysis. J, effect of imatinib treatment and PDGFR α -knock-down on the formation of invasion structures in PD/S cells growing in Matrigel. Scale bar, 50 μ m.

EGFR signaling is downregulated in $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺-CSCs of advanced SCCs

We investigated the relevance of the receptor tyrosine kinase (RTK)-dependent pathways that were identified in the L-CSC signature to promote tumor progression. EGFR signaling is

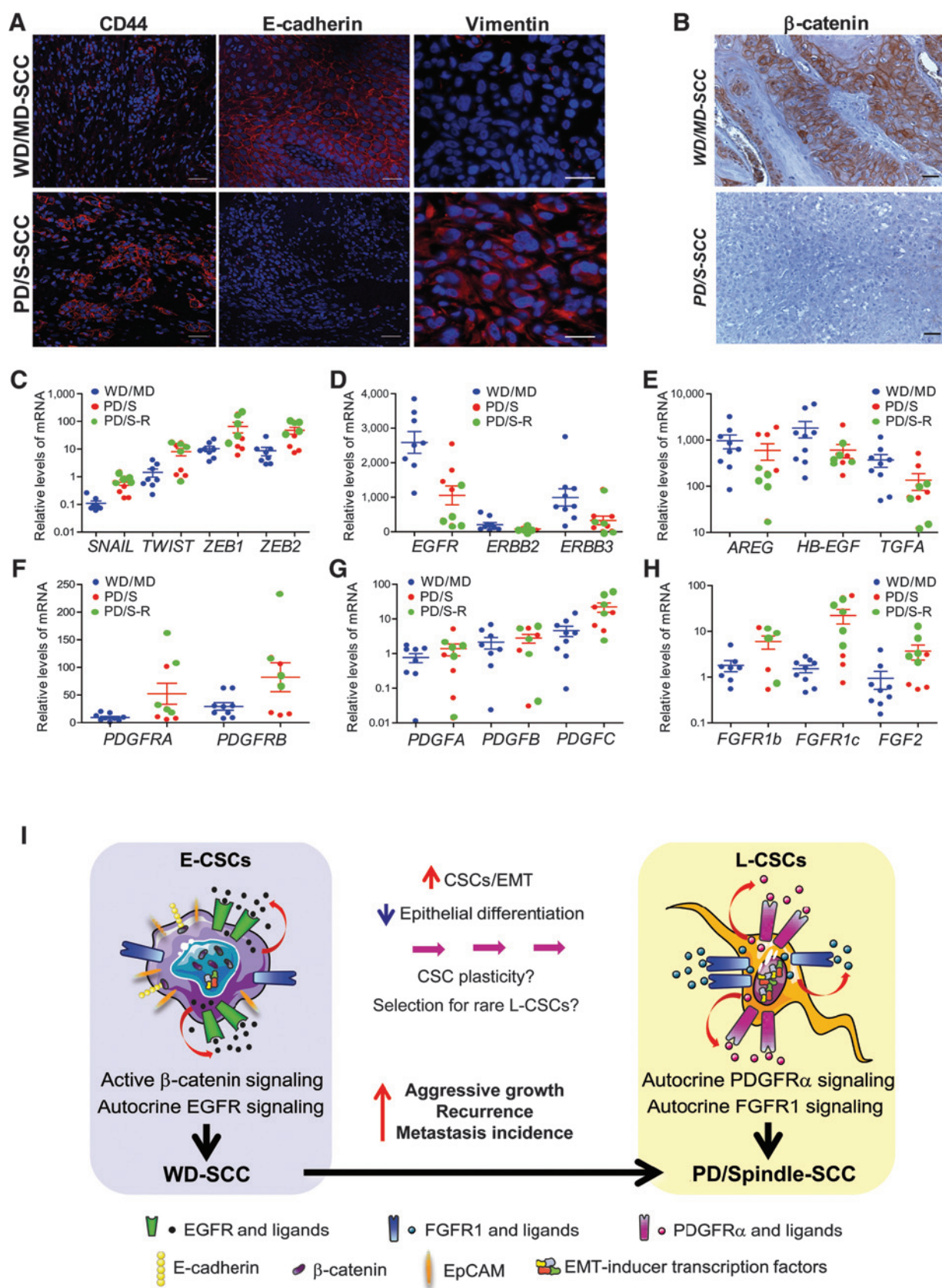
necessary to maintain the proliferation and survival of basal cell compartment in the early stages of SCCs (30, 31). Previous studies showed that *Egfr* expression is downregulated in advanced SCCs (22). However, whether this pathway regulates CSC proliferation and survival and is altered during progression remains to be

**Figure 6.**

Autocrine FGFR1 signaling is upregulated in L-CSCs promoting tumor growth. A and B, mRNA quantification (mean $\pm$ SE) of the indicated genes in E-CSCs and L-CSCs (two samples per group) from three lineages. Results are represented as mRNA levels relative to *Gapdh* expression (A) and n-fold change in L-CSCs relative to E-CSCs for each lineage (B). C, mean $\pm$ SE of WD and PD/S cell proliferation after the indicated treatments, as measured by MTT. D, growth kinetics (mean $\pm$ SE of tumor size) of PD/S-SCCs treated with vehicle or PD173074 (10 mice per group). Arrow, the start of the treatment. E, immunodetection of phosphorylated histone H3 (Ser10) in control and PD173074 treated tumors. Scale bar, 30 μ m. F, percentage (mean $\pm$ SE) of proliferating cells, as determined in E. G, levels of cleaved caspase-3 in mock and PD173074-treated tumors. β -Actin was used as a protein-loading control. H, mean $\pm$ SE of metastatic foci per lung section (categorized by size; mm²) developed in mock- and PD173074-treated mice (10 mice per group). *, significant differences between groups (*t* test; *P* < 0.05).

determined. Thus, we compared the expression of *ErbB* receptors and ligands in E-CSCs and L-CSCs isolated from various OT-SCC lineages. The expression of *Egfr*, *ErbB2*, and *ErbB3* receptors, as well as of the *Tgfa*, *Areg*, and *Hbegf* ligands was reduced in L-CSCs from most tumor lineages (Fig. 4A), consistent with the *ErbB* and ligand

expression profiles observed in spontaneous and orthotopically derived PD/S-SCCs (Fig. 4B and C). These results, along with the substantially lower phosphorylated status of EGFR consistently observed in PD/S-SCCs (Fig. 4D), indicate that EGFR signaling is downregulated in advanced SCCs. To determine the role of EGFR



signaling in CSC proliferation, we analyzed tumor cells isolated from WD-SCCs and their PD/S-SCC offspring and maintained in culture. Primary WD cells grew as adherent cells and had a typical epithelial shape, whereas PD/S cells grew as spheres (Supplementary Fig. S3A). These primary cultures were enriched in $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺-CSCs (50% and 90% in WD and PD/S cells, respectively), exhibited a similar expression profile of EMT inducer factors and *ErbB* and ligands to their respective parental tumors, and isolated CD34⁺-CSCs (Supplementary Figs. S3B–S3E). In accordance with the genetic profile of their parental tumors, no *Ras* mutations were detected in OT14 WD and PD/S cells, whereas 34% of *Hras* alleles were mutated (Q61L) in OT7 cells. $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ WD cells showed a higher level of expression of EGFR and *Tgfa* ligand than $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ PD/S cells, whereas *Areg* and *Epgn* expression were similar in both subpopulations of cells (Fig. 4E). Furthermore, EGFR was mainly activated in $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ WD cells, as determined by the levels of phosphorylated EGFR (Fig. 4F). In contrast to PD/S cells, EGF treatment significantly increased the proliferation of WD cells (Fig. 4G) concomitantly with a stronger induction of EGFR, AKT, and ERK1/2 phosphorylation, which were inhibited in response to the EGFR inhibitor gefitinib (Fig. 4H and I and Supplementary Figs. S3F and S3G). In the absence of EGF, WD cells showed basal levels of pEGFR, which were inhibited along with the phosphorylation of downstream effectors and cell proliferation in response to gefitinib (Fig. 4H and I and Supplementary Fig. S3G). However, these effects were stronger in OT14 WD cells (*Ras* WT) than in OT7 WD cells, which present activating mutations in a subset of *Hras* alleles (Supplementary Fig. S3H). Together, these results indicate that autocrine and probably paracrine EGFR signaling promotes the growth of E-CSCs, and that this pathway is attenuated in L-CSCs.

CSC-induced autocrine PDGFR α signaling promotes metastasis in advanced SCCs

PDGFR is not expressed in normal keratinocytes (32) and has not previously been associated with skin SCC CSCs. However, in accordance with our array data, *Pdgfra* expression was strongly induced in L-CSCs (Fig. 5A), correlating with the consistently observed stronger expression of this receptor in their respective PD/S-SCCs and in primary PD/S-SCCs (Supplementary Fig. S4A). Although expression of *Pdgfrb* was also enhanced in PD/S-SCCs (Supplementary Fig. S4A), $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺-CSCs and isolated WD and PD/S cells showed a low level of expression of this receptor (Fig. 5A and Supplementary Fig. S4C), suggesting that PDGFR β is essentially associated with stromal cells. Most of the PD/S-SCC $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells expressed PDGFR α , in contrast to the sparse $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cell population exhibiting low levels of PDGFR α expression in WD-SCCs (Fig. 5C and D; Supplementary Figs. S4B and S4D). Furthermore, strong PDGFR α phosphorylation (Fig. 5B) and significant induction of *Pdgfa* and *Pdgfc* ligand expression were detected in PD/S-SCCs of different lineages, and specifically in their respective L-CSCs (Fig. 5A and

Supplementary Fig. S4E), suggesting that CSCs of advanced SCCs may induce autocrine activation of PDGFR α signaling. These events were directly related with tumor progression, as no changes in *Pdgfra*, *Pdgfrb*, or *Pdgfc* expression were detected in WD-SCCs that never progress to PD/S-SCCs after serial engraftments (Supplementary Fig. S4F; OT9). As further evidence of autocrine activation of PDGFR α , we observed that PD/S cells growing in the absence of growth factors exhibited PDGFR α phosphorylation, which was blocked in response to the imatinib PDGFR inhibitor (Supplementary Fig. S4G). Despite PDGFR α phosphorylation was further induced in response to PDGFR ligands (Supplementary Fig. S4G), there were no significant changes in PD/S cell proliferation upon PDGF or imatinib treatment (Supplementary Figs. S4H and S4I), and PD/S cells with PDGFR α knockdown expression had a similar proliferation rate to PDGFR α -expressing control cells (Supplementary Figs. S5A and S5B). Furthermore, similar tumor growth was observed when PDGFR α knockdown cells and their respective control cells were engrafted in nude mice (Fig. 5E and Supplementary Figs. S5C and S5D), and when orthotopically implanted PD/S-SCCs were treated daily with imatinib, compared with the control treatment (Fig. 5F). Nevertheless, we observed a significant reduction in the number and size of lung metastases developed in imatinib-treated mice and in those carrying PDGFR α knockdown tumors (Fig. 5G and H and Supplementary Fig. S5E). Infrequent metastases developed from PDGFR α -interfered tumors showed a high receptor expression, indicating that these lesions may have arisen from tumor cells that eluded the *Pdgfra* interference (Supplementary Fig. S5F). Reduced metastasis observed after PDGFR α inhibition was not associated with a reduction of tumor angiogenesis because, although significantly fewer CD31⁺ vessels were observed in imatinib-treated PD/S-SCCs (Supplementary Fig. S5G), as previously reported (33, 34), the frequency of CD31⁺ vessels was unaltered in PDGFR α -interfered tumors (Supplementary Fig. S5G). These results demonstrate that PDGFR α signaling plays an important role promoting metastasis development, but not L-CSC proliferation. Reduction of metastasis mediated by PDGFR α signaling inhibition was not due to a decrease in the frequency of tumor-initiating cells or to an attenuation of the EMT program (Supplementary Figs. S5H–S5J). However, both knocking down of PDGFR α expression and imatinib treatment significantly reduced the invasion capability of PD/S cells (Fig. 5I and J). These results indicate that autocrine PDGFR α signaling promotes CSC motility and invasion, consequently favoring CSC dissemination and metastasis.

Autocrine FGFR signaling promotes CSC proliferation and survival in advanced SCCs

Our results showed that *Fgfr2* was underexpressed in L-CSCs compared with E-CSCs (Figs. 2B and 6A), indicating that FGFR signaling is altered in CSCs of advanced SCCs. FGFR1 and FGFR2 are expressed in normal keratinocytes and play an important role in the epidermal homeostasis (35). However, the role of

Figure 7.

Advanced human skin SCCs with induced EMT recapitulate the changes in signaling pathways described in mouse PD/S-SCCs. A, representative images showing an expanded CD44⁺ cell population, lower E-cadherin, and higher vimentin expression levels in PD/S-SCCs compared with WD/MD-SCCs. Scale bar, 30 μ m. B, β -catenin expression and cell localization in WD/MD-SCC and PD/S-SCCs. Scale bar, 20 μ m. C–H, quantification of the indicated mRNAs in a set of human WD/MD-SCCs and PD/S-SCCs. Mean ($\pm$ SE) mRNA levels of these genes relative to *GAPDH* mRNA are shown (individual data and mean $\pm$ SE). Green dots, recurrent PD/S-SCCs. I, schema describing the identified changes in CSC features and regulatory mechanisms at different stages of mouse SCC progression.

FGFR in regulating CSC proliferation and survival during SCC progression was unexplored. Analysis of the expression of different members of the FGFR family and variants (IIIb and IIIc) showed that *Fgfr1-IIIc* (*Fgfr1c*) was the FGFR most prominently expressed in E-CSCs and L-CSCs (Fig. 6A). Upregulation of *Fgfr1c* was not consistently found in L-CSCs of different lineages (Fig. 6A), although a strong FGFR1 expression was observed in spontaneous and orthotopically derived PD/S-SCCs relative to their respective WD-SCCs, but not in those WD-SCCs that never progressed (Supplementary Figs. S6A, S6C–S6E). These results indicate that CD34⁺-CSCs express high levels of FGFR1c and that the stronger expression of this receptor in advanced SCCs is due to the CSC expansion in these tumors. Interestingly, most L-CSCs from different lineages strongly induced the expression of *Fgf2* and *Fgf7* (Fig. 6B), correlating with their significant induction in PD/S-SCCs relative to WD-SCCs (Supplementary Fig. S6B). These results suggest that autocrine regulation of FGFR is induced in CSCs of advanced tumors.

Next, we evaluated the relevance of FGFR signaling to CSC proliferation and survival. $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ population showed stronger expression of *Fgfr1c* than the $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34[−] population in WD cells (Supplementary Fig. S6F), but the proliferation of these cells was unaltered in response to FGF2 or to the FGFR1 inhibitor PD173074 (36; Fig. 6C and Supplementary Fig. S6G). However, the response to FGF2 was significantly enhanced upon gefitinib-mediated EGFR inhibition (Supplementary Fig. S6G), indicating that the strong induction of the EGFR pathway attenuates FGFR signaling in WD cells. In contrast, the proliferation of PD/S cells was significantly induced upon FGF2 treatment (Fig. 6C, +FGF2), concomitantly with the induction of FGFR, AKT, and ERK1/2 phosphorylation, which were blocked in the presence of PD173074 similarly in *Ras* mutated or wild-type genetic backgrounds (Fig. 6C and Supplementary Fig. S6H). Furthermore, in the absence of growth factors, PD/S cell proliferation was significantly reduced in response to PD173074 (Fig. 6C; −FGF2). These results indicate that autocrine activation of FGFR1 signaling promotes CD34⁺-CSC proliferation in advanced SCCs. To analyze the effect of *in vivo* FGFR1 inhibition, mice carrying PD/S-SCCs were treated with PD173074. Tumor growth was significantly reduced in response to FGFR inhibition (Fig. 6D), coinciding with diminished tumor cell proliferation and induced apoptosis, as determined by phosphohistone H3 (Ser10) and cleaved caspase-3 levels, respectively (Fig. 6E–G). Despite the lesser tumor growth, no significant changes in the number and size of metastatic lesions were observed in PD173074-treated compared with mock-treated mice (Fig. 6H). These results indicate that autocrine FGFR1 signaling plays an important role promoting CSC survival and proliferation in PD/S-SCCs, although its inhibition does not impair the metastatic capability of these cells.

Advanced human skin SCCs recapitulate the molecular alterations described in mouse PD/S-SCCs

To determine the clinical relevance of our findings, we examined whether the molecular alterations described in mouse PD/S-SCCs were also associated with progression in human skin SCCs. The histopathologic grade of patient samples frequently showed intratumor regional heterogeneity, and they were classified as WD/MD-SCCs or PD/S-SCCs according to their main stage of progression and the percentage that this region represented in the overall sample (Supplementary Table S3). PD-SCCs and spindle

SCCs exhibited more tumor cells with CD44 expression, which identifies CSCs in human skin SCCs (37, 38), than WD/MD-SCCs (Fig. 7A). In addition, the EMT program was induced (Fig. 7A and C) mainly in PD-SCCs with spindle tumor cell regions and a history of recurrence after surgical resection (Supplementary Table S3). Consistent with the downregulation of β -catenin in advanced mouse SCCs, the expression of β -catenin was reduced in PD/S-SCCs compared with low-grade SCCs (Fig. 7B). Similarly, the level of expression of *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3*, and ligands was markedly lower in recurrent PD/S-SCCs (Fig. 7D and E), indicating that advanced human SCCs downregulate EGFR signaling. In contrast, the expression of *PDGFRA*, *PDGFRB*, *PDGFC*, *FGFR1b*, *FGFR1c*, and *FGF2* (Fig. 7F–H) was increased in most of the EMT-induced and advanced tumors. These results suggest that the signaling pathways controlling CSC proliferation and survival in advanced mouse skin SCCs may also operate in advanced human SCCs.

The L-CSC signature described here in mouse skin SCCs may identify progression and poor prognosis in other human SCCs. Indeed, this L-CSC signature identified a subtype of lung SCCs that exhibit poorly differentiated features and are associated with poor prognosis (Supplementary Fig. S7, left; refs. 39, 40). A similar association was found when this L-CSC signature was compared with a large subset of head and neck SCCs (Supplementary Fig. S7, bottom right; ref. 41). This suggests that CSC features in advanced skin SCCs may be commonly associated with SCC progression and poor prognosis in humans.

Discussion

Signaling pathways controlling the CSC function at early stages of skin SCC progression have been previously described (11, 15, 16). However, it was not known whether CSC regulatory mechanisms change during disease progression, correlating with the enhanced recurrence and metastasis of high-grade SCCs (1), which could influence the selection of the most efficient therapy. In the study reported here, we generated lineages of SCC progression and showed that a high percentage of WD-SCCs exhibiting epithelial features progressed to PD and mesenchymal SCCs with enhanced metastasis capability, recapitulating the skin SCC progression reported in other mouse models (42). In contrast, previous reports suggested that spindle and EMT-like skin SCCs might arise by a route other than WD-SCCs after DMBA/TPA treatment, relying on a different cell of origin and/or lower requirement for inflammatory stimuli (22). In this regard, K14-HPV16 mice, which show chronic inflammation in the skin (43), mainly developed WD-SCCs spontaneously or after DMBA/TPA treatment. Although inflammatory signaling might favor WD-SCC development, our results show that once these tumors are generated they can progress to PD/S-SCCs after serial engraftments in nude mice, which show a proficient inflammatory response (44). However, it remains unclear whether some mutated cell populations may evolve more rapidly or efficiently to PD/S-SCCs than do others.

WD- to PD/S-SCC transition was associated with a robust induction of the EMT program and an expansion of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺-CSCs and tumor-initiating capability, which were similarly observed in primary PD/S-SCCs spontaneously developed in K14-HPV16 mice, as well in other mouse models of advanced SCCs (12, 16). Cell hierarchy could be altered in advanced tumors, as $\alpha 6$ -integrin⁺/

CD34⁺ and $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ of PD/S-SCC showed a similar tumor-initiating capability and impaired epithelial differentiation after initial engraftments in immunodeficient mice. However, previous studies showed that the tumor-initiating capability of CD34⁺ was significantly reduced after multiple serial engraftments, and only CD34⁺ cells have long-term self-renewal capability and are long-term tumor propagation cells (12).

Comparison of gene expression profiles between $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺-CSCs of WD- and PD/S-SCCs defined a CSC signature associated with highly malignant SCCs, which is characterized by the strong induction of stemness, the EMT program, cell proliferation, motility and metastasis, and reduced epidermal cell differentiation and cell adhesion-regulatory genes. Accordingly, tumor-initiating cells of PD/S-SCCs lose the ability to generate cells exhibiting epithelial traits. Therefore, CSC expansion may be the consequence of a sustained self-renewal and the inhibition of differentiation.

Furthermore, we found that the mechanisms that regulate CSC proliferation, survival, and dissemination change at different stages of progression. Indeed, β -catenin signaling, which plays a key role in regulating CD34⁺-CSC features in early SCCs (11), is downregulated in advanced SCCs. Moreover, EGFR signaling, which is strongly upregulated in E-CSCs to drive their proliferation, is similarly upregulated in L-CSCs, which instead induce autocrine FGFR1 signaling to promote tumor growth. Thus, although inhibition of EGFR signaling leads to WD-SCC regression and cancer cell differentiation (45), this treatment may be ineffective in advanced SCCs, which downregulated EGFR signaling. Although previous studies showed that the effectiveness of FGFR1 inhibitors is compromised in the presence of *Ras* mutations in other tumor types (46), FGFR1-dependent downstream signaling was similarly inhibited in PD/S cell with or without *Ras* mutations after PD173074 treatment, suggesting that the relevance of *Ras*-activating mutations promoting proliferation may be reduced in advanced SCCs, as previously reported in EMT-like skin SCCs (22) and in lung and pancreatic cancer cells with induced EMT (47).

In addition, autocrine PDGFR α signaling is strongly induced in L-CSCs. In this regard, the strong induction of EMT in L-CSCs may promote the activation of both FGFR1 and PDGFR α signaling, as reported in other tumor types (48, 49). So, breast CSCs generated from cell lines that spontaneously induced EMT, activated PDGFR/PLC γ /PKC α signaling, which promoted cell proliferation (48). However, inhibition of PDGFR α signaling in SCCs did not block tumor growth but strongly reduced the invasion capability of PD/S cells and metastasis in advanced SCCs. In contrast, FGFR1 inhibition reduced tumor growth without blocking metastasis. These results suggest that FGFR1 and PDGFR α signaling may act exclusively to promote tumor growth and metastasis, respectively.

The WD-to-PD/S-SCC transition may be induced by genetic, epigenetic, and/or, microenvironment alterations, which may modify the differentiation ability, frequency, and regulatory mechanisms of CSCs, promoting the generation and selection of a subset of tumor-initiating cells with strong growth advantages. Given the intratumor cell and clonal heterogeneity reported in some tumors (50), SCC progression may result from a selection and/or activation of rare cells with L-CSC features ($\alpha 6$ -integrin⁺/EpCAM⁺/CD34⁺/PDGFR α ⁺) residing in WD-SCCs. However, these cells were practically undetectable in WD-SCCs, as most of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells conserved EpCAM expression and

exhibited low levels of PDGFR α . Thus, our results indicate that the CSC features and mechanisms that control tumor-initiating cell proliferation and dissemination change in later stages of SCC progression, promoting aggressive growth and enhanced metastasis (Fig. 7I).

Interestingly, advanced and recurrent human skin SCCs with an expanded CD44⁺-CSC population and enhanced EMT, downregulated EGFR and β -catenin expression, and induced PDGFR α / β and FGFR1 expression, thereby recapitulating the alterations detected in advanced mouse SCCs. These results suggest that the use of specific inhibitors of these pathways may be a possible therapy to block relapse and metastasis in recurrent and advanced human SCCs, in which classic chemotherapy is of limited clinical benefit (4). Thus, identifying the regulatory mechanisms controlling CSCs at specific stages of progression may guide the choice of the most suitable therapy for selectively targeting the signaling pathways that regulate this subset of cells.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: V. da Silva-Diz, P. Simón-Extremuera, A. Bernat-Peguera, P. Muñoz

Development of methodology: V. da Silva-Diz, P. Simón-Extremuera, A. Bernat-Peguera, A. Rodolosse, M. Esteller, A. Villanueva

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): V. da Silva-Diz, P. Simón-Extremuera, A. Bernat-Peguera, J. de Sostoa, R.M. Penín, D. Pérez Sidelnikova, O. Bernejo, J.M. Viñals, A. Rodolosse, M. Esteller, A. Villanueva

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): V. da Silva-Diz, P. Simón-Extremuera, A. Bernat-Peguera, J. de Sostoa, M. Urpí, E. González-Suárez, A. Gómez Moruno, M.A. Pujana, A. Villanueva, P. Muñoz

Writing, review, and/or revision of the manuscript: E. González-Suárez, F. Viñals, P. Muñoz

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): M. Esteller, P. Muñoz

Study supervision: P. Muñoz

Acknowledgments

The authors thank R. Alvarez, J. Comas, and E. Castaño (Universitat de Barcelona-SCT) for technical support with flow cytometry; the patients enrolled in this study for their participation; the Hospital Universitario Ramón y Cajal, Hospital Virgen de la Salud, Biobanco del Principado de Asturias, and Fundación Instituto Valenciano de Oncología, which are integrated in the Spanish Hospital Platform Biobanks Network; Y. Pérez (Tumor Bank, Hospital de Bellvitge) for help with human tumor sample collection; the IDIBELL animal facility service for mouse care; and David Monk for help with the manuscript preparation.

Grant Support

V. da Silva-Diz and P. Simón-Extremuera are funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation fellowships; A. Bernat-Peguera received an IDIBELL fellowship. The research of P. Muñoz and colleagues is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2011-22894; SAF2014-55944R) and by the Catalan Department of Health (Generalitat de Catalunya).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received June 15, 2015; revised November 12, 2015; accepted December 4, 2015; published OnlineFirst December 30, 2015.

References

- Cherpeles BS, Marcusen C, Lang PG. Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma of the skin. *Dermatol Surg* 2002;28:268–73.
- DiGiovanni J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol Ther* 1992;54:63–128.
- Coussens LM, Hanahan D, Arbeit JM. Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice. *Am J Pathol* 1996;149:1899–917.
- Franco R, Nicoletti G, Lombardi A, Di Domenico M, Botti G, Zito Marino F, et al. Current treatment of cutaneous squamous cancer and molecular strategies for its sensitization to new target-based drugs. *Expert Opin Biol Ther* 2013;13:51–66.
- Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature* 2011;469:314–22.
- Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer* 2012;12:133–43.
- Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 2012;488:522–6.
- Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:497–512.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704–15.
- Thiery JP, Aclouque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871–90.
- Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, Chambon P, et al. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature* 2008;452:650–3.
- Lapouge G, Beck B, Nassar D, Dubois C, Dekoninck S, Blanpain C. Skin squamous cell carcinoma propagating cells increase with tumour progression and invasiveness. *EMBO J* 2012;31:4563–75.
- Siegle JM, Basin A, Sastre-Perona A, Yonekubo Y, Brown J, Sennett R, et al. SOX2 is a cancer-specific regulator of tumour initiating potential in cutaneous squamous cell carcinoma. *Nat Commun* 2014;5:4511.
- Boumahdi S, Driessens G, Lapouge G, Rorive S, Nassar D, Le Mercier M, et al. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature* 2014;511:246–50.
- Beck B, Driessens G, Goossens S, Youssef KK, Kuchnio A, Caauwe A, et al. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature* 2011;478:399–403.
- Schober M, Fuchs E. Tumor-initiating stem cells of squamous cell carcinomas and their control by TGF-beta and integrin/focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:10544–9.
- Arbeit JM, Munger K, Howley PM, Hanahan D. Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *J Virol* 1994;68:4358–68.
- Blanco R, Muñoz P, Flores JM, Klatt P, Blasco MA. Telomerase abrogation dramatically accelerates TRF2-induced epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 2007;21:206–20.
- da Silva-Diz V, Sole-Sanchez S, Valdes-Gutierrez A, Uprí M, Riba-Artés D, Penin RM, et al. Progeny of Lgr5-expressing hair follicle stem cell contributes to papillomavirus-induced tumor development in epidermis. *Oncogene* 2013;32:3732–43.
- Muñoz P, Blanco R, Flores JM, Blasco MA. XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer. *Nat Genet* 2005;37:1063–71.
- Gonzalez-Roca E, Garcia-Albeniz X, Rodriguez-Mulero S, Gomis RR, Kornacker K, Auer H. Accurate expression profiling of very small cell populations. *PLoS One* 2010;5:e14418.
- Wong CE, Yu JS, Quigley DA, To MD, Jen KY, Huang PY, et al. Inflammation and Hras signaling control epithelial-mesenchymal transition during skin tumor progression. *Genes Dev* 2013;27:670–82.
- Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, Balmain A. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 1986;322:78–80.
- Nassar D, Latil M, Boeckx B, Lambrechts D, Blanpain C. Genomic landscape of carcinogen-induced and genetically induced mouse skin squamous cell carcinoma. *Nat Med* 2015;21:946–54.
- Holderfield M, Lorenzana E, Weisburd B, Lomovasky L, Boussemaert L, Lacroix L, et al. Vemurafenib cooperates with HPV to promote initiation of cutaneous tumors. *Cancer Res* 2014;74:2238–45.
- Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5:341–54.
- Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P, et al. Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest* 2006;116:1561–70.
- Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:116–29.
- Fuerer C, Nusse R. Lentiviral vectors to probe and manipulate the Wnt signaling pathway. *PLoS One* 2010;5:e9370.
- Hansen LA, Woodson RL II, Holbus S, Strain K, Lo YC, Yuspa SH. The epidermal growth factor receptor is required to maintain the proliferative population in the basal compartment of epidermal tumors. *Cancer Res* 2000;60:3328–32.
- Sibilia M, Fleischmann A, Behrens A, Stingl L, Carroll J, Watt FM, et al. The EGF receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development. *Cell* 2000;102:211–20.
- Ponten F, Ren Z, Nister M, Westermarck B, Ponten J. Epithelial-stromal interactions in basal cell cancer: the PDGF system. *J Invest Dermatol* 1994;102:304–9.
- Hwang RF, Yokoi K, Bucana CD, Tsan R, Killion JJ, Evans DB, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor phosphorylation by STI571 (Gleevec) reduces growth and metastasis of human pancreatic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Clin Cancer Res* 2003;9:6534–44.
- Ruan J, Luo M, Wang C, Fan L, Yang SN, Cardenas M, et al. Imatinib disrupts lymphoma angiogenesis by targeting vascular pericytes. *Blood* 2013;121:5192–202.
- Yang J, Meyer M, Muller AK, Böhm F, Grose R, Dauwalder T, et al. Fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in keratinocytes control the epidermal barrier and cutaneous homeostasis. *J Cell Biol* 2010;188:935–52.
- Mohammadi M, Froum S, Hamby JM, Schroeder MC, Panek RL, Lu GH, et al. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *EMBO J* 1998;17:5896–904.
- Biddle A, Liang X, Gammon L, Fazil B, Harper LJ, Emich H, et al. Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Res* 2011;71:5317–26.
- Geng S, Guo Y, Wang Q, Li L, Wang J. Cancer stem-like cells enriched with CD29 and CD44 markers exhibit molecular characteristics with epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol Res* 2012;305:35–47.
- Wilkerson MD, Yin X, Hoadley KA, Liu Y, Hayward MC, Cabanski CR, et al. Lung squamous cell carcinoma mRNA expression subtypes are reproducible, clinically important, and correspond to normal cell types. *Clin Cancer Res* 2010;16:4864–75.
- Network CGAR. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 2012;489:519–25.
- Rickman DS, Millon R, De Reynies A, Thomas E, Wasylyk C, Muller D, et al. Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays. *Oncogene* 2008;27:6607–22.
- White RA, Neiman JM, Reddi A, Han G, Birlea S, Mitra D, et al. Epithelial stem cell mutations that promote squamous cell carcinoma metastasis. *J Clin Invest* 2013;123:4390–404.
- Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, et al. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 1999;13:1382–97.
- Jacobson RH. Immunodeficiency models in characterization of immune responses to parasites—an overview. *Vet Parasitol* 1982;10:141–54.
- Zhang L, Ge Y, Fuchs E. miR-125b can enhance skin tumor initiation and promote malignant progression by repressing differentiation and prolonging cell survival. *Genes Dev* 2014;28:2532–46.
- Lamont FR, Tomlinson DC, Cooper PA, Shnyder SD, Chester JD, Knowles MA. Small molecule FGF receptor inhibitors block FGFR-dependent urothelial carcinoma growth *in vitro* and *in vivo*. *Br J Cancer* 2011;104:75–82.
- Singh A, Greninger P, Rhodes D, Koopman L, Violette S, Bardeesy N, et al. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction"

- reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell* 2009;15:489–500.
48. Tam WL, Lu H, Buikhuisen J, Soh BS, Lim E, Reinhardt F, et al. Protein kinase C alpha is a central signaling node and therapeutic target for breast cancer stem cells. *Cancer Cell* 2013;24:347–64.
49. Zhu DY, Guo QS, Li YL, Cui B, Guo J, Liu JX, et al. Twist1 correlates with poor differentiation and progression in gastric adenocarcinoma via elevation of FGFR2 expression. *World J Gastroenterol* 2014;20:18306–15.
50. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* 2014;14:275–91.

SUPPLEMENTARY DATA

- **Supplementary Figures 1 through 7:**

Figure S1. Generation and characterization of orthotopic SCC lineages.

Figure S2. Analysis of CSC frequency and EMT induction during SCC progression.

Figure S3. Characterization of primary culture cells derived of WD-SCCs and PD/S-SCCs. These cells are enriched in CD34⁺-CSCs and recapitulate the features of E-CSCs and L-CSCs.

Figure S4. Activation of autocrine PDGFR α signaling in PD/S-SCCs.

Figure S5. *In vitro* and *in vivo* assays showing that the inhibition of PDGFR α signaling does not affect the frequency of CSCs, EMT or PD/S-SCC growth.

Figure S6. Activation of autocrine FGFR1 signaling in PD/S cells.

Figure S7. L-CSC signature identifies advanced and poor-prognosis human lung and head-neck SCCs.

- **Supplementary Figure Legends:** Legends of Supplementary Figures 1-7.

- **Supplementary Tables 1 through 3:**

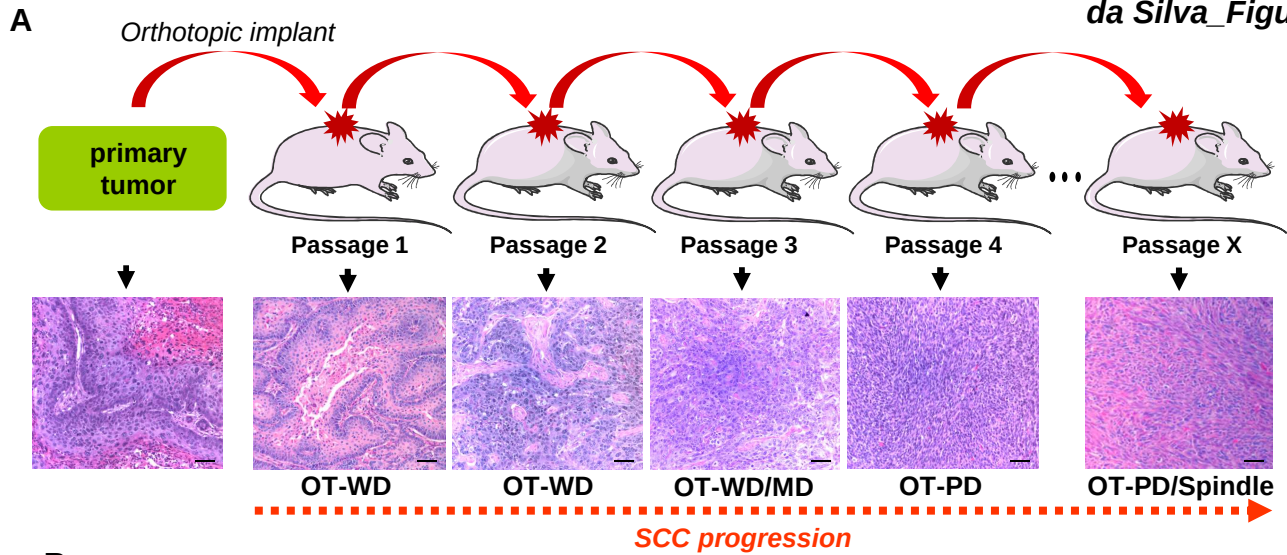
Table S1. Histopathological features of distinct primary and orthotopically-derived SCCs (SCC lineages) at different passages.

Table S2. List of differentially expressed genes between E-CSCs and L-CSCs, which were isolated from WD-SCCs and PD/S-SCCs, respectively.

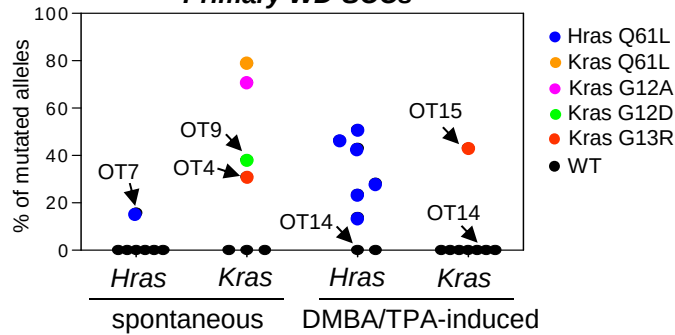
Table S3. List of human skin SCCs samples used in this study. Histopathological features of these samples are described.

- **Supplementary Material and Methods:** A more detailed description of Material and Methods.

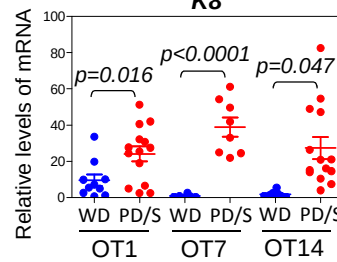
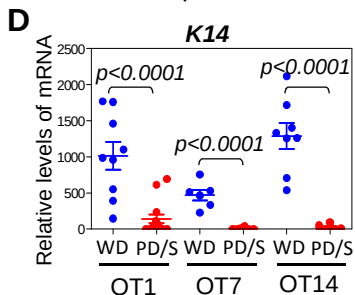
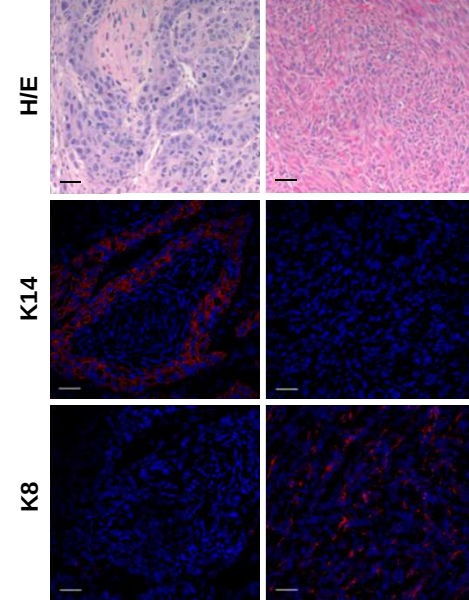
- **Supplementary References:** Reference related to Supplementary Material and Methods.



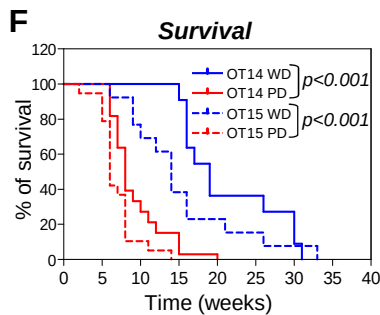
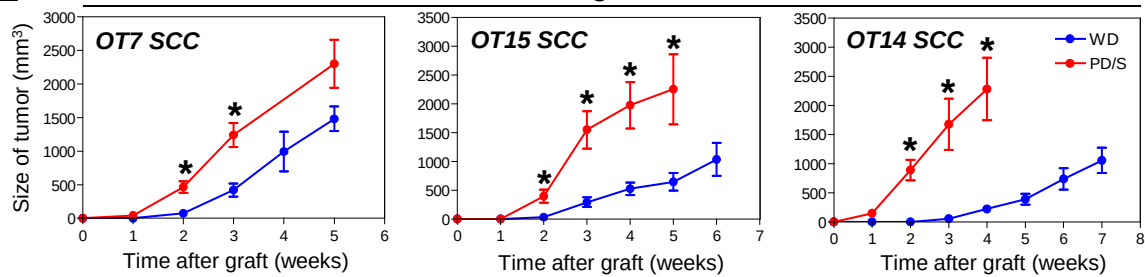
B Primary WD-SCCs



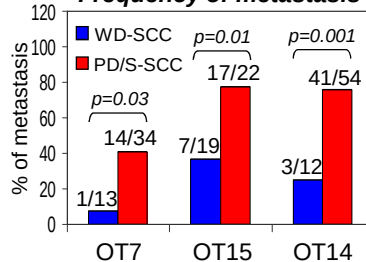
C OT7 WD-SCC OT7 PD/S-SCC



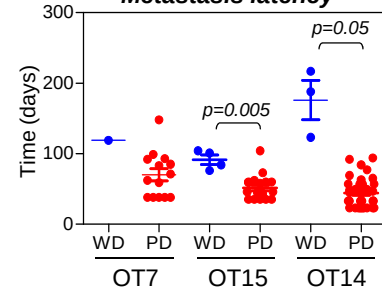
E Tumor growth

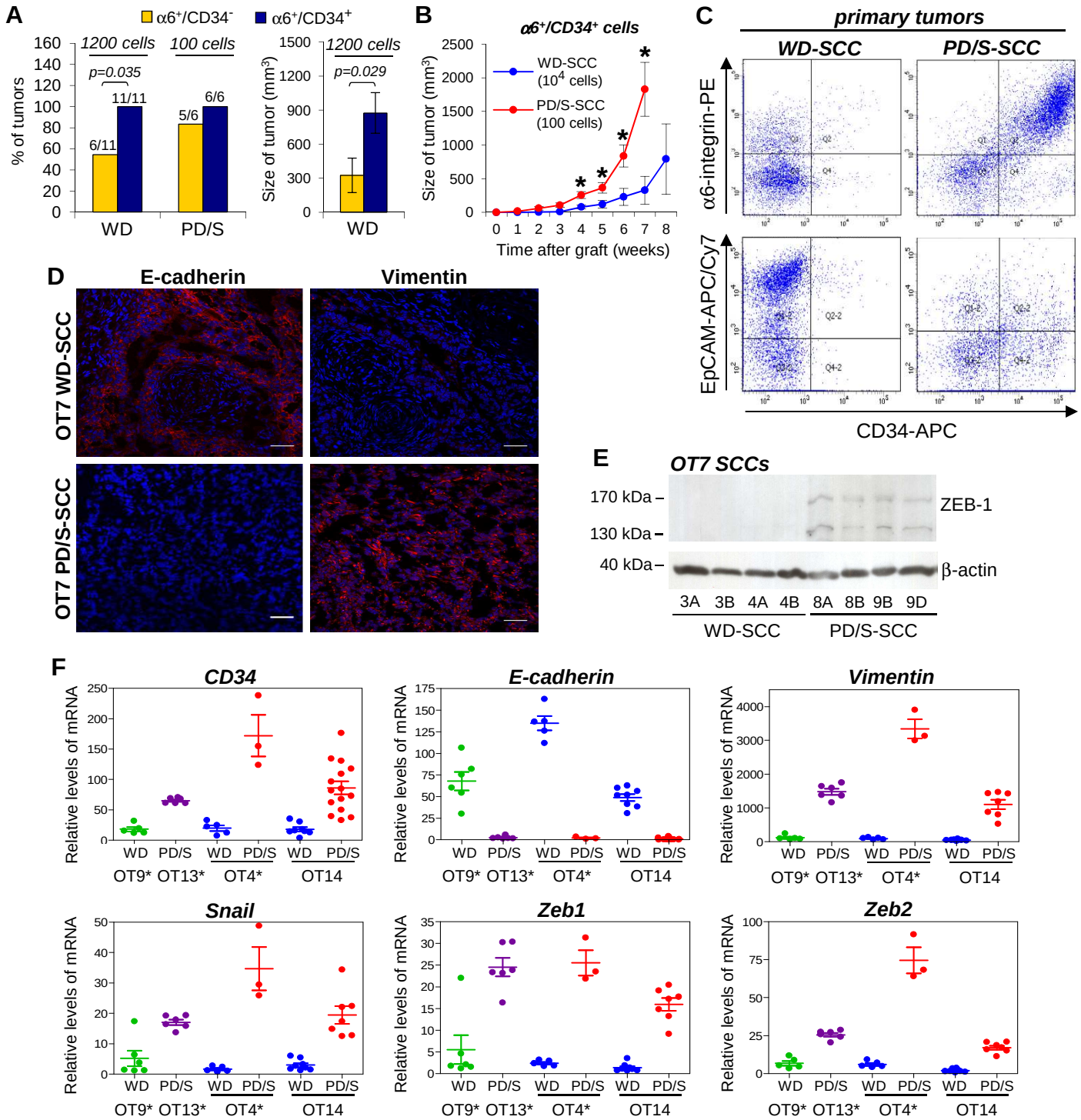


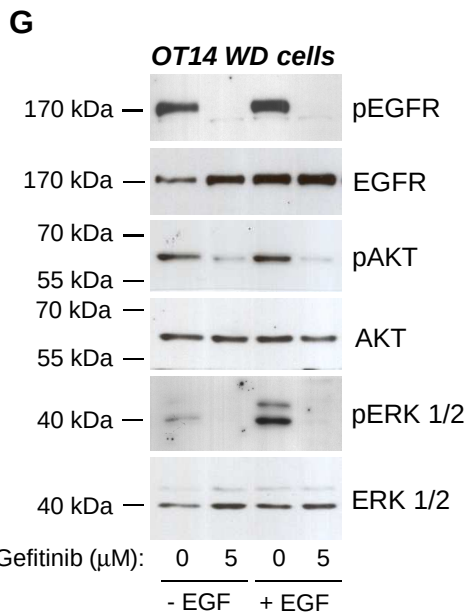
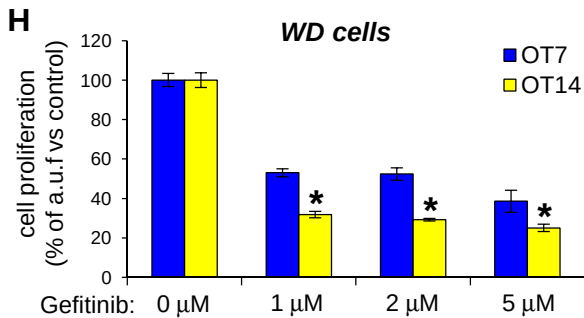
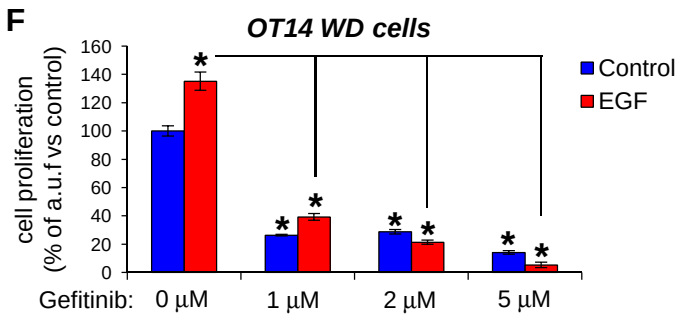
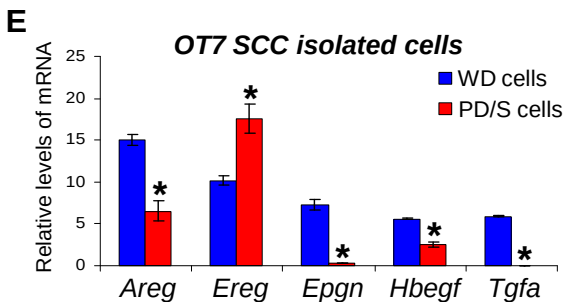
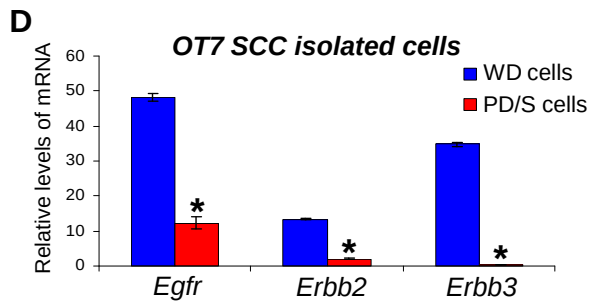
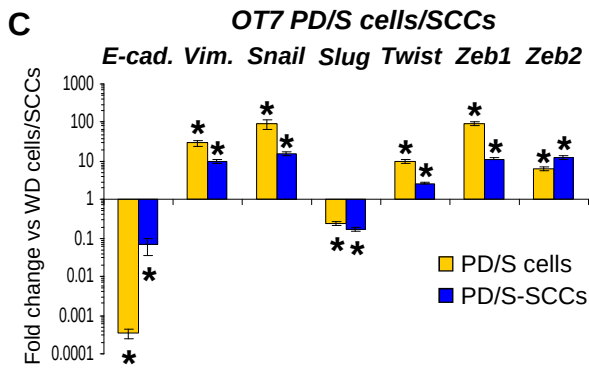
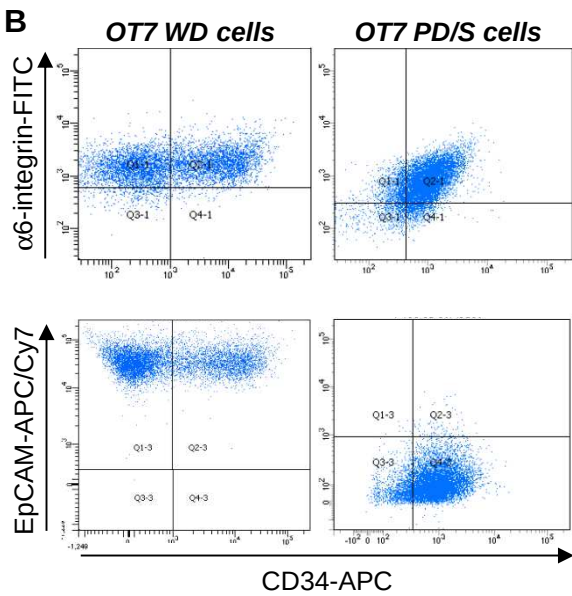
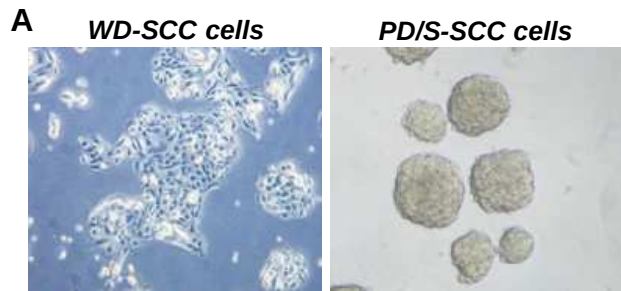
G Frequency of metastasis

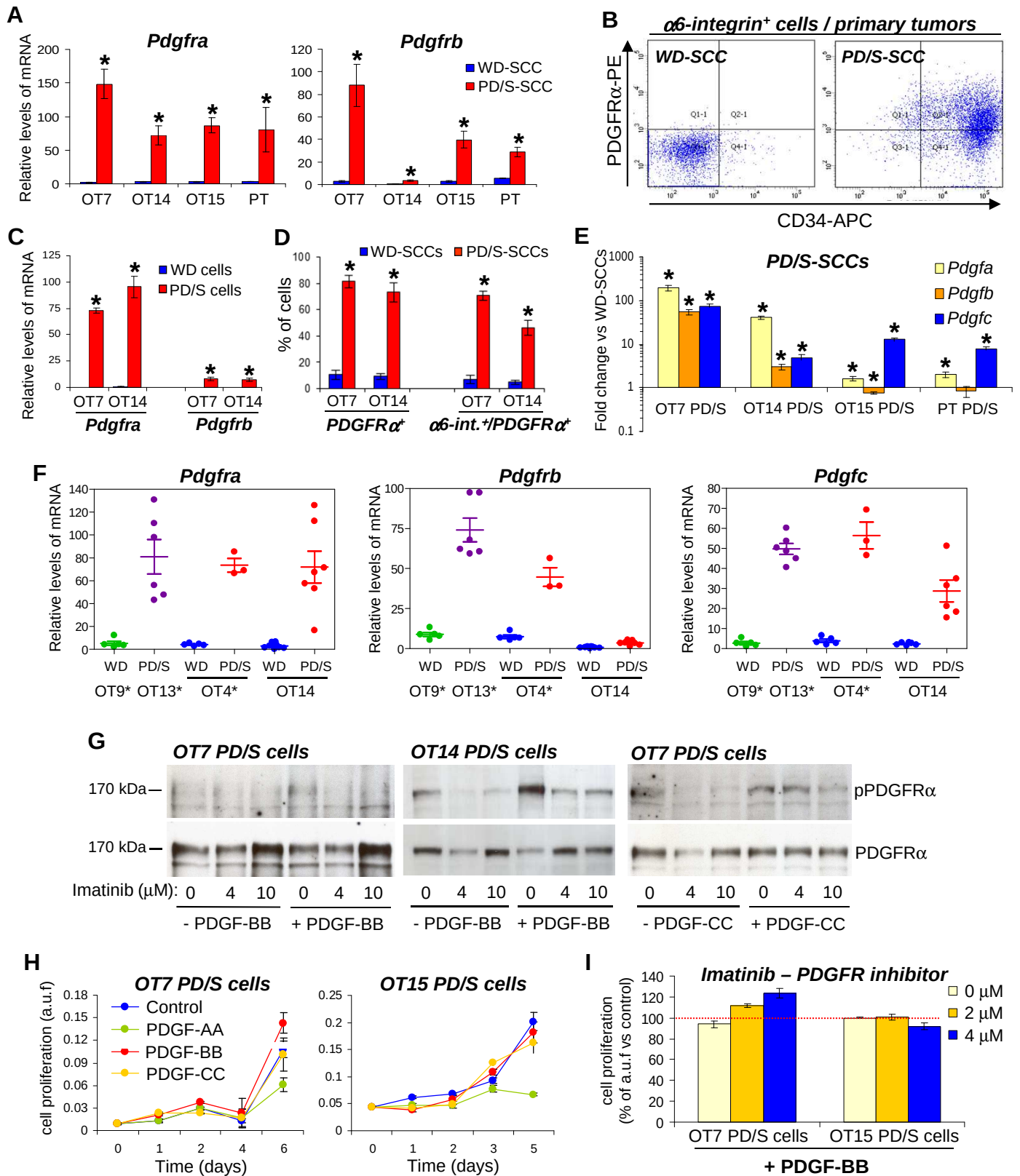


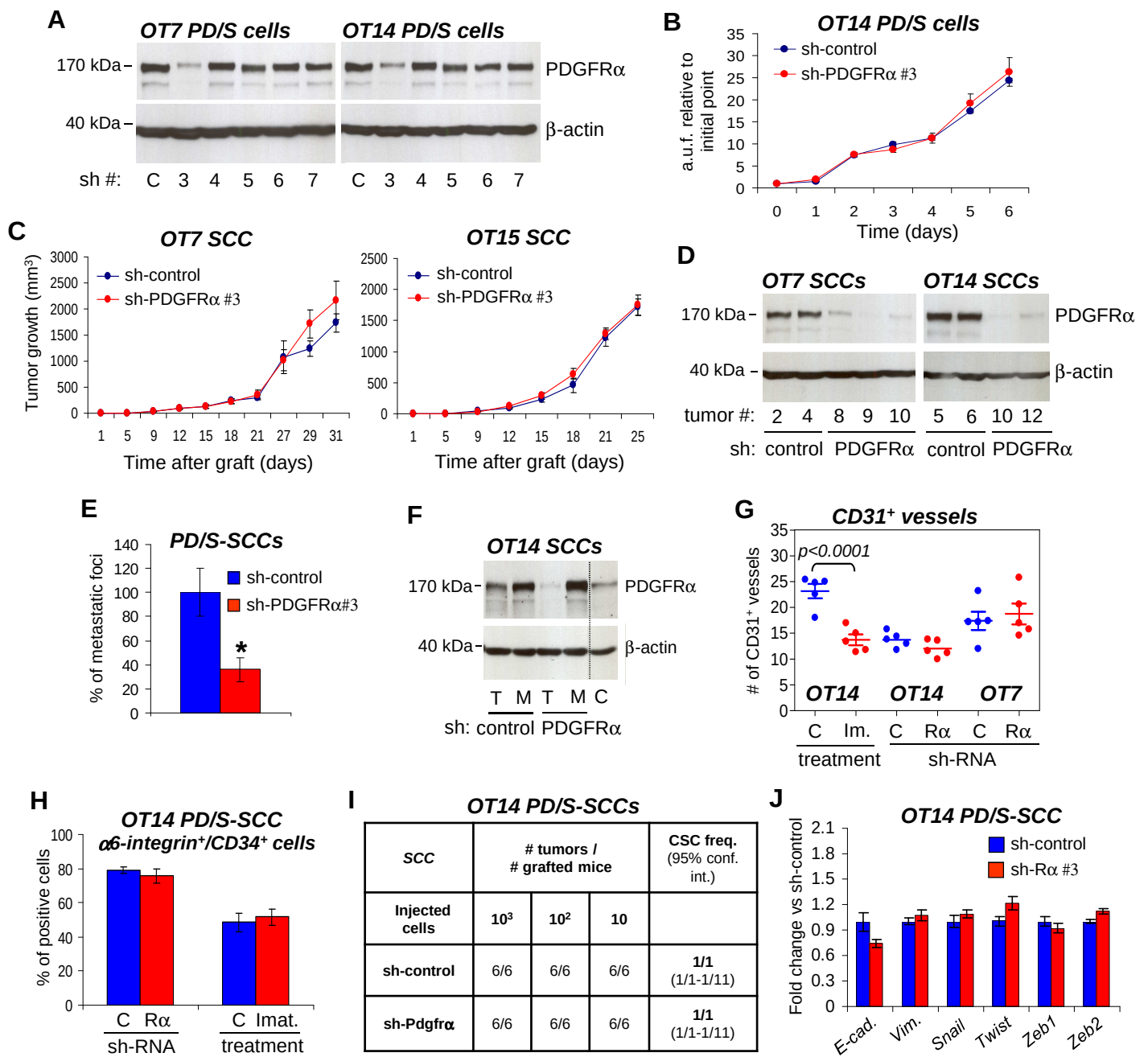
H Metastasis latency

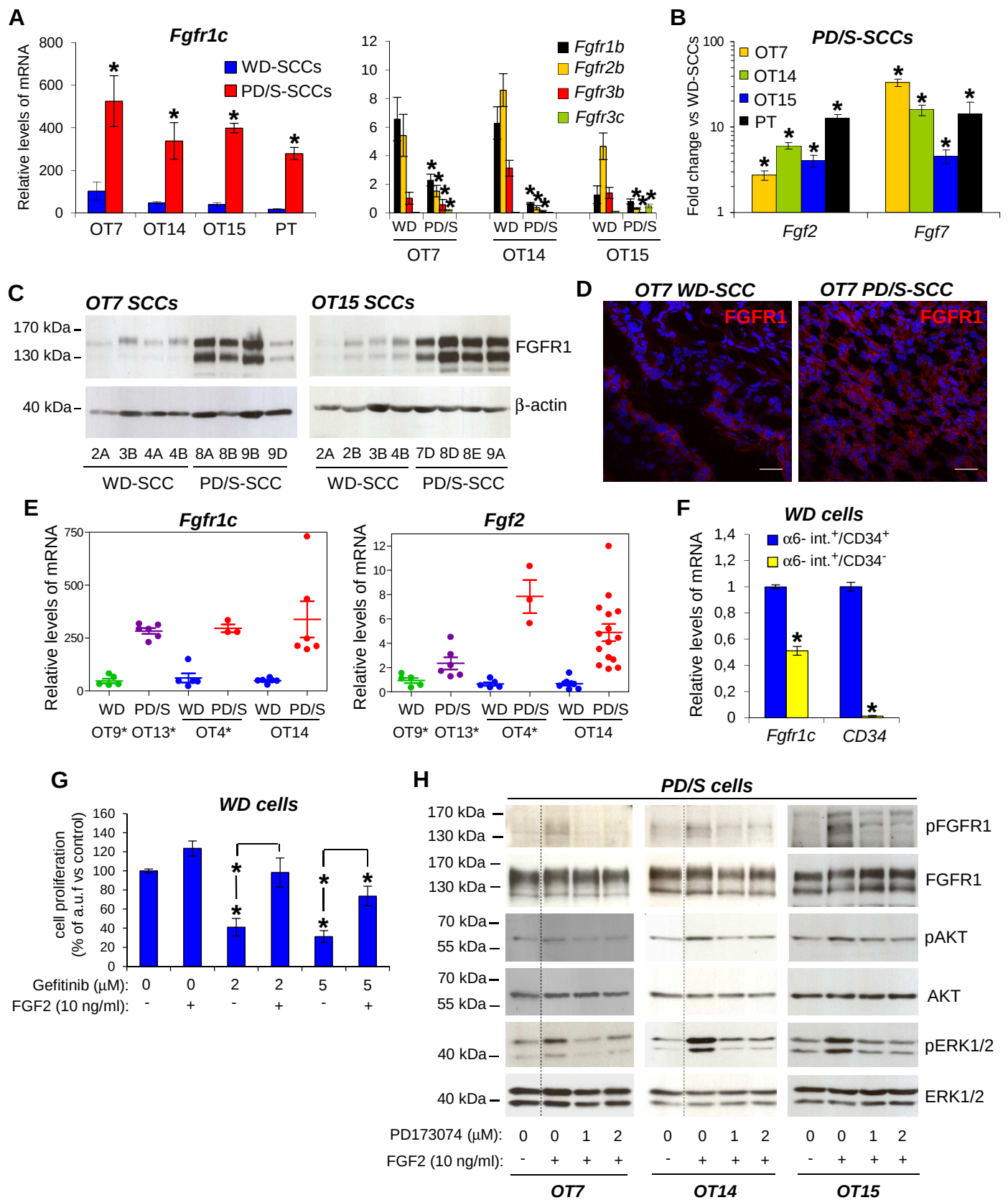


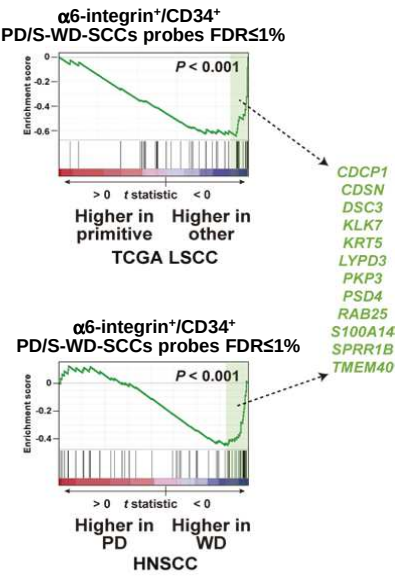
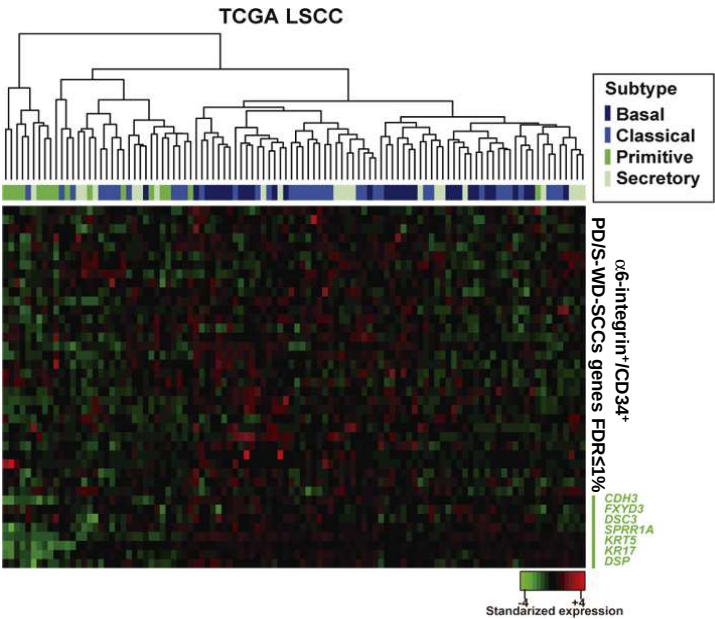












SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Figure S1. Characterization of ortho-SCCs during tumor progression.

(A) Schema for generating lineages with orthotopic skin SCCs. Ortho-SCCs (OT) were serially engrafted to allow tumor progression. Scale bar, 50 μm .

(B) Percentage of alleles with the indicated *Hras* and *Kras* mutations, as analyzed by pyrosequencing assays. WT indicates the absence of the indicated mutations.

(C) Representative images showing histopathological features (H/E hematoxylin/eosin staining) and cells expressing K14 and K8 in WD-SCCs and PD/S-SCCs. Scale bar, 30 μm .

(D) Levels of *K14* and *K8* mRNA relative to *Gapdh* expression (individual data and mean $\pm$ SE) in WD-SCCs and PD/S-SCCs.

(E) Growth kinetics (mean $\pm$ SE of tumor size) of PD/S-SCCs and their respective WD-SCC precursors of the indicated lineages.

(F) Kaplan–Meier curves comparing the survival of mice carrying WD-SCCs and PD/S-SCCs.

(G) Mice developing metastatic lesions indicated as percentage and frequency out of the total number of mice in each group and lineage.

(H) Latency time (individual data and mean $\pm$ SE) of metastasis development in the indicated groups.

* indicates significant differences between groups (*t*-test; $P < 0.05$).

Figure S2. Skin SCCs show enhanced stemness and induction of EMT at late stages of progression.

(A) Percentage, frequency and size of tumors generated after injection in nude mice of the indicated cells from WD-SCCs and PD/S-SCCs.

(B) Growth kinetics (mean $\pm$ SE of tumor size) of tumors generated after engrafting the indicated number of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells isolated from WD-SCCs and PD/S-SCCs.

* indicates significant differences between groups (*t*-test; *P* < 0.05).

(C) Analysis by flow cytometry of CD34⁺ cells expressing $\alpha 6$ -integrin and EpCAM in primary WD-SCC and PD/S-SCC.

(D) Immunodetection of E-cadherin and Vimentin-expressing cells in WD-SCC and PD/S-SCC. Scale bar, 30 μ m.

(E) Levels of ZEB-1 protein in WD-SCCs and PD/S-SCCs. β -actin was used as a protein-loading control. The sample number identifies the tumor passage and the letters indicate independent tumor replicates.

(F) Quantification (mean $\pm$ SE) of the indicated mRNAs relative to *Gapdh* mRNA in WD-SCCs and PD/S-SCCs of lineages generated from spontaneous (OT4) and DMBA/TPA-induced tumor (OT14). Tumor samples of early and late passages of a lineage generated from WD-SCC that never progressed (OT9) and from a PD/S-SCC (OT13) are included. (*) indicates that tumors of origin of these lineages were spontaneously induced.

Figure S3. Primary cell cultures derived from WD-SCCs and PD/S-SCCs are enriched in CSCs and exhibit similar features to E-CSCs and L-CSCs.

(A) Cells derived from WD-SCCs (WD cells) grow *in vitro* as adherent cells and those derived from PD/S-SCCs (PD/S cells) grow as spheres.

(B) Analysis of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ and EpCAM⁺/CD34⁺ cells in WD and PD/S cells, by flow cytometry.

(C) mRNA quantification of EMT markers and EMT-inducer transcription factors. Mean ($\pm$ SE) mRNA levels of these genes in PD/S cells and PD/S-SCCs relative to WD cells (2 samples per group) and WD-SCCs, respectively.

(D, E) Mean ($\pm$ SE) mRNA levels of the indicated genes relative to *Gapdh* expression, quantified by qRT-PCR.

(F, H) Proliferation (mean $\pm$ SE of a.u.f) of WD cells from the indicated lineages, after EGF and/or Gefinitib treatments, as measured by MTT.

(G) Effect of Gefitinib and/or EGF treatment on EGFR, AKT and ERK1/2 phosphorylation in OT14 WD cells.

* indicates significant differences between groups (*t*-test; $P < 0.05$).

Figure S4. Autocrine PDGFR α signaling is upregulated in PD/S-SCCs.

(A) Quantification of *Pdgfra*, *Pdgfrb* mRNA relative to *Gapdh* expression (mean $\pm$ SE) in samples of SCC lineages (OT) and primary tumors (PT).

(B) Quantification by flow cytometry of $\alpha 6$ -integrin⁺ cells expressing PDGFR α and CD34 in primary SCCs.

(C) Mean ($\pm$ SE) levels of *Pdgfra* and *Pdgfrb* mRNA relative to *Gapdh* mRNA in WD cells and PD/S cells (2 samples per group).

(D) Percentage (mean $\pm$ SE) of the indicated cells in WD-SCCs and PD/S-SCCs (6-8 tumors per group), as quantified by flow cytometry.

(E) Quantification of PDGFR ligand mRNAs (mean $\pm$ SE) in PD/S-SCCs relative to WD-SCCs in the indicated lineages (5-7 samples per group) and in primary SCCs (PT PD/S).

* indicates significant differences between groups (*t*-test; $P < 0.05$).

(F) mRNA levels (mean $\pm$ SE) of the indicated genes relative to *Gapdh* expression in samples of SCC lineages that progressed (OT4 and OT14), lineages that did not show tumor progression (OT9) and those that conserved PD/S-SCC features (OT13) after serial engraftment. (*) indicates that tumors of origin of these lineages were spontaneously induced.

(G) Phosphorylation status of PDGFR α in PD/S tumor cells in the absence or presence of the indicated ligands and Imatinib.

(H) Proliferation kinetics (mean $\pm$ SE of a.u.f.) of PD/S cells of the indicated lineages treated without (control) or with PDGF-AA (10 ng/ml), PDGF-BB (30 ng/ml) and PDGF-CC (30 ng/ml), as determined by MTT assays.

(I) PD/S cell proliferation in response of PDGF-BB (30 ng/ml) and increasing doses of Imatinib. Results (mean $\pm$ SE) represent cell proliferation (a.u.f.) upon these treatments relative to their respective cells growing without factors (red line).

Figure S5. Inhibition of PDGFR α signaling reduces metastasis development, but not tumor growth.

(A) PDGFR α expression in the indicated cells after transduction with sh-control and sh-PDGFR α lentivirus.

(B) Proliferation kinetics (mean $\pm$ SE of a.u.f. relative to day 0) of PDGFR α -interfered (sh-PDGFR α) and PDGFR α -expressing (sh-control) cells.

(C) Growth kinetics (mean $\pm$ SE of tumor size; 8 tumors per group) of tumors generated from control and PDGFR α -knocked-down cells from the indicated PD/S-SCCs.

(D) Levels of PDGFR α protein in the indicated tumors from the assays described in (C).

(E) Percentage of metastatic foci per lung section (mean $\pm$ SE) developed from sh-PDGFR α tumors relative to control tumors (12 mice per group from 3 PD-SCC lineages). * indicates significant differences between groups (*t*-test; *P* < 0.05).

(F) Levels of PDGFR α protein in tumors (T) and their respective metastasis (M) of the indicated samples. A tumor-free lung sample (C) was included as a control of PDGFR α expression in this tissue. β -actin was included as a protein-loading control in (A, D and F). Dotted line indicates that these samples were analyzed in the same gel but in distant lanes.

(G) Mean ($\pm$ SE) frequency of CD31⁺ vessels per tumor section in the indicated groups.

(H) Quantification by flow cytometry of the percentage of α 6-integrin⁺/CD34⁺ cells (mean $\pm$ SE) in the indicated tumor groups.

(I) Serial dilution of tumor cells isolated from PDGFR α -expressing and PDGFR α -interfered PD/S-SCCs were injected in immunodeficient mice. The number of mice developing tumors, frequency of CSCs and confidence intervals (conf. int.) for each condition are shown.

(J) mRNA levels (mean $\pm$ SE) of EMT markers relative to *Gapdh* expression in the indicated tumors.

Figure S6. PD/S-SCCs show autocrine activation of FGFR1 signaling.

(A) mRNA levels of the indicated genes relative to *Gapdh* mRNA (mean $\pm$ SE) in WD-SCCs and PD/S-SCCs of different lineages (6-8 samples per group) and primary tumors (PT) (4 samples per group).

(B) Quantification of *Fgf2* and *Fgf7* mRNA (mean $\pm$ SE) in PD/S-SCCs relative to WD-SCCs.

(C) FGFR1 protein levels in WD-SCCs and PD/S-SCCs. β -actin was included as a protein-loading control. The sample number identifies the tumor passage and the letters indicate independent tumor replicates.

(D) Immunodetection of FGFR1-expressing cells in WD-SCCs and PD/S-SCCs. Scale bar, 30 μ m.

(E) Quantification of mRNA levels of the indicated genes relative to *Gapdh* mRNA (individual data and mean $\pm$ SE) in SCC samples of lineages. (*) indicates that tumors of origin of these lineages were spontaneous SCCs.

(F) *FGFR1c* and *CD34* mRNA levels relative to *Gapdh* mRNA (mean $\pm$ SE) in α 6-integrin⁺/CD34⁺ and α 6-integrin⁺/CD34⁻ populations isolated from WD cells.

(G) Results (mean $\pm$ SE) represent WD cell proliferation (a.u.f.) in the absence or presence of FGF2 (10 ng/ml) and increasing doses of Gefitinib, as determined by MTT assays. * indicates significant differences between groups (*t*-test; *P* < 0.05).

(H) Analysis of phosphorylation status of FGFR, AKT and ERK1/2 proteins upon FGF2 and PD173074 treatment in PD/S tumor of the indicated lineages. Dotted line indicates that these samples were analyzed in the same gel but in distant lanes.

Figure S7. L-CSC signature identifies advanced and poor-prognosis human lung and head-neck SCC.

Left, heatmap representation of differentially expressed genes (FDR $\leq$ 1%) in mouse L-CSCs that identifies a subgroup of human undifferentiated lung SCCs associated with poor prognosis. Right, GSEA enrichment plots showing a set of genes underexpressed in human lung SCCs (upper right panel) and in human HNSCCs (bottom right panel), which were also significantly downregulated in L-CSCs.

SUPPLEMENTARY TABLES

# tumor lineage	Primary tumor histopathology	Growth time (P1)	# of tumor passage / histopathology									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OT1	WD/MD-SCC	9 w										
OT2	WD/MD-SCC	5 w										
OT4*	WD/MD-SCC	7 w										
OT7	WD-SCC	18 w										
OT8	WD/MD-SCC	21 w										
OT9*	WD/MD-SCC	12 w										
OT11	PD/spindle-SCC	2 w										
OT12*	PD/spindle-SCC	2 w										
OT13*	PD/spindle-SCC	2 w										
OT14	WD/MD-SCC	13 w										
OT15	WD/MD-SCC	7 w										

Table S1. Features of primary- and ortho-SCCs (OT) of different tumor lineages.

The latency (weeks) to tumor growth after the first orthotopic implant (P1) is shown. * indicates spontaneous tumors, whereas the others SCCs were generated after DMBA-TPA treatment. The histopathology of the tumor sample at each engraftment is indicated by colors: yellow, WD/MD-SCCs; orange, MD-PD-SCCs; red: PD-SCC and spindle tumors. White boxes indicate that we interrupted the serial engraftment at this point.

<i>Sample</i>	<i>Classification/Grade</i>	<i>% of indicated tumor region in overall sample*</i>			
		<i>% WD-SCC</i>	<i>% MD-SCC</i>	<i>% PD-SCC</i>	<i>% spindle SCC</i>
T1(R)	PD-SCC / G3	0%	0%	95%	5%
T2 (R)	PD-SCC / G3	0%	0%	40%	60%
T3 (R)	PD-SCC / G4	0%	0%	0%	100%
T5	PD-SCC/ G3	0%	55%	45%	0%
T6	MD-SCC / G2	0%	100%	0%	0%
T7	MD-SCC / G2	0%	80%	20%	0%
T8 (M)	MD-SCC / G2	5%	85%	10%	0%
T9	MD-SCC / G2	40%	60%	0%	0%
T10	PD-SCC / G3	5%	55%	40%	0%
T16 (R)	PD-SCC / G4	0%	0%	0%	100%
T23	MD-SCC / G2	10%	90%	0%	0%
T24	WD-SCC /G1	100%	0%	0%	0%
T26	PD-SCC / G3	0%	0%	100%	0%
T30	PD-SCC / G3	0%	60%	40%	0%
T34	MD-SCC / G2	70%	30%	0%	0%
T39	MD-SCC / G2	0%	100%	0%	0%
T41	WD/MD-SCC / G2	40%	50%	10%	0%
T42 (R)	PD-SCC / G4	0%	0%	0%	100%

Table S3. Features of human skin SCC samples. Due to human samples frequently present intra-tumor heterogeneity in the histopathological grade, a pathologist determined the percentage represented by each region in the overall sample. Tumors that contain at least 40% of PD component or spindle regions were classed as PD/S-SCCs. R: recurrent tumor; M: tumor with associated lymph node metastasis.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Isolation of SCC cells

Excised tumors were minced and incubated with collagenase I (60 U/ml; Sigma) and dispase (0.7 U/ml; Gibco) overnight at 37 °C. Cell suspensions were filtered and recovered after centrifugation. Tumor cells were incubated with anti-CD31 antibody (1:200; BD Bioscience) for 30 min at 4 °C, then with Dynabeads[®] anti-rat (1:50; Invitrogen) for 30 min at 4 °C to deplete the suspension of endothelial cells. The cells in the supernatant were used in flow cytometry assays, where CD45⁺ (1:50; eBioscience) cells were excluded.

Flow cytometry analysis and sorting

For flow cytometry analysis and sorting, isolated tumor cells in blocking buffer (5% FBS in PBS) were stained with biotin-labeled CD34 antibody (1:30; eBioscience) for 30 min at 4 °C, then with streptavidin-allophycocyanin (1:50; BD Bioscience) and phycoerythrin-labeled α 6-integrin (CD49f) antibody (1:50; BD Bioscience) or FITC-labeled α 6-integrin (CD49f) antibody (1:50; BD Bioscience) for 30 min at 4 °C. In addition, isolated tumor cells were incubated for 30 min at 4 °C with anti-CD140a-PE antibody (1:50; eBioscience) and anti-EpCAM APC/Cy7 (1:50; BioLegend) to identify PDGFR α ⁺ cells and EpCAM-expressing cells, respectively. Cells were finally resuspended in analysis buffer (2% FBS, 0.5 mM EDTA in PBS). The live cells excluded DAPI (Sigma). Fluorescence-activated cell sorting (FACS) and analysis were done with BD Bioscience Aria equipment.

Cell cultures and treatments

All primary cell cultures used in this manuscript were established in our laboratory from orthotopically engrafted WD-SCCs and PD/S-SCCs during the development of these studies. For proliferation assays, 2×10^3 of WD cells were seeded per well in replicates on 96-well plates and starved in basic medium for 12 h. PD/S cells, already growing in basic medium, were seeded at the same density. Then, fresh basic medium without or with EGF (20 ng/ml), FGF2 (10 ng/ml) or PDGF-AA (10-30 ng/ml), PDGF-BB (10-30 ng/ml) or PDGF-CC (10-30 ng/ml) was added. Cell viability was measured using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. To evaluate the effect of Imatinib or PD173074 on the presence or absence of growth factors, 5×10^3 PD/S cells/well were seeded in replicates on 96-well plates and inhibitors were added in fresh basic medium 2 h before the growth factor treatments began. In these assays, medium with factors and/or inhibitors was refreshed every 3 days and cell proliferation and survival were measured by calculating the mean ($\pm$ SE) absorbance at 560 nm after 6 days of treatment with MTT assays. To determine the effect of growth factors and inhibitors on the activation/inhibition of EGFR, PDGFR and FGFR signaling, 1.5×10^6 WD and PD/S cells/well were seeded in six-well plates. WD cells were starved for 12 h in the absence of factors before starting the treatments. Inhibitors were added 2 h before treatment with growth factors. Cells were then incubated for 10 min in the presence of respective factors. At the end of treatment, cells were placed on ice, washed twice with cold PBS and recovered for further analysis by western blot.

Short hairpin (sh) RNA and lentiviral transductions

To knock down PDGFR α expression, six TRC shRNA lentivirus vectors (Dharmacon) targeting the expression of this gene were initially tested. TCF/LEF reporter driving expression of EGFP (7TGC) (1) was used to compare the transcriptional activity of β -catenin in WD and PD/S cells and derivative SCCs. To carry out the transduction, lentivirus particles were produced in 293T using standard protocols and psPAX2 and pMD2.G as packaging vectors. WD cells growing as adherent cells were detached by trypsin treatment (Trypsin 2.5X/EDTA; Sigma) for 10 min at 37 °C, and 1×10^6 cells were seeded in plates 24 h before infection, whereas PD/S cells, growing as spheres, were mechanically disaggregated and 1×10^6 cells were plated as individual cells just before infection. WD and PD/S cells were then incubated with 293T medium containing lentivirus particles and the standard infection protocol was followed.

Western blotting

Whole-cell extracts were prepared from tumors and isolated tumor cells in lysis buffer (50 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA, 350 mM NaCl, 0.5% NP-40, 10% glycerol, 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), 2 mM NaF, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM DTT, PhosSTOP (Roche), Complete (Roche), 0.1% SDS (Invitrogen) and 1% Triton X-100 (Thermo Scientific)), as previously described (2). After transfer, proteins were incubated overnight with the antibodies anti- β -catenin (1:5000; BD Bioscience), anti-active β -catenin (1:400; Millipore), anti-EGFR (1:1000; Cell Signaling), anti-pEGFR (1:1000; Cell Signaling), anti-AKT (1:1000; Cell Signaling), anti-pAKT (1:1000; Cell Signaling), anti-ERK1/2 (1:1000; Cell Signaling), anti-pERK1/2 (1:1000; Cell Signaling), anti-PDGFR α (1:500; R&D Systems), anti-pPDGFR α (1:1000; R&D Systems), anti-FGFR1 (1:1000; Cell Signaling), anti-pFGFR (1:1000; Cell Signaling), anti-ZEB1 (1:500; Abcam), anti-cleaved Caspase-3 (1:1000; Cell Signaling) and anti- β -

actin (1:50.000; Sigma). Antibody binding was detected with a secondary antibody coupled to horseradish peroxidase using enhanced chemiluminescence detection reagents (Amersham).

Histology and immunohistochemistry

Tumors were fixed in 4% formaldehyde overnight at 4 °C, paraffin-embedded and sectioned at 4 µm. For immunofluorescence or immunohistochemical staining, antigens were retrieved in 10 mM sodium citrate (pH 6.0). Tumor sections were blocked with 5% horse serum or 5% BSA in PBS for 1 h at room temperature and incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. The primary antibodies used were anti-β-catenin (1:150; BD Bioscience), anti-E-cadherin (1:100; Cell Signaling), anti-Vimentin (1:500; Abcam), anti-K14 (1:400; Covance), anti-K8 (1:100; Covance), anti-FGFR1 (1:80; Cell Signaling), anti-phosphorylated H3 (Ser10) (1:200; Cell Signaling) and anti-CD31 (1:50; BD Bioscience). Tumor sections were then incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. The MOM Basic Kit (Vector Laboratories) was used for mouse monoclonal antibodies (following the manufacturer's instructions). To visualize EGFP or mCherry directly, tumors were previously fixed in 4% formaldehyde for 30 min, washed for 30 min with PBS and then embedded in OCT. Nuclei were stained using 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for immunofluorescence. Samples were imaged on a Leica DM6000B microscope and a Leica TCS SP5 confocal microscope.

Reverse transcription and quantitative PCR

RNA samples were DNase-treated with Turbo DNA-free (Ambion). The High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) was used for reverse transcription. Real-time PCR reactions were performed on an Applied Biosystems

7900HT System, using PCR Master Mix No AmpErase[®] UNG (Applied Biosystems) and TaqMan Gene Expression Assays, or were performed using SYBR Green Mix (Applied Biosystems). All data were normalized with respect to *Gapdh* and *Hprt1* expression for human and mouse samples.

cDNA amplification and microarray analysis

cDNA amplification by picoprofiling was performed as previously described (3). cDNA was purified using GeneElute PCR Clean-up columns (Sigma Aldrich). 7 µg cDNA was used for hybridization in an Affymetrix Mouse Genome 430 PM strip array. Summary expression values for all probe sets were calculated using the RMA algorithm as implemented in the affy package from Bioconductor, written in the R statistical language (4). To identify genes that were differentially expressed between L-CSCs and E-CSCs, whole gene expression profiles of L-CSC populations ($\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells isolated from four independent PD/S-SCCs) from three different lineages were compared with their respective E-CSC populations ($\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells isolated from their respective WD-SCCs). Genes differentially expressed in L-CSCs from all lineages were detected using the empirical Bayes (eBayes) adjusted *t*-test, as implemented in the Limma package. WD-SCC and PD/S-SCC conditions and the sample type were considered when the linear model was developed. Multiple testing was corrected by the Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR) method. Differentially expressed genes were defined as those exhibiting an at least two-fold change and having an FDR *P*-value of < 5%. To identify the biological processes that are over- or under-represented by the differentially expressed genes, hypergeometric tests for association of Gene Ontology (GO) biological process categories and genes were performed using the GOSTats package (5). Hierarchical clustering of the

expression profile was performed using the Euclidean distance and Ward's minimum variance as the agglomeration method.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Fuerer C, Nusse R. Lentiviral vectors to probe and manipulate the Wnt signaling pathway. *PloS One* 2010;5(2):e9370.
2. Muñoz P, Blanco R, Flores JM, Blasco MA. XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer. *Nat Genet* 2005;37(10):1063-71.
3. Gonzalez-Roca E, Garcia-Albeniz X, Rodriguez-Mulero S, Gomis RR, Kornacker K, Auer H. Accurate expression profiling of very small cell populations. *PloS One* 2010;5(12):e14418.
4. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2004;20(3):307-15.
5. Falcon S, Gentleman R. Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2007;23(2):257-8.