



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**El eje *IGFBP3*/miR-34a en la diferenciación alveolar:
su relevancia en el desarrollo pulmonar humano
y el desarrollo de modelos de organoides derivados de
pacientes con cáncer de pulmón para su potencial
traslación al estudio del desarrollo tumoral**

Melissa Acosta Plasencia

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.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

TESIS DOCTORAL

El eje *IGFBP3*/miR-34a en la diferenciación alveolar: su relevancia en el desarrollo pulmonar humano y el desarrollo de modelos de organoides derivados de pacientes con cáncer de pulmón para su potencial traslación al estudio del desarrollo tumoral

Memoria de tesis doctoral presentada por ***Melissa Acosta Plasencia*** para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona

Dirigida y tutorizada por el *Dr. Alfons Navarro Ponz*, del Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-quirúrgicas de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado Medicina e Investigación Translacional
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud
Universidad de Barcelona

Enero, 2025

A mi madre, a mi tía
y a Mateu

AGRADECIMIENTOS

Los logros que se reflejan en esta tesis no habrían sido posibles sin el apoyo de las personas que me han acompañado durante estos años. Este apartado es mi forma de agradecer a todos los que, de una manera u otra, han dejado su huella en este proyecto y en mi camino académico y personal.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a la Unidad de Anatomía y Embriología Humana del Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-quirúrgicas, y a todos sus integrantes. Me gustaría destacar a Trinidad Martínez, Dolors Fusters, el Dr. Josep Maria Potau, la Dra. Carme Muñoz, la Dra. Neus Ciurana, el Dr. Albert Prats, la Dra. Guadalupe Soria y a su grupo de investigación. También, quisiera agradecer a los clínicos y clínicas del Hospital Clínic que han colaborado con nosotros. Por otro lado, quiero reconocer y dar las gracias a los miembros del laboratorio de Oncología y Embriología Molecular, en donde realicé esta tesis. Primero, a los que formaron parte del laboratorio durante estos años, en particular al Dr. Jordi Canals, por su optimismo; a la Dra. Sandra Castaño, por su apoyo; al Dr. Bing Han, por su generosidad; y al Dr. Mariano Monzó, por su sabiduría. A las recientes incorporaciones al laboratorio: al Dr. Antonio Altuna; y a Risha Na, por ser siempre tan amable conmigo y por sus conocimientos. A Yangyi He, por entenderme tan bien en este camino y apoyarme en todo momento. A la Dra. Tania Díaz, por nuestras valiosas conversaciones y momentos de risas, por siempre estar dispuesta a escucharme y ayudarme con sus consejos, que tanto aprecio. Y, sobre todo, quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Alfons Navarro, por ser no solo un mentor académico, sino también todo un modelo a seguir por su dedicación y pasión por la ciencia. Muchísimas gracias por haber confiado en mí, por guiarme tan bien a lo largo del doctorado y por enseñarme mucho más de lo que me hubiera imaginado.

En segundo lugar, quiero dar las gracias a mis amigos y amigas. Por una parte, a aquellas con las que compartí mis años universitarios en Granada, en especial a Bea, Sofía, Paula, Mari, María y Cristina, quienes hacen que recuerde con tanto cariño esta época, llena de momentos especiales que los guardaré para siempre. También quiero agradecer a los amigos que he conocido en Barcelona, especialmente a Ale, por ser un amigo en quien poder confiar y con quien siempre puedo contar, y a José, por enseñarme tanto cuando empecé el máster y por nuestras conversaciones profundas. Por otro lado, a mis queridas amigas de toda la vida, sin las cuales no sería quien soy. A Eve, por haber

llegado a mi vida cuando éramos pequeñas y por siempre seguir ahí, aconsejándome y apoyándome todos estos años; a Carmen, por los recuerdos que hemos vivido, por comprenderme, escucharme y motivarme cuando he tenido un problema; a Isa, por siempre estar dispuesta a ayudarme, por las risas y lágrimas que hemos compartido, y por hacer que cada vez que nos encontremos sea como si no hubiera pasado el tiempo; y a Bea, por ser tan buena persona y tan valiosa en mi vida, por todos los momentos inolvidables que hemos compartido y por siempre escucharme y ayudarme, incluso en los momentos más difíciles. Sé que siempre contaremos la una con la otra.

En tercer lugar, quiero agradecer a mi familia, quienes siempre han creído en mí. A mis tíos Adelto y Carlos, y a mis primas Ayesa y Zuly, quienes me han mostrado su apoyo y su cariño en todo momento. A mis abuelos Quelo y Concha y mi tía Lula, que, aunque ya no estén físicamente, su amor y todo lo que me enseñaron estarán siempre conmigo. A mi hermano David, con quien he compartido tantos recuerdos y momentos de complicidad, y que, a pesar de la distancia, sigue siendo una persona incondicional para mí. A la familia de Mateu: Rosa, Jaume, Cati, Manu y Clara, por acogerme con tanto cariño desde el primer día y hacerme sentir como una más de la familia, siempre preocupándose por mí. En especial, quiero agradecer a Mateu, mi pilar y a quien quiero muchísimo. Gracias por siempre estar a mi lado, por escucharme y levantarme en los momentos difíciles, especialmente en esta etapa final de la tesis. Gracias por sacarme una sonrisa todos los días, por entenderme tan bien y por todo lo que hemos vivido y nos queda por vivir. Gracias, por ser tú, y por todo lo que haces por mí. También quiero agradecer a mi tía Montse, por estar presente en cada etapa de mi vida, por comprenderme y por confiar en mí. Gracias por su amor, su bondad, por ser tan generosa y por ofrecerme siempre su ayuda. Finalmente, quiero dar las gracias de corazón a mi madre, por su amor incondicional hacia mi hermano y hacia mí, y por estar siempre que la necesitamos. Ha sido todo un ejemplo de fortaleza en los momentos difíciles que hemos pasado, y me ha enseñado lo importante que es el esfuerzo, la humildad y el ser buena persona, todo lo que es ella. Sin su sacrificio y dedicación, no estaría hoy donde estoy.

Jane Goodall: *“What you do makes a difference, and you have to decide what kind of difference you want to make.”*

FINANCIACIÓN

Esta tesis doctoral ha sido financiada a través del contrato predoctoral FI-SDUR 2021 de AGAUR, otorgado a la autora de esta memoria. Asimismo, ha contado con el apoyo de la subvención del Ministerio de Economía, Industria y Competencia (MINECO), cofinanciada por el fondo FEDER de la Unión Europea bajo el proyecto SAF2017-8866-P (AEI/FEDER, UE), otorgada al Dr. Alfons Navarro Ponz. También ha recibido el respaldo de la Ayuda a la Investigación PII de Oncología SEPAR-Astrazeneca 2021 (proyecto número 003), de la Ayuda a la Investigación SEPAR 2022 (proyecto número 1326), ambas concedidas al Dr. Ramón M. Marrades Sicart; y de la Ayuda a la Investigación SEPAR 2023 (proyecto número 1482), concedida al Dr. Laureano Molins López-Rodó, siendo estas tres últimas becas otorgadas por la Fundación Respira - Fundación Española del Pulmón (SEPAR).

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	1
ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS DE LA TESIS	9
INTRODUCCIÓN	11
1. La embriología del pulmón humano	13
1.1. Fundamentos del desarrollo del pulmón	13
1.2. Estadios del desarrollo pulmonar	14
1.2.1. Estadio embrionario	15
1.2.2. Estadio pseudoglandular	17
1.2.3. Estadio canalicular	19
1.2.4. Estadio sacular.....	22
1.2.5. Estadio alveolar.....	23
1.3. Regulación molecular del desarrollo pulmonar.....	24
1.4. Linaje celular del epitelio pulmonar.....	28
2. El cáncer de pulmón.....	31
2.1. Epidemiología	31
2.2. Factores de riesgo.....	32
2.3. Clasificación histopatológica del cáncer de pulmón	34
2.3.1. Cáncer de pulmón de célula pequeña	34
2.3.2. Cáncer de pulmón de célula no pequeña	35
2.4. Clínica del cáncer de pulmón	41
2.4.1. Diagnóstico.....	41
2.4.2. Estadiaje y pronóstico	42
2.4.3. Tratamiento	43
2.5. Desarrollo y biología molecular del cáncer de pulmón.....	45
2.5.1. Células madre del cáncer.....	45
2.5.2. Mutaciones en oncogenes y en genes supresores tumorales	47
3. Organoides para el estudio de la embriología humana y el cáncer	49
3.1. El uso de los organoides frente a los modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> tradicionales	49
3.1.1. Principales características en el cultivo de organoides.....	50
3.2. Cultivo de organoides derivados de pulmón embrionario.....	53
3.2. Cultivo de organoides derivados de tejido normal y de tejido tumoral de pulmón.....	57
3.3.1. Organoides de tejido normal de pulmón	59
3.3.2. Organoides de tejido tumoral de pulmón	60
4. La proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina tipo 3 (IGFBP-3)	63
4.1. El sistema de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs)	63

4.2. La estructura de IGFBP-3	65
4.3. Acciones de IGFBP-3 dependientes de IGF.....	67
4.4. Acciones de IGFBP-3 independientes de IGF	69
4.4.1. Interacción de IGFBP-3 con la vía de señalización TGF- β /Smad	70
4.5. El papel de IGFBP-3 en el desarrollo embrionario	71
4.6. El papel de IGFBP-3 en la diferenciación celular.....	72
4.7. El papel de IGFBP-3 en el cáncer	73
5. Los microARNs	75
5.1. Clasificación de los ARNs no codificantes	75
5.2. Función y biogénesis de los microARNs	76
5.3. El papel de los microARNs en el desarrollo pulmonar embrionario y en el cáncer de pulmón.....	78
HIPÓTESIS	81
OBJETIVOS.....	85
1. Objetivos generales	87
2. Objetivos específicos.....	87
MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS	89
1. Primer artículo: “ <i>Discovering genes and microRNAs involved in human lung development unveils IGFBP3/miR 34a dynamics and their relevance for alveolar differentiation</i> ”	91
2. Segundo artículo: “ <i>Selection of the Most Suitable Culture Medium for Patient-Derived Lung Cancer Organoids</i> ”	111
DISCUSIÓN.....	127
CONCLUSIONES.....	143
BIBLIOGRAFÍA.....	147

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

2D	2 dimensiones
3D	3 dimensiones
ABCA10	<i>ATP Binding Cassette Subfamily A Member 10</i>
ACT	<i>Acetylated tubulin</i>
ACVR2B	<i>Activin receptor type IIB</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGER	<i>Advanced glycation end products receptor</i>
AKT	<i>Protein kinase B</i>
ALDH1	<i>Aldehyde dehydrogenase 1</i>
ALDH1A1	<i>Aldehyde dehydrogenase 1 family member A1</i>
ALDH1A3	<i>Aldehyde dehydrogenase 1 family member A3</i>
ALS	<i>Acid-labile subunit</i>
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
AQP5	<i>Aquaporin-5</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ASCs	<i>Adult stem cells</i>
ASCL1	<i>Achaete-scute family BHLH transcription factor 1</i>
ASOs	<i>Antisense oligonucleotides</i>
AT1	<i>Alveolar type I cells</i>
AT2	<i>Alveolar type II cells</i>
ATP11A	<i>ATPase phospholipid transporting 11A</i>
AXIN	<i>Axis inhibition protein 2</i>

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

BASCs	<i>Bronchioalveolar stem cells</i>
BIRC5	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 5</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BMP2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
BMP4	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>
CD133	<i>Cluster of differentiation 133</i>
CD31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
CD34	<i>Cluster of differentiation 34</i>
CD44	<i>Cluster of differentiation 44</i>
CD56	<i>Cluster of differentiation 56</i>
CDX2	<i>Caudal type homeobox 2</i>
CHGA	<i>Chromogranin A</i>
circARN	ARNs circulante
CK5	<i>Cytokeratin 5</i>
CK6	<i>Cytokeratin 6</i>
CNV	<i>Copy number variation</i>
CPCP	Cáncer de pulmón de célula pequeña
CPCNP	Cáncer de pulmón de célula no pequeña
CSCs	<i>Cancer stem cells</i>
CTCs	Células tumorales circulantes
CYTL1	<i>Cytokine-like 1</i>
DEG	<i>Differentially expressed genes</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGFRvIII	<i>Epidermal growth factor receptor variant III</i>
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERBB2	<i>Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i>
ER	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ESCs	<i>Embryonic stem cells</i>
ESMO	<i>European Society of Medical Oncology</i>
ETV5	<i>ETS variant transcription factor 5</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGF10	<i>Fibroblast growth factor 10</i>
FGF7	<i>Fibroblast growth factor 7</i>
FGF8	<i>Fibroblast growth factor 8</i>
FGFR1	<i>Fibroblast growth factor 1</i>
FGFR2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
FOXA2	<i>Forkhead box protein A2</i>
FOXJ1	<i>Forkhead box J1</i>
GAGs	Glucosaminoglicanos
GATA-6	<i>GATA-binding factor 6</i>
GFK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
HAND2	<i>Heart and neural crest derivatives expressed 2</i>
H&E	Hematoxilina-eosina
HIFs	<i>Hypoxia-inducible factors</i>

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ID1	<i>Inhibitor of DNA binding 1</i>
ID2	<i>Inhibitor of DNA binding 2</i>
IGFs	<i>Insulin-like growth factors</i>
IGF-IR	<i>Type I Insulin-like growth factor receptor</i>
IGF-IIR	<i>Type I Insulin-like growth factor receptor</i>
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor-binding protein</i>
IGFBP1	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 1</i>
IGFBP3	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 3</i>
IGFBP6	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 6</i>
iPSCs	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
IR	<i>Insulin receptor</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KLF4	<i>Kruppel-like factor 4</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LAMP3	<i>Lysosomal associated membrane protein 3</i>
LCOs	<i>Lung cancer organoids</i>
LEF1	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
LEFTY1	<i>Left-right determination factor 1</i>
LEFTY2	<i>Left-right determination factor 2</i>
LEOs	<i>Lung embryonic organoids</i>
LCM	<i>Limiting culture medium</i>
Lgf5	<i>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor</i>
LNOs	<i>Lung normal organoids</i>
lincARN	<i>ARN no codificante largo interénico</i>

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

lncARN	ARN no codificante largo
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MBM	<i>Minimum basal medium</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2</i>
miARN	microARN
MMPs	<i>Matrix metalloproteinases</i>
MLC1	<i>Megalencephalic Leukoencephalopathy with Subcortical Cysts 1</i>
MUC5AC	<i>Mucin 5AC</i>
MUC5B	<i>Mucin 5B</i>
MRE	<i>microRNA response elements</i>
NA	Nicotinamida
NAC	N-acetilcisteína
NAPSA	<i>Napsin A</i>
ncARN	ARN no codificante
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
NXK2-1	<i>NK2 homeobox 1</i>
OCT4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCM	<i>Permissive culture medium</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
pcw	<i>Post-conception weeks</i>
PDPN	<i>Podoplanin</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PDX	<i>Patient-derived xenograft</i>
PGE2	<i>Prostaglandina E2</i>

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
piARN	ARN interactuante con PIWI
PRDMI	<i>PR domain zinc finger protein 1</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RA	<i>Retinoic acid</i>
FAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
ROS1	<i>ROS proto-oncogene 1</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RXR	<i>Retinoid x receptor</i>
SAG	<i>Smoothed agonist</i>
SCGB1A1	<i>Secretoglobin 1A1</i>
SCGB3A2	<i>Secretoglobin 3A2</i>
scRNA-seq	<i>Single-cell RNA-sequencing</i>
snoARN	ARN nucleolar pequeño
SFTPA	<i>Surfactant protein A</i>
SFTPB	<i>Surfactant protein B</i>
SFTPC	<i>Surfactant protein C</i>
SFTPD	<i>Surfactant protein D</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
siARN	ARN pequeño de interferencia
SOX2	<i>Sex determining región Y-box 2</i>
SOX9	<i>Sex determining región Y-box 9</i>
SPRY1	<i>Sprouty RTK signaling antagonist 1</i>
SPRY2	<i>Sprouty RTK signaling antagonist 2</i>

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

SYP	Sinaptofisina
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TGF- β RI	<i>Transforming growth factor beta receptor I</i>
TGF- β RII	<i>Transforming growth factor beta receptor II</i>
TKI	<i>Tyrosine kinase inhibitors</i>
TME	<i>Tumor microenvironment</i>
TMEM 219	<i>Transmembrane protein 219</i>
TP63	<i>Tumor protein 63</i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
TTF-1	<i>Thyroid transcription factor 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WNT	<i>Wingless-type</i>
WNT2	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 2</i>
WNT7B	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 7B</i>
α -SMA	<i>α-smooth muscle actine</i>

ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS DE LA TESIS

La siguiente tesis doctoral se presenta en formato de compendio de publicaciones. La tesis consta de dos objetivos generales (ocho objetivos específicos) y dos artículos.

El primer artículo, aceptado el 10 de agosto de 2024 y publicado el 26 de agosto de 2024, es el siguiente:

Acosta-Plasencia M, Castellano JJ, Díaz T, He Y, Marrades RM, Navarro A. Discovering genes and microRNAs involved in human lung development unveils IGFBP3/miR-34a dynamics and their relevance for alveolar differentiation. Stem Cell Res Ther. 2024; 15(1).

FI (2023) = 7.1, Q1 (Cell & Tissue Engineering) de acuerdo con Journal Citation Reports 2023.

El segundo artículo, aceptado el 1 de septiembre de 2024 y publicado el 5 de septiembre de 2024, es el siguiente:

Acosta-Plasencia M, He Y, Martínez D, Orozco JP, Carrasco A, Altuna-Coy A, Yang T, Díaz T, Molins L, Ramos R, Marrades RM, Navarro A. Selection of the Most Suitable Culture Medium for Patient-Derived Lung Cancer Organoids. Cells Tissues Organs. 2024; 1-21.

FI (2023) = 2.9, Q1 (Anatomy & Morphology) de acuerdo con Journal Citation Reports 2023.

INTRODUCCIÓN

1. La embriología del pulmón humano

1.1. Fundamentos del desarrollo del pulmón

La supervivencia al nacer depende en gran medida de un correcto desarrollo y maduración del pulmón durante la gestación, dado que los pulmones deben estar preparados para realizar el intercambio gaseoso esencial para la vida terrestre (1, 2). Para cumplir con esta función, el pulmón cuenta con una serie de estructuras y características específicas que, en conjunto, hacen posible la respiración (3) (**Figura 1**).

En primer lugar, el sistema pulmonar se organiza en un árbol de vías respiratorias que comienza con los bronquios y bronquiolos, los cuales transportan el aire desde el exterior hasta las áreas más distales del pulmón (4). La última sección de este sistema de conducción aérea está formada por los bronquiolos terminales, que se conectan con los acinos. Los acinos son las unidades funcionales del pulmón que contienen los bronquiolos respiratorios y alveolos, donde se lleva a cabo el intercambio de gases (5, 6). Además, el pulmón presenta una extensa superficie recubierta por una barrera aire-sangre extremadamente delgada, diseñada para maximizar el intercambio gaseoso en el interior de los acinos (7). Esta arquitectura se complementa con un sistema vascular eficiente que transporta la sangre hacia la zona de intercambio, facilitando un contacto estrecho entre el aire y la sangre (8). Para proteger y optimizar esta estructura, el pulmón también cuenta con una barrera de fosfolípidos y proteínas conocida como surfactante, que reduce la tensión superficial en los alveolos, contribuye a su estabilidad durante la inflación y refuerza las defensas del organismo al eliminar patógenos inhalados (9).

Todos estos rasgos esenciales que permiten la viabilidad del pulmón deben desarrollarse de manera coordinada a partir de las yemas bronquiales primarias del embrión. Este proceso abarca una serie de etapas y de mecanismos fisiológicos y moleculares que garantizan la formación adecuada de cada uno de los componentes del pulmón (10, 11).

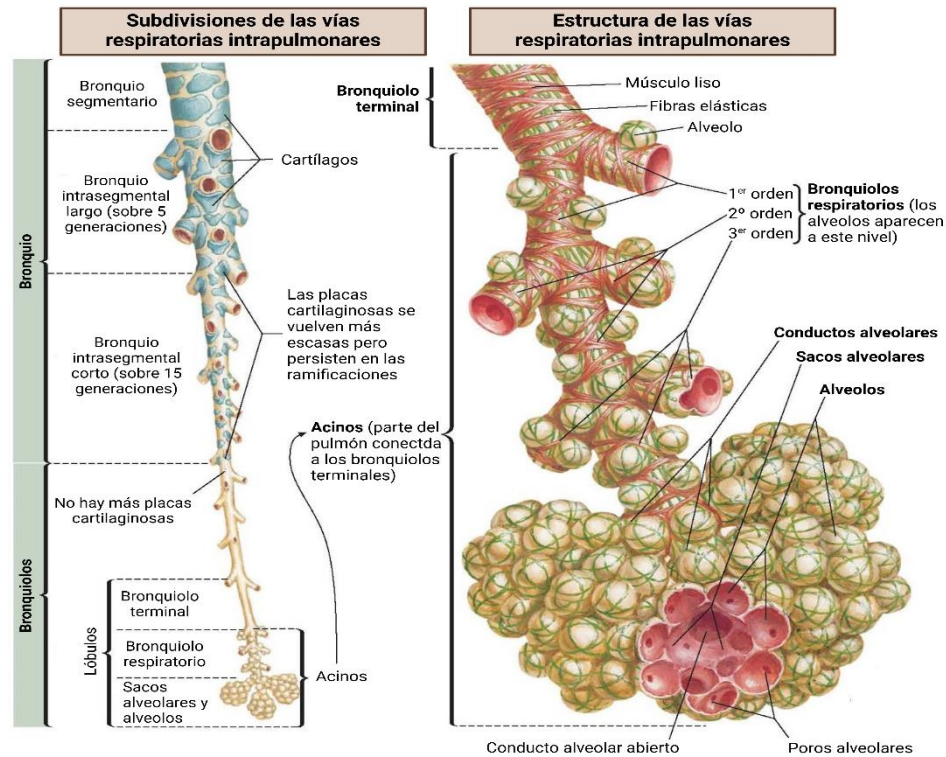


Figura 1. Estructuras que componen las vías respiratorias intrapulmonares. El bronquio principal se ramifica en bronquiolos, que conducen a los acinos pulmonares. Dentro de los acinos, los bronquiolos terminales marcan el fin de las vías de conducción, mientras que los bronquiolos respiratorios inician las vías de intercambio gaseoso, conectándose a conductos alveolares. Estos conductos culminan en sacos alveolares, donde los alvéolos individuales facilitan el intercambio de gases con los capilares circundantes. Figura adaptada de (12).

1.2. Estadios del desarrollo pulmonar

El desarrollo del pulmón humano abarca un periodo que comienza con la aparición del divertículo respiratorio a partir del intestino anterior en las 4 semanas post concepción (del inglés, *post conception weeks*) y se extiende hasta los primeros años de la infancia (13). Este proceso se divide en cinco estadios: embrionario, pseudoglandular, canalicular, sacular y alveolar (**Figura 2**), cada uno definido por sus propias características histológicas específicas y eventos clave (**Tabla 1**) (14). Cabe añadir, que estas etapas suelen solaparse en el tiempo, debido a que el proceso de formación del pulmón no es completamente sincrónico, pues algunos eventos pueden no haber concluido por completo cuando comienza el siguiente estadio. En particular, las regiones y estructuras más proximales tienden a desarrollarse a un ritmo más acelerado que las distales (15).

Estadio	Semanas	Eventos principales
<i>Embrionario</i>	4 a 6-8 pcw	Formación de la tráquea y los brotes bronquiales primarios
<i>Pseudoglandular</i>	6-8 a 16 pcw	Desarrollo del árbol bronquial, ramificación de los bronquios que recuerdan a glándulas
<i>Canalicular</i>	16 a 26-28 pcw	Formación de bronquiolos respiratorios y alveolos primitivos, generación de la red capilar primitiva y producción de surfactante
<i>Sacular</i>	26-28 a 32-36 pcw	Formación de los sacos terminales y maduración de los alveolos
<i>Alveolar</i>	32-36 pcw a 8 años de edad postnatal	Aumento en el número y tamaño de los alveolos y maduración del pulmón

Tabla 1. Los cinco estadios del desarrollo del pulmón. Se describen los tiempos aproximados y los eventos clave que ocurren en cada fase de la formación del pulmón humano. Tabla generada a partir de la información obtenida de (14).

1.2.1. Estadio embrionario

El estadio embrionario marca el inicio del desarrollo pulmonar, comenzando alrededor de las 4 pcw, cuando el embrión ya ha formado el intestino primitivo, dividido en las secciones anterior, media y posterior. En la región del intestino anterior, se produce una evaginación de la pared ventral, conocida como esbozo pulmonar o divertículo laringotraqueal, que establece la base del sistema respiratorio. Inicialmente, este esbozo se encuentra comunicado con el intestino anterior, sin embargo, a medida que se desarrolla el tabique traqueoesofágico, ambas estructuras se separan y diferencian en el esófago (porción dorsal) y la tráquea (porción ventral) (16, 17).

Hacia las 5 pcw, se desarrollan cuatro evaginaciones conocidas como bolsas faríngeas, que presentan en su cara anterior el orificio laringotraqueal, una conexión temprana entre el esbozo pulmonar y la tráquea en formación. Estas bolsas faríngeas alojan los arcos faríngeos, de los cuales el cuarto y el sexto son de especial relevancia en la formación del sistema respiratorio (18). Entre estos arcos aparece el surco laringotraqueal, que da origen a una estructura en forma de “T” llamada orificio laríngeo. Este orificio se forma mediante a una proliferación rápida de tejido en la 6ª semana, proceso conocido como re-epitelización, que provoca una obstrucción temporal de la luz del tubo laríngeo (19, 20).

Paralelamente, el esbozo pulmonar continúa su expansión en dirección caudal, alargándose para formar la yema pulmonar, que rápidamente se bifurca en dos yemas bronquiales primarias, las cuales representan los futuros pulmones derecho e izquierdo. Además, aprovechando este momento de crecimiento, la separación entre la tráquea y el esófago se irá reduciendo con el acercamiento de las crestas traqueoesofágicas que al fusionarse darán lugar a la pared traqueoesofágica, quedando el orificio laríngeo como la única vía de acceso hacia las vías respiratorias inferiores (21).

Como el esbozo pulmonar se origina a partir del intestino primitivo, el epitelio del árbol respiratorio tiene un origen endodérmico, rodeado por mesodermo, que contribuye a formar las estructuras de soporte y la vascularización del pulmón (22). Entre las 5 y 7 pcw, el mesodermo esplácnico que recubre la superficie externa de los pulmones se diferencia para formar la pleura visceral, mientras que el mesodermo somático, que reviste las paredes internas de la cavidad torácica, da lugar a la pleura parietal. Así, se forma la cavidad pleural entre ambas capas, lo cual permitirá el movimiento pulmonar esencial para la respiración dentro de la cavidad torácica (19).

Por tanto, las yemas bronquiales se presentan como pequeños túbulos simples formados por una gruesa capa de epitelio endodérmico y situados en un lecho de mesénquima laxo abundante. Esta doble procedencia celular, epitelial y mesenquimal, es fundamental para la correcta morfogénesis del árbol respiratorio, en la que ambos tipos celulares interactúan entre sí produciendo diversos factores y señales moleculares (23).

El desarrollo de la vasculatura pulmonar también ocurre en paralelo al desarrollo del árbol bronquial. El mesénquima que se encuentra alrededor de las yemas bronquiales comienza a presentar células positivas para el marcador endotelial CD31 (del inglés, *cluster of differentiation 31*), señalando el origen de los futuros capilares (24). Hacia las 5 pcw, comienza a formarse un plexo vascular alrededor de cada bronquio principal en formación. Este plexo se conecta cranealmente con el saco aórtico mediante las arterias pulmonares, mientras que caudalmente se une al seno venoso (futura aurícula izquierda), a través de las venas pulmonares. Los primeros vasos pulmonares emergen a partir del mesénquima subyacente mediante vasculogénesis, organizándose en estructuras capilares. Estos capilares se fusionan y forman pequeños vasos sanguíneos a lo largo de las vías respiratorias (25, 26).

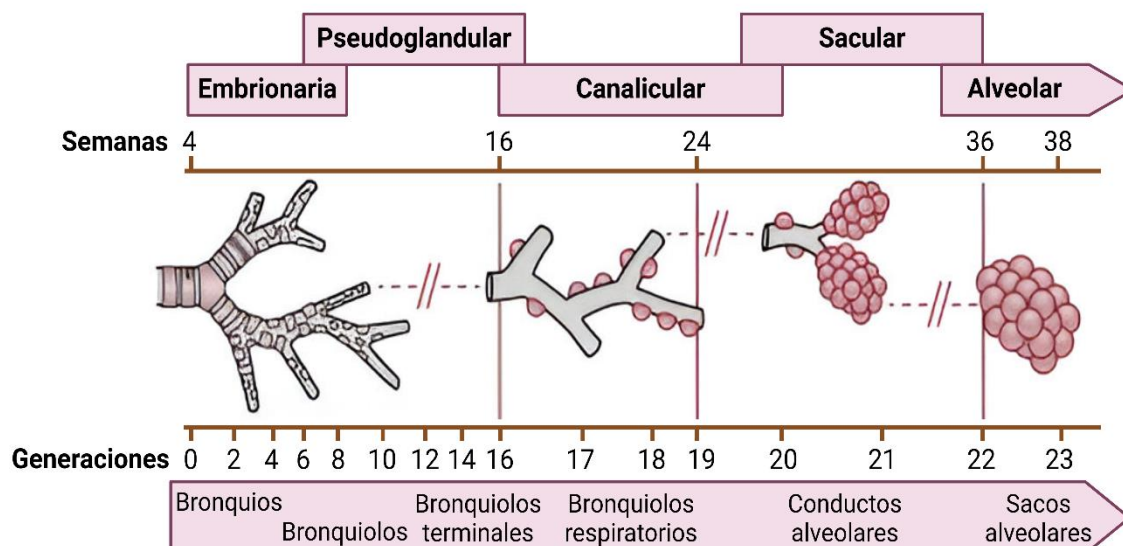


Figura 2. Diagrama de las cinco etapas del desarrollo pulmonar. Durante la etapa embrionaria (4 a 6-8 pcw), comienza la formación de los bronquios principales y segmentarios a partir de un divertículo del endodermo del intestino anterior primitivo, mientras que las arterias y venas pulmonares comienzan a emerger. La etapa pseudoglandular (6-8 a 16 pcw), se caracteriza por la ramificación de las vías respiratorias, dando lugar a los bronquiolos y bronquiolos terminales. En la etapa canalicular (16 a 26-28 pcw), los bronquiolos terminales se diferencian en bronquiolos respiratorios y comienza a desarrollarse la barrera alveolo-capilar. En la etapa sacular (26-28 a 32-36 pcw), los conductos alveolares se expanden y se desarrollan los sacos alveolares. Finalmente, en la etapa alveolar (32-36 pcw hasta los 8 años), los sacos alveolares maduran en alveolos funcionales, en los que la red de capilares pasa a ser simple, permitiendo un intercambio gaseoso eficiente. Figura adaptada de (27).

1.2.2. Estadio pseudoglandular

Entre las 6 y 8 pcw, comienza el estadio pseudoglandular, que se caracteriza por un crecimiento continuo y progresivo de los pulmones. La estructura histológica de las ramificaciones del árbol bronquial se asemeja a la de una glándula tubular en corte transversal, lo cual da origen al término "pseudoglandular" (19). Durante esta fase, las yemas bronquiales se ramifican de forma dicotómica, lo que provoca que el bronquio primario derecho se subdivida en tres bronquios secundarios, mientras que el izquierdo se divide en dos. Esto establece la configuración básica de tres lóbulos para el pulmón derecho y dos para el izquierdo. Al final de este estadio, la estructura de las vías aéreas de conducción principales, los bronquios y bronquiolos terminales, está prácticamente formada (17, 28). También hacia el cierre de esta fase, empiezan a desarrollarse las vías pre-acinares y los conductos alveolares iniciales; sin embargo, los elementos relacionados

directamente con el intercambio de gases aún no están presentes (15). Cualquier alteración en la ramificación normal de las vías aéreas durante este estadio puede resultar en anomalías como la hipoplasia pulmonar o la hernia diafragmática congénita, resaltando la importancia del estadio pseudoglandular en la formación y funcionalidad final del sistema respiratorio (29).

Al inicio de este estadio, los tubos endodérmicos están revestidos por un epitelio columnar pseudoestratificado. A partir de las 13 pcw, se inicia una diferenciación gradual del epitelio desde la región proximal hacia la distal (30) (**Figura 3a**). En las vías aéreas proximales, el epitelio es progresivamente reemplazado por células columnares, donde aparecen las primeras células epiteliales diferenciadas a partir de las células progenitoras proximales. Entre estas se incluyen las células basales, ubicadas en la base del epitelio y responsables de su renovación y de la regeneración (31); las células caliciformes, que secretan moco para proteger y lubricar las vías respiratorias; y las células ciliadas, las más abundantes, esenciales para el movimiento del moco y la limpieza del sistema respiratorio (32). A medida que la diferenciación avanza hacia las zonas distales, el epitelio se transforma en un tipo cúbico con células progenitoras distales. Estas células más adelante se diferenciarán en los neumocitos tipo II (AT2, del inglés *alveolar type II cells*), esenciales para el desarrollo de surfactante y la reparación alveolar (33). Cabe añadir, que las células epiteliales cúbicas que recubren los bronquiolos terminales son clave en la secreción del líquido pulmonar fetal, un fluido similar al líquido amniótico, fundamental para el desarrollo adecuado de las estructuras pulmonares y la preparación para la respiración postnatal (34).

Paralelamente, las células mesenquimales empiezan a formar el cartílago y músculo liso bronquial entre las 6-8 pcw, que rodea progresivamente las vías aéreas, primero de forma continua en la región proximal y luego con una distribución discontinua en las áreas más distales (35). Estas células musculares son positivas en actina- α de musculatura lisa (α -SMA, del inglés *α -smooth muscle actine*) y genera contracciones espontáneas que, en forma de ondas peristálticas, movilizan el líquido pulmonar fetal hacia la periferia. Se cree que este mecanismo, además de distribuir el líquido pulmonar, estimula la ramificación del pulmón al inducir fuerzas de tensión en el epitelio (36). Además, el patrón de ramificación y división de las vías respiratorias en esta fase es controlado también por interacciones entre el epitelio y el mesénquima. El mesénquima bronquial,

por ejemplo, promueve la ramificación en la tráquea, mientras que el mesénquima de la tráquea inhibe esta expansión en las ramas bronquiales, lo cual resulta en una organización jerárquica del árbol respiratorio (37). En cuanto al soporte cartilaginoso de la tráquea y árbol bronquial, este comienza a formarse en las 4 pcw. Este proceso avanza a lo largo de las diferentes secciones del sistema respiratorio, alcanzando los bronquios alrededor de las 10 pcw y los bronquiolos terminales hacia las 25 pcw. A medida que se desarrolla, el cartílago proporciona la rigidez necesaria para mantener abiertas las vías respiratorias, lo que es crucial para el correcto funcionamiento del sistema respiratorio en las etapas posteriores del desarrollo (10).

En el estadio pseudoglandular, la vasculatura pulmonar continúa su desarrollo en paralelo con el de las estructuras respiratorias, tal como se ha descrito en el estadio embrionario. De esta manera, el sistema vascular crece y se ramifica en torno a los bronquios y bronquiolos en desarrollo. Las arterias pulmonares comienzan a formarse siguiendo un patrón de ramificación similar al de las vías respiratorias, pero sin alcanzar todavía las regiones más distales por lo que la capacidad de respiración aún no se establece en esta fase (24).

1.2.3. Estadio canalicular

En el estadio canalicular, que se inicia aproximadamente a las 16 pcw, el pulmón experimenta cambios morfológicos significativos que establecen las bases para el intercambio gaseoso postnatal. Durante esta etapa, ocurre una intensa ramificación epitelial, en la que cada bronquiolo terminal origina varios bronquiolos respiratorios, los cuales, hacia el final del estadio, se dividen en los conductos alveolares y dan paso a los primeros sacos alveolares (38). Paralelamente, el diámetro interno de los bronquios y de los bronquiolos terminales se expande hacia los espacios aéreos, proceso en el cual el mesénquima circundante comienza a adelgazarse y prepararse para su integración con la red capilar (39).

A las 20 pcw, el epitelio cuboidal de las vías aéreas distales presenta una disminución en el número de células ciliadas y experimenta una diferenciación crucial con la aparición de AT2 y de neumocitos tipo I (AT1, del inglés *alveolar type I cells*) (**Figura 3b**) (40). Las AT2, que presentan una morfología cúbica, contienen en su citoplasma orgánulos especializados que almacenan y secretan el surfactante. Este compuesto, que previene el

colapso alveolar tras el nacimiento, inicia su producción entre las 20 y 22 pcw, aunque al principio solo se encuentra en cantidades mínimas y no alcanza concentraciones adecuadas hasta el final de la gestación (19). Otra característica de las AT2 es el papel que desempeñan en la producción de iones y agua, lo que ayuda a mantener hidratado el árbol bronquial, además de generar antioxidantes y moléculas defensivas (41). Asimismo, poseen características de células progenitoras, lo que les permite diferenciarse en AT1, que se distinguen por su forma aplanada. Estas últimas recubren gran parte de la superficie alveolar y tienen una membrana plasmática muy delgada, lo que las hace esenciales para la formación de la barrera aire-sangre, facilitando así un intercambio gaseoso eficiente (42).

La condensación del mesénquima es otro fenómeno notable de este estadio, producto tanto del crecimiento de las vías respiratorias como de la apoptosis programada. Esta reducción en el número de células mesenquimales contribuye a la transformación del mesénquima en una estructura tridimensional laxa, que con el tiempo se adapta para alojar la red vascular y permitir el paso eficiente de aire y sangre (43). Además, en las 24 pcw el cartílago y las glándulas submucosas se extienden a lo largo de las vías respiratorias, similar a lo que ocurre en el adulto (44).

El cambio más significativo en el estadio canalicular es el desarrollo de redes capilares alrededor de las vías aéreas distales y su progresivo acercamiento al epitelio alveolar. Esta cercanía, que ocurre alrededor de las 23 pcw, facilita la formación de la barrera aire-sangre, permitiendo que los capilares penetren y establezcan contacto estrecho con las AT1 (45). La intensa angiogénesis en esta fase da lugar a una alta densidad capilar en torno a las estructuras epiteliales, lo cual es un requisito fundamental para la oxigenación eficiente del organismo en la etapa postnatal. Por esta razón, aunque los neonatos que nacen antes de las 20 pcw raramente sobreviven, aquellos nacidos en las últimas semanas de este estadio tienen una mayor probabilidad de sobrevivir debido a la presencia de los sacos terminales de pared delgada, los alveolos primitivos y la vascularización del tejido, permitiendo una cierta capacidad para el intercambio gaseoso (46).

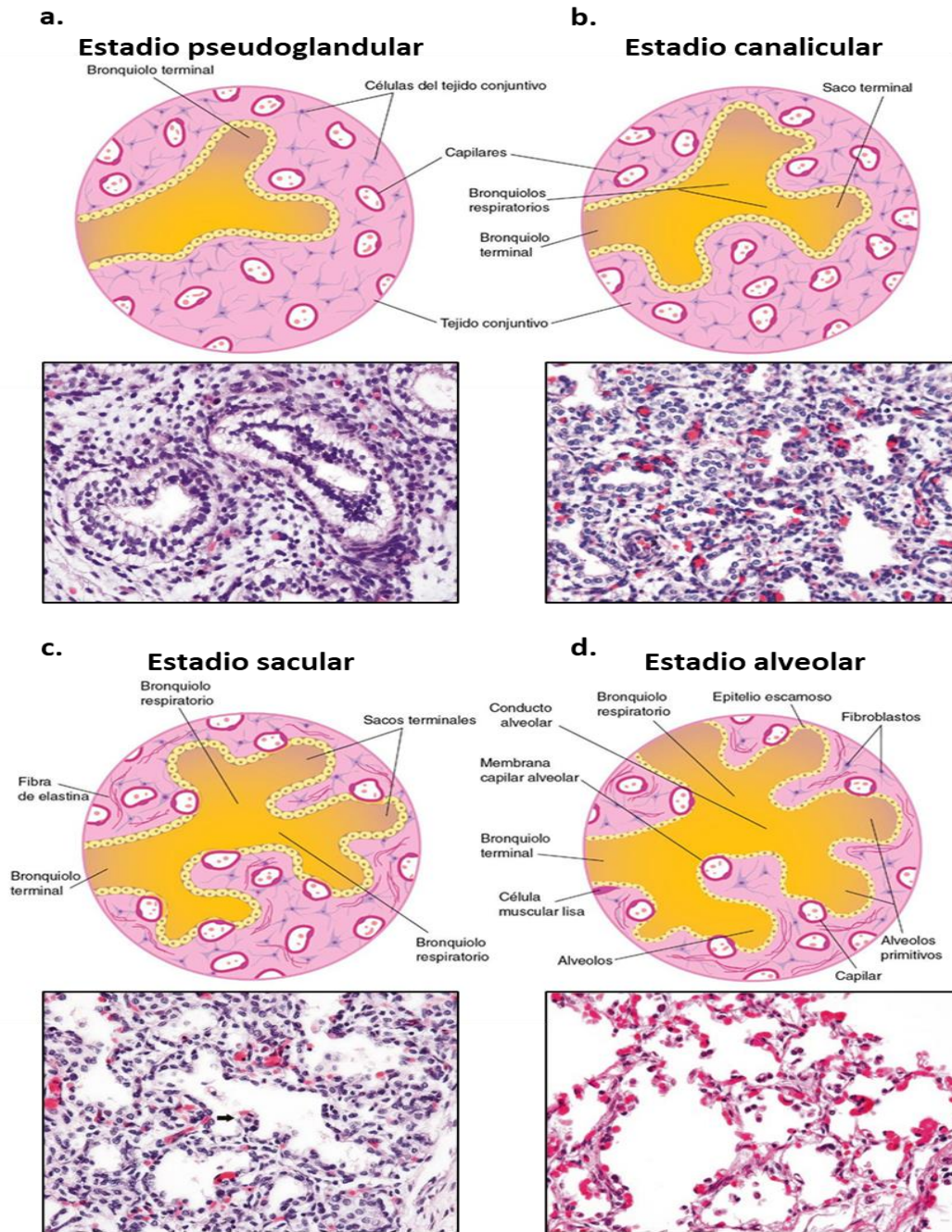


Figura 3. Ilustraciones e imágenes histológicas de hematoxilina-eosina que muestran los últimos cuatro estadios del desarrollo pulmonar. a. El estadio pseudoglandular se caracteriza por la presencia de túbulos revestidos por epitelio pseudoestratificado en las vías proximales y epitelio columnar simple en las regiones más distales. **b.** El estadio canalicular se distingue por un epitelio cúbico simple, acompañado por el desarrollo de una red capilar primitiva que comienza a aproximarse al epitelio respiratorio. **c.** En el estadio sacular aparecen los sacos terminales, revestidos por un epitelio delgado que facilitará el intercambio gaseoso. **d.** En el estadio alveolar los alveolos maduros están revestidos por epitelio simple y presenta una abundante red capilar que rodea estrechamente las paredes alveolares, optimizando el intercambio gaseoso. Imágenes obtenidas de (19, 28).

1.2.4. Estadio sacular

Entre las 26 y 28 pcw comienza el estadio sacular, una fase en la que la formación de las vías aéreas está casi completa. Durante este periodo, el pulmón experimenta un crecimiento y desarrollo significativo, ya que las vías aéreas se expanden y los túbulos acinares se dilatan, lo que lleva a la formación de sacos terminales de paredes delgadas (47) (**Figura 3c**). Estos sacos son responsables de dar lugar a la última generación de vías aéreas, que incluye los conductos alveolares y los sacos alveolares en la periferia del pulmón. Además, la expansión de los espacios respiratorios durante este estadio produce una condensación del mesénquima, lo cual permite la formación de septos primarios en las zonas donde dos espacios aéreos se encuentran. Estos septos primarios contienen redes capilares de doble capa separadas por una delgada capa central de mesénquima condensado, que forma un núcleo de tejido conectivo. La mayor parte de la superficie de los septos está cubierta por AT1, mientras que el resto de la superficie es ocupado por AT2 (48, 49).

Un cambio importante en este estadio es el incremento de la diferenciación de las AT2 a las AT1, junto con un aumento en la cantidad de cuerpos lamelares de los AT2, que almacenan surfactante. Tras esta diferenciación, los cuerpos lamelares generan mielina tubular, la cual se distribuye en los espacios aéreos y se considera un marcador del surfactante almacenado (50). La producción de surfactante aumenta de manera gradual en el parénquima pulmonar y, hacia las 30 pcw, comienza a secretarse en el lumen de las vías aéreas, cubriendo así las superficies alveolares. Además, se produce un aumento en los niveles de cortisol fetal, que es fundamental para madurar los pulmones para el intercambio gaseoso después del nacimiento. Este incremento de cortisol favorece la síntesis y liberación de surfactante, facilita el remodelado del tejido pulmonar, impulsa la diferenciación de las células epiteliales alveolares y contribuye a la reabsorción del líquido presente en los pulmones (51, 52).

Durante esta fase, las células precursoras del músculo liso migran hacia los septos primarios y comienzan a formar una red de fibras elásticas y de colágeno, esencial para la futura alveolarización (53). Simultáneamente, al igual que ocurre en el estadio canalicular, los vasos sanguíneos continúan creciendo en longitud y diámetro, incrementando la densidad capilar alrededor de los sacos terminales. Este crecimiento vascular permite que las redes capilares se posicionen cerca de las superficies epiteliales

en desarrollo, promoviendo la formación de una barrera aire-sangre cada vez más eficiente para el intercambio de gases (54).

1.2.5. Estadio alveolar

Aunque al nacer ya se completa el número de generaciones de vías respiratorias, se estima que aproximadamente el 95% de los alveolos maduros se desarrollan después del nacimiento, lo que abarca el estadio alveolar. Este estadio comienza en el momento en el que se generan los alveolos definitivos, a partir de las 32 pcw. Al inicio del estadio, cada bronquiolo respiratorio finaliza en un conjunto de sacos alveolares de pared fina, separados entre sí por un tejido conjuntivo laxo (55) (**Figura 3d**). Para generarse los alveolos definitivos, se lleva a cabo un proceso de dos fases.

La primera fase, conocida como alveolarización clásica, abarca desde las 36 pcw hasta los 2-3 años. Durante esta etapa, el crecimiento de los alveolos se produce a partir de la división y multiplicación de los sacos terminales mediante septación secundaria. Al mismo tiempo, ocurre la maduración microvascular, en la cual la doble red capilar presente en el estadio sacular se remodela y se fusiona en un único sistema capilar. Este cambio es esencial para maximizar la superficie de intercambio gaseoso, ya que permite que cada capilar esté completamente rodeado por superficies para el intercambio de gases (43). A partir de los 18 meses, aunque la tasa de crecimiento vascular disminuye, continúa en proporción al desarrollo alveolar, garantizando así una superficie adecuada para el intercambio gaseoso. Además, los movimientos respiratorios fetales, que comienzan antes del nacimiento, desempeñan un papel fundamental al generar presión y expandir los pulmones, importante para la maduración pulmonar completa (56). La segunda fase, conocida como alveolarización continua, se extiende desde los 2-4 años hasta los 8 años de edad. En esta fase, no hay un incremento tan grande en el número de alveolos, pero sí hay un aumento en el grado de maduración y un crecimiento de media. Por ello, la velocidad de formación de nuevos alveolos es mucho menor en la fase continua en comparación con la fase clásica (19, 57).

En los alveolos en desarrollo, la epitelización está a cargo las AT1 y AT2. Los primeros cubren el 90% de la superficie alveolar y, junto con las células endoteliales de los capilares, forman una barrera delgada para el intercambio gaseoso. Las AT2, que ocupan

el 10% restante, se localizan en las esquinas alveolares y son esenciales para la producción de surfactante y la regeneración de áreas epiteliales dañadas (54).

Los pulmones de recién nacidos a término cuentan con cerca de 150 millones de alveolos primitivos, aproximadamente la mitad de los que se observan en los pulmones adultos. Este hecho explica por qué los pulmones de los recién nacidos presentan una mayor densidad en las radiografías de tórax en comparación con los de adultos (19). Entre los 2 y 4 años, y hasta los 8, el número de alveolos alcanza los 300 millones, cifra que corresponde a los pulmones maduros en adultos. Algunos estudios sugieren que tanto los bronquiolos pequeños como los alveolos continúan aumentando su crecimiento hasta alrededor de los 22 años (58).

1.3. Regulación molecular del desarrollo pulmonar

El desarrollo pulmonar está regulado de forma precisa mediante interacciones moleculares y celulares entre el epitelio, de origen endodérmico y derivado del intestino anterior, y el mesénquima circundante, de origen mesodérmico. Este origen diferenciado entre ambos tejidos resulta fundamental para la morfogénesis del sistema respiratoria, ya que, desde las primeras etapas, la formación inicial del esbozo pulmonar y la ramificación de las yemas bronquiales dependen de una intensa comunicación entre las células epiteliales y mesenquimales. Esta interacción es mediada por la secreción y distribución específica de factores de crecimiento y moléculas de señalización (59).

El desarrollo inicial del esbozo pulmonar se origina en el endodermo ventral mediante la activación de TTF-1 (del inglés *thyroid transcription factor 1*), una proteína codificada por el gen *NKX2-1* (del inglés, *NK2 homeobox 1*). La expresión de *NKX2-1* define a estas células endodérmicas como precursoras del epitelio respiratorio, diferenciándolas del resto de las células del tubo digestivo (60). Esta activación es inducida principalmente por la señalización de WNT2 y WNT2B (del inglés *wingless-type MMTV integration site family member 2* y *2B*, respectivamente), factores provenientes del mesodermo ventral anterior que activan la β -catenina y dirigen la especificación del desarrollo respiratorio (61). En contraste, en la región dorsal del intestino anterior, la expresión del factor de transcripción SOX2 (del inglés *sex determining region Y-box 2*) orienta la diferenciación de las células endodérmicas hacia el esófago. La expresión de SOX2 es inhibida por BMP4 (del inglés *bone morphogenetic protein 4*), pero su señalización es neutralizada en

la región dorsal mediante la acción de proteínas inhibitoras como NOGGIN (62-64). Esta regulación permite que BMP4 concentre su efecto en la región ventral, donde refuerza la acción de WNT/ β -catenina y facilita la activación de *NKX2-1*, asegurando así la correcta formación del epitelio pulmonar (**Figura 4a**).

La morfogénesis del esbozo pulmonar durante la etapa pseudoglandular depende de la acción integrada de múltiples señales moleculares, donde FGF10 (del inglés *fibroblast growth factor 10*), juega un papel esencial. FGF10, secretado por las células mesenquimales a partir de las 10 pcw y hasta la 21, aumenta notablemente su expresión en la etapa canicular, favoreciendo la expansión y ramificación del epitelio pulmonar distal. Este factor se une a sus receptores, FGFR1 y FGFR2 (del inglés, *fibroblast growth factor 1 y 2*, respectivamente), promoviendo la formación de las estructuras tubulares que conformarán el futuro árbol bronquial (65). Para modular la actividad de FGF10 y evitar una proliferación excesiva, se activa un mecanismo de retroalimentación negativa mediado por las proteínas antagonistas SPRY1 y SPRY2 (del inglés *sprouty RTK signaling antagonist 1 y 2*, respectivamente), además de la proteína *Sonic Hedgehog* (SHH) y del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , del inglés *transforming growth factor beta*). Estas moléculas limitan la acción de FGF10, controlando tanto la dirección como el tamaño de los brotes pulmonares (66). Adicionalmente, el ácido retinoico (RA, del inglés *retinoic acid*), sintetizado en el mesénquima adyacente, también inhibe la expresión de FGF10 y es crucial para una morfogénesis pulmonar adecuada, pues su deficiencia puede causar hipoplasia traqueal y pulmonar (67). La señalización de WNT (del inglés, *wingless-type*) también desempeña un papel fundamental al promover el crecimiento tanto del epitelio como del mesénquima. WNT7B (del inglés, *wingless-type MMTV integration site family member 7B*), miembro de la familia de genes WNT, estimula la expresión de BMP4 en las células epiteliales y activa genes reguladores como *AXIN2* (del inglés, *axis inhibition protein 2*) y *LEF1* (del inglés, *lymphoid enhancer-binding factor 1*) en el mesénquima, asegurando así que el epitelio pulmonar se expanda de manera controlada mientras se establece la organización espacial, necesaria para el desarrollo adecuado de las vías respiratorias (**Figura 4b**) (68, 69).

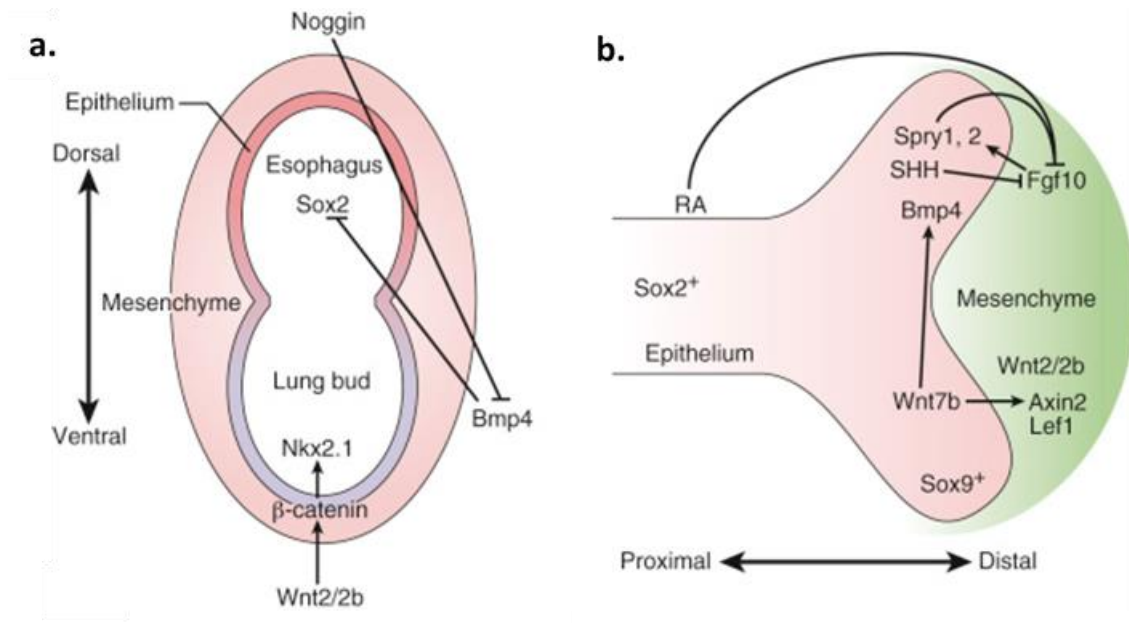


Figura 4. Principales procesos moleculares involucrados en la especificación del esbozo pulmonar y la morfogénesis de la yema pulmonar. a. Durante la formación inicial del esbozo pulmonar, NKX2-1 se expresa en el lado ventral del endodermo del intestino anterior, marcando el epitelio pulmonar. Por otro lado, SOX2 permanece restringido en el lado dorsal, asociado con la formación del esófago. NKX2-1 se activa por la β-catenina, estimulada por WNT2/2b, mientras que SOX2 es reprimido por BMP4, cuya actividad es modulada por NOGGIN. **b.** Para la ramificación de la yema pulmonar, SOX2 favorece la diferenciación proximal y SOX9 la proliferación distal. En esta región, BMP4 estimula la proliferación celular y WNT7B regula la diferenciación epitelial y mesenquimal. A su vez, WNT7B activa la expresión de AXIN2 (regulador del crecimiento) y LEF1 (controla la regulación epitelial). WNT2/2b es crucial para la especificación pulmonar y el crecimiento inicial de la yema. SHH regula la expresión de FGF10, que estimula el crecimiento del epitelio distal y es controlado por SPRY1/2. Finalmente, el RA regula la formación de las yemas y la expresión de FGF10 (70).

Durante el proceso de ramificación del desarrollo pulmonar humano, el control del patrón proximal-distal es fundamental. En la etapa pseudoglandular, SOX2 se co-expresa junto con SOX9 (del inglés, *sex determining region Y-box 9*) en las células más distales del epitelio pulmonar. A medida que avanza la fase canicular, las células en los extremos del epitelio comienzan a expresar únicamente SOX9, el cual promueve la expansión de las células progenitora distales, mientras que SOX2 deja de estar presente en esta región y se restringe a las regiones proximales, donde favorece la diferenciación. Por tanto, la expresión de SOX2 se convierte en un marcador del endodermo proximal, mientras que SOX9 identifica el endodermo distal (71).

El desarrollo de la asimetría lobular del pulmón, que resulta en dos lóbulos en el lado izquierdo y tres en el lado derecho, es fundamental para el adecuado posicionamiento y funcionalidad de los órganos que se encuentran en el tórax y el abdomen. Diversos factores han sido identificados como influyentes en este proceso de asimetría izquierda-derecha, entre los cuales se incluyen SHH, FGF8 (del inglés *fibroblast growth factor 8*), N-cadherina, activina- β y el receptor de activina IIB (ACVR2B, del inglés *activin receptor type IIB*) (72-74). Estos elementos desempeñan un papel crucial en la regulación de la expresión de NODAL, LEFTY1 y LEFTY2 (del inglés, *left-right determination factor 1 y 2*, respectivamente), que forman parte de la familia del TGF- β (75).

Entre los factores moleculares clave en la regulación de la vascularización pulmonar y en la formación de la barrera aire-sangre, destaca el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, en inglés *vascular endothelial growth factor*). VEGF actúa como señal clave para el crecimiento celular y la regulación de la permeabilidad en diversas células pulmonares (76). También, induce la producción de óxido nítrico por la enzima endotelial eNOS (del inglés *endothelial nitric oxide synthase*). Estudios en modelos animales han demostrado que la falta de eNOS conduce a un desarrollo pulmonar insuficiente, caracterizado por una menor perfusión de los capilares y una reducción en las ramas arteriales (77). La actividad de VEGF es regulada por factores inducibles por hipoxia (HIFs, del inglés *hypoxia-inducible factors*), un conjunto de proteínas transcripcionales que responden a bajos niveles de oxígeno. Los HIFs, formados por una subunidad alfa (HIF-1 α) que es inducible por hipoxia y una subunidad beta (HIF-1 β) de carácter constitutivo, modulan la expresión de VEGF en condiciones de hipoxia, favoreciendo la expansión vascular en el tejido pulmonar. Además, se ha demostrado que la hipoxia es un factor que potencia la formación de nuevos vasos en el pulmón embrionario, mientras que estudios *in vitro* sugieren que la supresión tanto de HIF-1 α como de VEGF limita el desarrollo de ramificaciones epiteliales durante el desarrollo pulmonar (78).

En conjunto, esta red de señales moleculares coordina el crecimiento y la maduración estructural de los pulmones, permitiendo un desarrollo funcional adecuado que culmina en una estructura lista para el intercambio gaseoso al nacer.

1.4. Linaje celular del epitelio pulmonar

Aunque todavía existen muchas incógnitas sobre el linaje celular en el pulmón embrionario humano, se sabe que la diferenciación celular sigue una jerarquía organizada en la que células progenitoras específicas generan y mantienen los diferentes tipos celulares que formarán el árbol bronquial. Al inicio de la etapa pseudoglandular, el epitelio de la punta (o *tip*, en inglés) de la yema bronquial presenta progenitores multipotentes que expresan SOX9 e ID2 (del inglés, *inhibitor of DNA binding 2*), los cuales se auto-renuevan durante la ramificación. Conforme el epitelio de la *tip* se ramifica, las células comienzan a diferenciarse progresivamente a lo largo de su eje proximal-distal. La expresión de SOX2⁺, SOX9⁻ marca los progenitores del epitelio proximal, aproximadamente entre las 5 y las 16 pcw. A partir de las 16 pcw, la co-expresión de SOX9 e ID2 identifica los progenitores del epitelio distal (71, 79) (**Figura 5**).

Las células progenitoras proximales SOX2⁺, localizadas en la región superior de las vías respiratorias en desarrollo, dan origen a varios tipos celulares que formarán las estructuras respiratorias. Entre estas se encuentran las células neuroendocrinas (ASCL1⁺, del inglés *achaete-scute family BHLH transcription factor 1*), las basales (TP63⁺, del inglés *tumor protein 63*) y las ciliadas (FOXJ1⁺, del inglés *forkhead box J1*) (80). Las células neuroendocrinas son las primeras células epiteliales en diferenciarse, apareciendo aproximadamente en las 5 pcw. Aunque representan una pequeña proporción del epitelio respiratorio, cumplen funciones esenciales, como la detección de bajos niveles de oxígeno en el aire inhalado y la capacidad de contribuir a la regeneración del epitelio respiratorio al diferenciarse en otros tipos celulares (81). Posteriormente, las células basales comienzan a diferenciarse en la semana 9, seguidas por las células ciliadas en las 11 pcw. Estudios recientes mediante *single-cell RNA-sequencing* (scRNA-seq) (82) han identificado en las 9 pcw la presencia de un tipo específico de células progenitoras secretoras proximales (SCGB3A2⁺, del inglés *secretoglobin 3A2*; CYTL1⁺, del inglés *cytokine-like 1*) las cuales desaparecen después de las 11 pcw. Estas progenitoras secretoras proximales se diferencian hacia dos poblaciones: células secretoras proximales (SCGB3A2⁺; MUC5B⁺, del inglés *mucin 5B*) y células Club (SCGB3A2⁺; SCGB1A1⁺, del inglés *secretoglobin 1A1*). Las células secretoras proximales aparecen a partir de las 11 pcw y se cree que dan lugar a las células caliciformes. Las células Club, por otro lado,

surgen alrededor de las 15 pcw y tienen un papel en la secreción de proteínas, como SCGB1A1, que ayudan a formar el fluido epitelial de las vías respiratorias, contribuyendo así a la captura de partículas y microorganismos inhalados. Además, estas células club actúan como progenitoras para otros tipos celulares de las vías proximales como las células ciliadas (83). Los procesos de diferenciación y especialización en el epitelio proximal son regulados por vías de señalización, como WNT, BMP (del inglés, *bone morphogenetic protein*) y NOTCH, las cuales guían la identidad celular y su organización espacial, permitiendo que el epitelio proximal desarrolle las funciones específicas para la conducción del aire (64).

Las células progenitoras distales, ubicadas en las puntas (o *tips*, en inglés) del árbol bronquial, expresan SOX9 e ID2, dos marcadores clave para el desarrollo y crecimiento del tejido alveolar (84). A medida que el desarrollo avanza hacia las fases canicular y sacular, estas células comienzan a diferenciarse en AT2 (SFTPC⁺, del inglés *surfactant protein C*; NAPSA⁺, del inglés *napsin A*) las cuales se hacen visibles a partir de las 15 pcw y se hacen más abundantes en las 22 pcw. Estas células más tarde pueden diferenciarse en AT1 (AQP5⁺, del inglés *aquaporin-5*; PDPN⁺, del inglés *podoplanin*), comenzando a aparecer en las 18 pcw y predominando en las 22 pcw (82). Las células AT2 contienen unos orgánulos especializados llamados cuerpos lamelares, donde almacenan y secretan las proteínas del surfactante pulmonar. Estas proteínas incluyen SFTPA, SFTPB, SFTPC y SFTPD (del inglés *surfactant protein A, B and D*). SFTPA y SFTPD son proteínas grandes e hidrofílicas, implicadas en la defensa del huésped contra patógenos, mientras que SFTPB y SFTPC, más pequeñas e hidrofóbicas, son críticas en la distribución y función del surfactante en la superficie alveolar (85-87). SFTPC es específica de las células AT2 y sirve como marcador distintivo de este tipo celular. Asimismo, otra proteína característica de AT2 es NAPSA, implicada en el procesamiento de los precursores proteicos que componen el surfactante (88). Por otra parte, en las AT1 podemos destacar dos proteínas, AQP5, que actúa como un canal de agua crucial para mantener la homeostasis de líquidos en los alveolos, contribuyendo al intercambio gaseoso y al control de la humedad; y PDPN, proteína de membrana involucrada en la formación y mantenimiento de la estructura alveolar (71). Cabe añadir, que se ha demostrado que varios factores de transcripción como TTF-1, FOXA2 (del inglés *forkhead box protein A2*) y GATA-6 (del inglés, *GATA-binding factor 6*) influyen en la transcripción de los genes *SFTPA*, *SFTPB* y *SFTPC*. FGF10, además, juega un papel

importante en la proliferación y expansión de los progenitores epiteliales distales mediante la regulación de SOX9, impulsando el crecimiento alveolar en las fases finales del desarrollo pulmonar (89, 90).

Durante las etapas postnatales, se identifica otro tipo de célula madre en el pulmón, las células madre bronquioalveolares (BASCs, del inglés *bronchioalveolar stem cells*), localizadas en la región alveolar. Estas células expresan los marcadores SCGB1A1 y SFTPC y poseen la capacidad de diferenciarse tanto en AT2 como en células Club. Sin embargo, su origen aún no se ha definido con claridad (91).

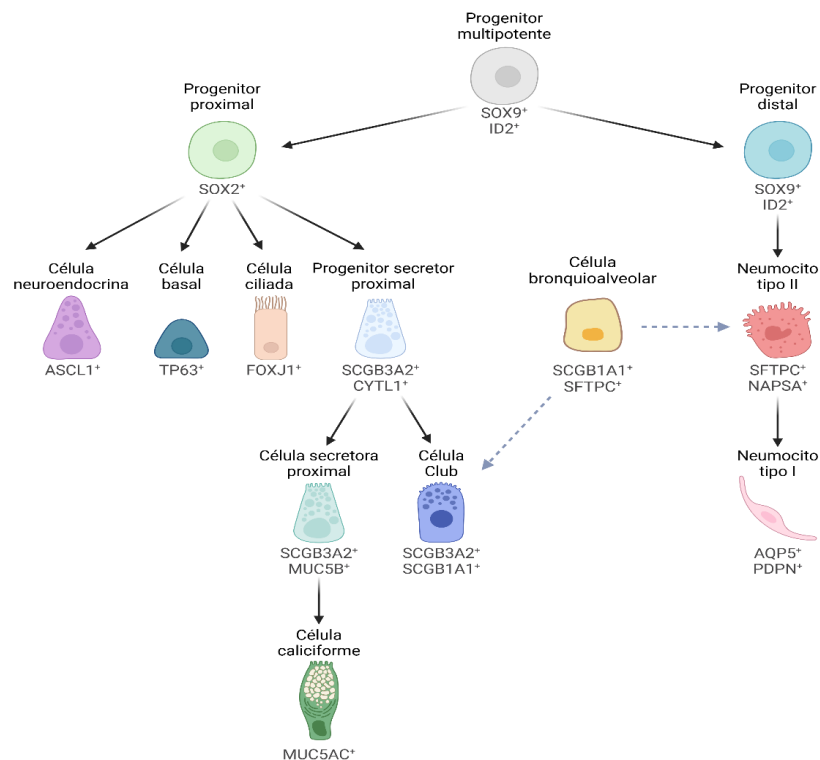


Figura 5. Representación del linaje celular durante el desarrollo pulmonar humano. La célula progenitora multipotente inicial (SOX9⁺, ID2⁺) da lugar a dos progenitores diferenciados: el proximal (SOX2⁺, SOX9⁺) y el distal (SOX9⁺, ID2⁺). El progenitor proximal se especializa en células del epitelio respiratorio como neuroendocrinas (ASCL1⁺), basales (TP63⁺) y ciliadas (FOXJ1⁺), y genera un progenitor secretor proximal (SCGB3A2⁺, CYTL1⁺). Este progenitor, se diferencia en células Club (SCGB3A2⁺, SCGB1A1⁺) y en células secretoras proximales (SCGB3A2⁺, MUC5B⁺), las cuales dan lugar a su vez a las células caliciformes (MUC5AC⁺). El progenitor distal da lugar a los neumocitos tipo II (SFTPC⁺, NAPSA⁺), que se diferencian en neumocitos tipo I (AQP5⁺, PDPN⁺). En el pulmón adulto, también se encuentran células bronquioalveolares (SCGB1A1⁺, SFTPC⁺) que pueden generar células club y AT2, aunque el progenitor celular de estas células en humanos aún no se ha identificado. Figura generada a partir de la información obtenida de (71, 82) y creada con BioRender.com.

2. El cáncer de pulmón

2.1. Epidemiología

El cáncer de pulmón se sitúa entre las enfermedades oncológicas más comunes y mortales a nivel mundial. En 2020, se reportaron aproximadamente 2.2 millones de nuevos casos y 1.8 millones de fallecimientos asociados (92). De acuerdo con los datos recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer de pulmón es el segundo cáncer más diagnosticado a nivel global, solo superado por el cáncer de mama. Aunque esta enfermedad afecta principalmente a hombres, quienes presentan una tasa de incidencia más alta (21% frente al 13% en mujeres), la brecha de género ha comenzado a reducirse en algunos países debido al aumento de tabaquismo entre mujeres, especialmente en regiones de altos ingresos (93). En términos de mortalidad, el cáncer de pulmón es la causa principal de muerte oncológica en hombres y la segunda en mujeres, tras el cáncer de mama (94). La letalidad se debe, en gran parte, a que se suele diagnosticar en etapas avanzadas, lo que reduce la tasa de supervivencia a cinco años a un rango del 7% al 25%, notablemente inferior al de otros tipos de cáncer (**Figura 6**).

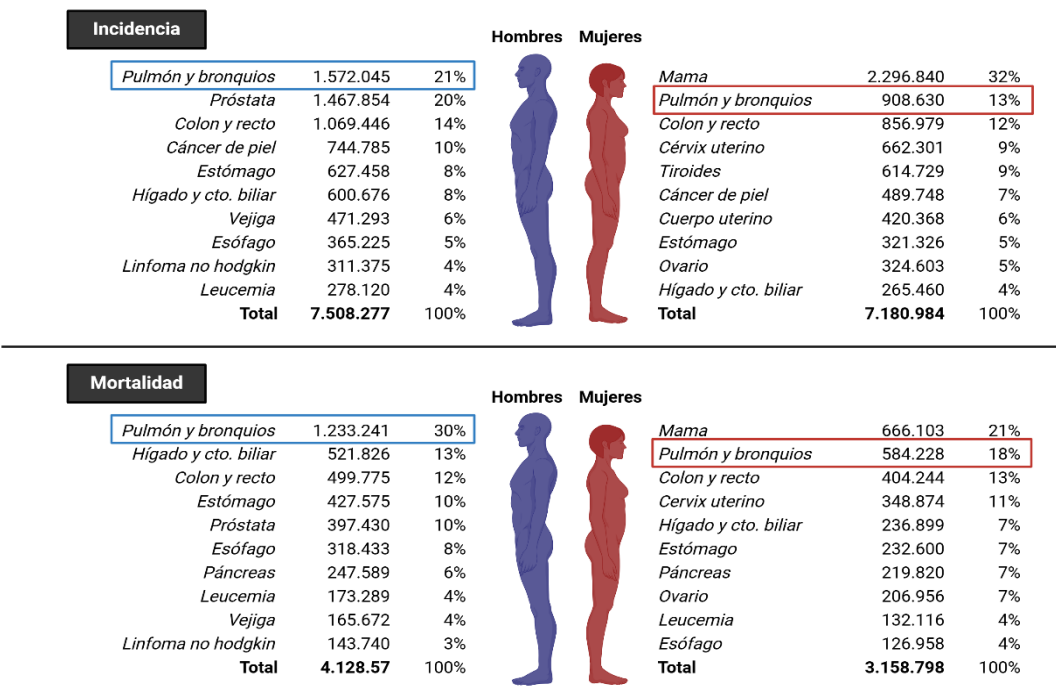


Figura 6. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en hombres y mujeres. En hombres, el cáncer de pulmón lidera tanto en incidencia (21 %) como en mortalidad (30 %), mientras que en mujeres ocupa el segundo lugar en incidencia (13 %) y en mortalidad (18 %). Figura generada a partir de los datos extraídos de la web de Globocan (2022) y creada con BioRender.com.

Este cáncer también presenta una distribución desigual a nivel mundial, con tasas de incidencia y mortalidad que son entre tres a cuatro veces más elevadas en países con un alto índice de desarrollo humano. En estos países, como Estados Unidos, Reino Unido y Australia, las tasas de incidencia de cáncer de pulmón han comenzado a disminuir gracias a políticas antitabaco, programas de detección temprana y avances en tratamientos. Sin embargo, en países de ingresos bajos y medianos, la incidencia sigue en aumento. Factores como el envejecimiento de la población, el incremento en el consumo del tabaco y la exposición a contaminantes impulsan esta tendencia, convirtiendo al cáncer de pulmón en una de las principales preocupaciones sanitarias en estas regiones (95)

2.2. Factores de riesgo

La etiología del cáncer de pulmón está estrechamente ligada a factores ambientales y de estilo de vida, siendo el consumo de tabaco el principal factor de riesgo. El tabaquismo eleva el riesgo de desarrollar esta enfermedad entre 10 y 30 veces, en relación proporcional a la cantidad de cigarrillos consumidos y los años de exposición acumulados (96). En países desarrollados, la reducción en el consumo de tabaco tras la implementación de políticas públicas antitabaco ha resultado en una disminución gradual de la incidencia de cáncer de pulmón. En contraste, en países de ingresos medios u bajos, donde el consumo de tabaco se mantiene constante, la incidencia sigue aumentando (97).

El humo del tabaco contiene una mezcla de más de 7000 compuestos químicos, de los cuales al menos 250 son reconocidos como dañinos y más de 70 están clasificados por la OMS como carcinógenos. Entre estos compuestos destacan los hidrocarburos policíclicos, las nitrosaminas y los metales pesados como el arsénico y el níquel (98). Cada uno de estos elementos contribuye al daño de las células al provocarles alteraciones al ADN (ácido desoxirribonucleico), inflamación crónica y estrés oxidativo, favoreciendo su transformación maligna. La exposición pasiva al humo del tabaco también se asocia con un mayor riesgo de cáncer de pulmón, especialmente en personas expuestas de manera habitual en el hogar o en el lugar de trabajo, donde el riesgo puede aumentar entre un 23 y 30%. Además, estudios indican que la exposición durante la infancia podría estar relacionada con una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de pulmón en etapas posteriores de la vida (99).

Además del tabaco, otros factores ambientales influyen en el riesgo de cáncer de pulmón. La exposición prolongada a sustancias como el radón, asbesto y ciertos metales y la contaminación del aire incrementan el riesgo. El radón es un gas radioactivo de origen natural, producto de la descomposición del uranio presente en el suelo y las rocas. Este compuesto puede infiltrarse en los edificios desde el subsuelo y representa la segunda causa de cáncer de pulmón en personas no fumadoras, especialmente en zonas donde se han utilizado materiales de construcción con altos niveles de radón (100). La exposición laboral a agentes carcinógenos industriales, como derivados de alquitrán y hollín, también eleva el riesgo en trabajadores expuestos durante largos períodos.

Las predisposiciones genéticas también juegan un papel significativo. Las personas con antecedentes familiares de cáncer de pulmón presentan un riesgo 1.7 veces mayor de desarrollarla, independientemente de factores como el tabaquismo. Esto podría deberse a variantes genéticas heredadas que afectan la reparación del ADN o aumentan la susceptibilidad a los carcinógenos (101). Estudios de asociación de genoma completo (GWAS, del inglés *genome-wide association study*) han identificado regiones cromosómicas relacionadas con un riesgo elevado de cáncer de pulmón, como 5p15, 15q25-26 y 6q21 (102). Asimismo, el desarrollo del cáncer de pulmón implica mutaciones genéticas que promueven el crecimiento del tumor o desactivan genes que normalmente suprimen el cáncer. Estas mutaciones varían entre regiones y poblaciones como, por ejemplo, las mutaciones en el gen *EGFR* (del inglés, *epidermal growth factor receptor*) son más comunes en Asia oriental (38–50%) que en América (24%) o Europa (14%), siendo particularmente más frecuentes en mujeres y en personas no fumadoras. Otras mutaciones comunes en personas no fumadoras son *ALK* (del inglés, *anaplastic lymphoma kinase*), *ROS1* (del inglés, *ROS proto-oncogene 1*) y *ERBB2* (del inglés, *erythroblastic leukemia viral oncogene homolog*), mientras que mutaciones en el gen *KRAS* (del inglés, *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) predominan en fumadores, especialmente en Estados Unidos (25%) en comparación con China (8%) (94).

Finalmente, el cáncer de pulmón presenta factores de riesgo asociados a otras enfermedades. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), causada frecuentemente por el tabaquismo, es un factor de riesgo independiente para el cáncer de pulmón, aumentando hasta seis veces el riesgo debido a la inflamación crónica y el estrés

oxidativo que caracterizan esta condición (103). Asimismo, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) incrementa entre dos y cinco veces el riesgo de cáncer de pulmón, influido por la inmunosupresión crónica y la inflamación pulmonar (104).

2.3. Clasificación histopatológica del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es una enfermedad altamente heterogénea, dividida en dos tipos principales según la célula de origen y la histología: el cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP), que representa el 15-25% de los casos, y el cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP), que constituye el 75-85% del total (105, 106). Esta distinción es fundamental, ya que existen diferencias significativas entre ambos tipos en cuanto a su velocidad de crecimiento, diseminación y respuesta a los tratamientos.

2.3.1. Cáncer de pulmón de célula pequeña

El CPCP es clasificado como un carcinoma neuroendocrino de alto grado y pobremente diferenciado, que se presenta principalmente en personas fumadoras o ex fumadoras. Se le considera altamente agresivo y de pronóstico desfavorable debido a su rápida proliferación y a alta capacidad para diseminarse, lo que complica su tratamiento. En estudios de imagen, el CPCP suele manifestarse como una masa central en el pulmón, frecuentemente acompañada de ganglios linfáticos torácicos de gran tamaño (107). La gran mayoría de los pacientes presenta metástasis a distancia al momento del diagnóstico, afectando con frecuencia órganos como el cerebro, el hígado, las glándulas suprarrenales y los huesos. Esta elevada agresividad también se refleja en la alta concentración de células tumorales circulantes (CTCs) en sangre, una de las mayores entre los tumores sólidos (108).

Desde una perspectiva histopatológica, el CPCP se divide en dos subtipos según la clasificación de la OMS: el CPCP puro, que representa aproximadamente el 80% de los casos, y el CPCP combinado (incluye características de otros subtipos de CPCNP), que constituye el 20% restante (109). Las células tumorales en este tipo de cáncer presentan características distintivas: son pequeñas y adoptan formas redondeadas, ovaladas o fusiformes, con núcleos que muestran una cromatina finamente granular, nucleolos poco visibles o ausentes y citoplasma escaso (**Figura 7a**). Estas células suelen expresar gránulos neuroendocrinos, un rasgo característico de este tipo de tumor. Los marcadores comúnmente utilizados para su diagnóstico son la cromogranina A (CHGA, del inglés

chromogranin A), la sinaptofisina (SYP, del inglés synaptophysin), el CD56 (del inglés, *cluster of differentiation 56*) y el TTF-1 (110) (**Figura 7b**).

En cuanto al tratamiento, los pacientes en estadios iniciales o con enfermedad localmente avanzada suelen recibir quimioterapia con cis-platino combinada con radioterapia, ya que suelen responder bien en una primera fase a las terapias citotóxicas. En estadios metastásicos, se utilizan tratamientos sistémicos, incluyendo inmunoterapia combinada con quimioterapia, logrando tasas de respuesta iniciales superiores al 60%, aunque generalmente temporales. La supervivencia media en pacientes con estadios temprano es inferior a dos años, mientras que en aquellos con enfermedad metastásica suele ser en torno a un año (111, 112).

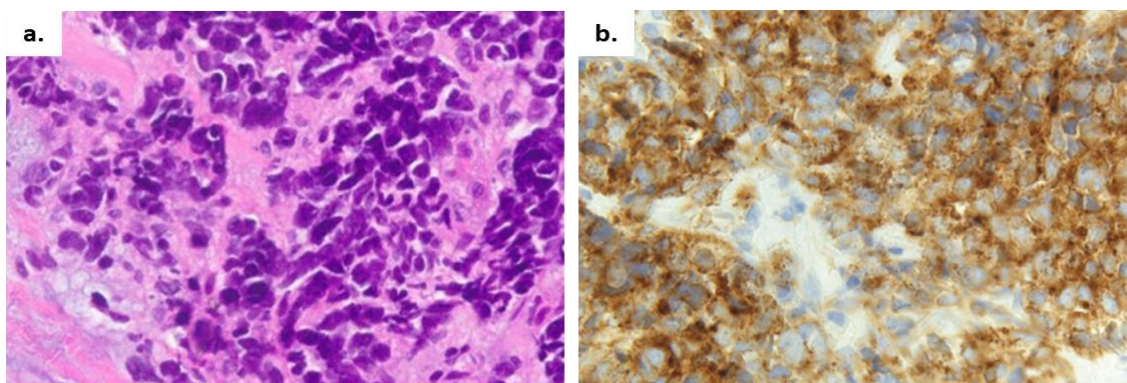


Figura 7. Imágenes histológicas de un tejido de carcinoma de células pequeñas. a. Tinción de hematoxilina-eosina (110). **b.** Expresión positiva de sinaptofisina (113).

2.3.2. Cáncer de pulmón de célula no pequeña

Dentro del CPCNP se distinguen varios subtipos específicos, siendo el adenocarcinoma el más frecuente, con aproximadamente el 60% de los casos, seguido del carcinoma de células escamosas, que representa alrededor del 20%. Existen también subtipos menos comunes, como el carcinoma de células grandes, el tumor carcinoide y el carcinoma adenoescamoso (114).

Adenocarcinoma

El adenocarcinoma es un tipo de neoplasia maligna epitelial que tiende a desarrollarse en las vías aéreas más distales. Aunque se suele relacionar frecuentemente con la exposición crónica a carcinógenos como el humo del tabaco, se considera más común en personas no fumadoras o con baja exposición a agentes cancerígenos, representando entre el 15% y el 20% de los casos. Esta incidencia se atribuye a una combinación de factores

genéticos y ambientales. El adenocarcinoma suele manifestarse como masas periféricas con fibrosis central y retracción pleural, aunque también puede presentar otras apariencias, como masas centrales, consolidación lobar difusa, etc. (115).

En el análisis microscópico, el adenocarcinoma presenta una diferenciación glandular y producción de mucina, y presenta una notable heterogeneidad celular, con diversos patrones histológicos que en ocasiones se combinan en un mismo tumor (**Figura 8a**). Entre estos patrones, se incluyen los siguientes subtipos (114, 116):

- Adenocarcinoma lepidico: se presenta bien diferenciado y compuesto por neumocitos tipo II. Crece a lo largo de las estructuras alveolares preexistente y puede mostrar un engrosamiento de los septos alveolares.
- Adenocarcinoma acinar: se encuentra moderadamente diferenciado, con una estructura glandular caracterizada por un lumen central rodeado de células tumorales, asentadas en un estroma fibroelástico. Es uno de los patrones más comunes en el adenocarcinoma.
- Adenocarcinoma papilar: se caracteriza por una diferenciación moderada, con células neoplásicas que crecen a lo largo de un núcleo fibrovascular, formando una arquitectura papilar.
- Adenocarcinoma micropapilar: tumor con un crecimiento en pequeños nidos papilares sueltos, sin núcleo fibrovascular.
- Adenocarcinoma sólido: forma grandes grupos de células tumorales con escasa separación entre ellas, sin dar lugar a ningún patrón establecido, ni lepidico, acinar, papilar o micropapilar.
- Adenocarcinoma coloide: se caracteriza por secretar abundante mucina que rellena los espacios aéreos.
- Adenocarcinoma fetal: su estructura histológica es similar al tejido pulmonar fetal, y su diferenciación puede ser de bajo o alto grado.
- Adenocarcinoma entérico: histológicamente parecido al adenocarcinoma colorrectal.
- Adenocarcinoma invasivo mucinoso: este subtipo se caracteriza por células de tipo columnar o caliciforme con abundante mucina dentro del citoplasma.

- Adenocarcinoma mínimamente invasivo: tumores solitarios pequeños que presentan un crecimiento de células neoplásicas alrededor de estructuras alveolares en un patrón lepidico predominante.
- Adenocarcinoma in situ: tipo de tumor no mucinoso, que crece a lo largo de estructuras alveolares preexistentes, sin invasión estromal ni vascular, y con un patrón lepidico puro.

Este tipo de tumores expresa biomarcadores característicos de las estructuras alveolares, como TTF-1 y NAPSAs, los cuales están presentes en más del 85% de los casos (**Figura 8b**). Por lo general, el adenocarcinoma es negativo para los marcadores específicos de células escamosas, como P40 (isoforma de la proteína P63) y CK5/6 (del inglés, *cytokeratin 5 y 6*), por lo que se emplean para diferenciar entre adenocarcinomas y carcinomas de células escamosas (117). Su progresión a menudo está relacionada con lesiones premalignas, como la hiperplasia adenomatosa atípica. Aunque se han desarrollado tratamientos innovadores, como la inmunoterapia y las terapias dirigidas, el adenocarcinoma de pulmón continúa teniendo un mal pronóstico. La tasa de supervivencia a cinco años sigue siendo baja, en torno al 15% debido en gran parte a los diagnósticos en etapas avanzadas y a la resistencia de estos tumores, ya sea innata o adquirida, frente a los tratamientos (118).

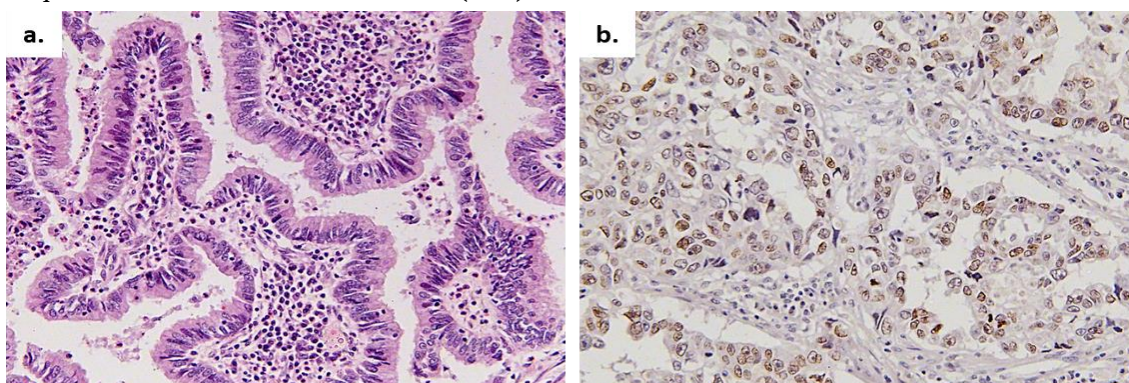


Figura 8. Imágenes histológicas de un tejido de adenocarcinoma. a. Tinción de hematoxilina-eosina **b.** Expresión positiva de TTF-1. Imágenes originales

Carcinoma de células escamosas

El carcinoma de células escamosas destaca por originarse a lo largo de las vías respiratorias, en los bronquios principales o lobares y puede formar cavidades en el tejido pulmonar al alcanzar grandes tamaños. Su incidencia ha disminuido en las últimas décadas, posiblemente debido a una disminución en los patrones de consumo de tabaco (119).

Histológicamente, este tipo de neoplasia maligna presenta queratinización y puentes intercelulares, con un patrón sólido de crecimiento en forma de nidos. Las células tumorales tienden a mostrar núcleos densamente teñidos, con nucleolos visibles o poco prominentes y un citoplasma con una densidad de moderada a abundante (**Figura 9a**). Las células escamosas en este tipo de carcinoma se caracterizan por presentar uniones intercelulares, también conocidas como desmosomas, así como la queratinización, ya sea de forma individual o en agrupaciones. Esta queratinización de sus células da lugar a la formación de "perlas de queratina" en el centro de los nidos tumorales. A diferencia de otros tipos de carcinoma, estas células no presentan estructuras glandulares ni producen mucina (120, 121).

El carcinoma de células escamosas se clasifica a su vez en tres subtipos: queratinizante, no queratinizante y basaloide. Esta subclasificación generalmente no influye en el pronóstico, con la excepción del subtipo basaloide, que suele tener una menor diferenciación y un patrón lobular con bordes en empalizada. Aunque pierde en parte las características morfológicas escamosas, mostrando una apariencia pseudoglandular, este subtipo puede confirmarse mediante marcadores inmunohistoquímicos que indican su origen escamoso. Además, se asocia con una resistencia intrínseca a la quimioterapia por su perfil molecular, lo que conlleva un peor pronóstico (122).

En el diagnóstico inmunohistoquímico, los marcadores más comunes son P40 y CK5/6, mientras que TTF-1 y NAPSA suelen ser negativos en este tipo de tumor (**Figura 9b**). Si bien el carcinoma de células escamosas tiene en general una tasa de supervivencia mejor que el adenocarcinoma, su pronóstico depende de factores como el grado de diferenciación celular y la presencia de componentes basaloides (109).

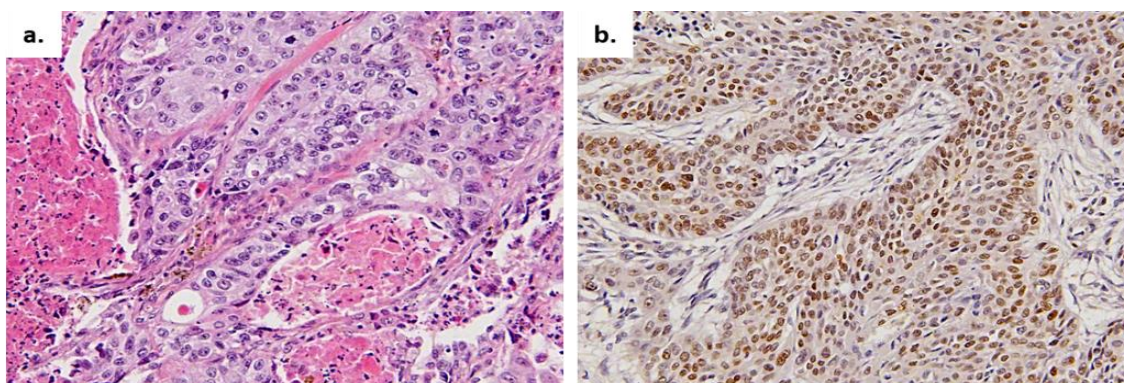


Figura 9. Imágenes histológicas de un tejido de carcinoma de células escamosas. a. Tinción de hematoxilina-eosina. **b.** Expresión positiva de P40. Imágenes originales

Otros subtipos menos comunes

El CPCNP incluye varios subtipos menos comunes, cada uno con características distintivas y comportamientos clínicos variados. Uno de estos subtipos es el carcinoma de células grandes, que se caracteriza por su falta de diferenciación y la ausencia por histología o inmunohistoquímica de diferenciación de células escamosas, glandulares o de células pequeñas (**Figura 10a**). Aunque suele ser positivo para citoqueratinas, se presenta negativo para TTF-1 y P40 (109) (**Figura 10b**).

Otro subtipo menos frecuente es el carcinoma neuroendocrino de células grandes, que se distingue por la presencia de células malignas de origen neuroendocrino. Este tipo de carcinoma tiene es más agresivo y se asocia con un pronóstico desfavorable, mostrando expresión de los marcadores distintivos de los carcinomas neuroendocrinos, como CHGA, SYP y CD56 (123).

El tumor carcinoide también está agrupado dentro de las neoplasias de origen neuroendocrino. Este tipo de tumor se presenta con mayor frecuencia en pacientes relativamente jóvenes entre los 45 y 55 años, y generalmente se diagnostican en etapas tempranas. Además, dentro de los tumores carcinoides se pueden encontrar dos clases, típicos y atípicos (124). El tumor carcinoide típico se caracteriza por ser bien diferenciado, presentar una baja tasa de proliferación y no presentar necrosis tumoral. Las células tumorales suelen organizarse en nidos, mostrando disposiciones trabeculares, insulares, en cintas y en rosetas (**Figura 10c**). Además, al presentar un crecimiento más lento, tienen un pronóstico generalmente favorable. En contraste, el tumor carcinoide atípico presenta características más agresivas y un comportamiento maligno más marcado, lo que resulta en una tasa de supervivencia inferior en comparación a su contraparte típica. Las características que los diferencian de los típicos incluyen una tasa intermedia de proliferación y/o la presencia de necrosis focal y puntual. Ambos subtipos son positivos para los marcadores CHGA, SYP y CD56 (125) (**Figura 10d**).

El carcinoma adenoescamoso es un subtipo raro de carcinoma, pues se diagnostica en menos del 5% de todos los casos de cáncer de pulmón. Se trata de un carcinoma intermedio que presenta características tanto del adenocarcinoma como del carcinoma de células escamosas, ya que puede contiene elementos glandulares y escamosos (**Figura 10e**). Cada componente debe constituir al menos el 10% del tumor, y en inmunohistoquímica, es positivo para los marcadores de adenocarcinoma y escamoso,

TTF-1, NAPSA, P40, CK5/6 (**Figura 10f-g**). Su pronóstico es menos favorable que el de los adenocarcinomas y los carcinomas de células escamosas (126).

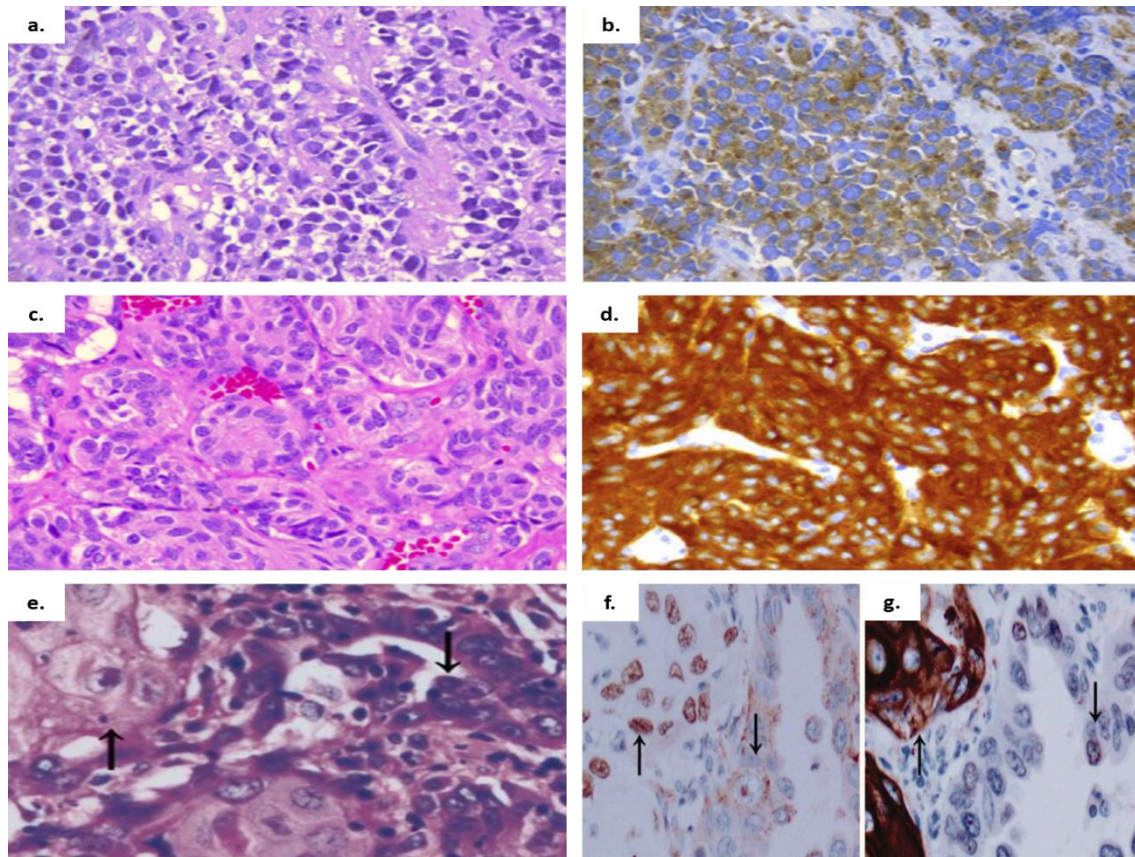


Figura 10. Imágenes de cortes histológicos de otros subtipos de carcinoma menos comunes.

a. Tinción de hematoxilina-eosina (H&E) de un tejido de carcinoma neuroendocrino de células grandes, con patrón trabecular. **b.** Expresión positiva de sinaptofisina en un carcinoma neuroendocrino de células grandes (116). **c.** Tinción H&E de un tejido de carcinoide típico, con nidos de células **d.** Expresión positiva de sinaptofisina en un carcinoide típico (114). **e.** Tinción H&E de un tejido de carcinoma adenoescamoso, donde las flechas hacia arriba señalan células escamosas y hacia abajo, adenocarcinomas. **f.** Doble tinción P40 y NAPSA, en la que las células escamosas presentan núcleos teñidos y las adenocarcinomas muestran un citoplasma teñido. **g.** Doble tinción CK5/6 y TTF-1, donde las células escamosas exhiben un citoplasma teñido y las células adenocarcinomas núcleos teñidos (126).

Subtipo	Marcadores Positivos	Marcadores Negativos
Cáncer de pulmón de célula pequeña		
<u>Carcinoma de células pequeñas</u>	SYP, CHGA, CD56, TTF-1	P40, CK5/6, NAPSA
Cáncer de pulmón de célula no pequeña		
<u>Adenocarcinoma</u>	TTF-1, NAPSA	P40, CK5/6
Lepídico		
Acinar		
Papilar		
Micropapilar		
Invasivo mucinoso		
Coloide		
Fetal		
Entérico		
Mínimamente invasivo		
In situ		
<u>Carcinoma de células escamosas</u>	P40, CK5/6	TTF-1, NAPSA
Queratinizante		
No queratinizante		
Basaloide		
In situ		
Otros subtipos menos comunes		
<u>Carcinoma de células grandes</u>	CK5/6	TTF-1, P40
<u>Carcinoma neuroendocrino de células grandes</u>	SYP, CHGA, CD56	TTF-1, P40, CK5/6
<u>Tumor carcinoide (Típico / Atípico)</u>	SYP, CHGA, CD56	TTF-1, P40, CK5/6
<u>Carcinoma adenoescamoso</u>	TTF-1, NAPSA, P40, CK5/6	-

Tabla 2. Clasificación histológica de los distintos tipos de cáncer de pulmón. Se indican los marcadores positivos y negativos asociados a cada tipo, lo que facilita su identificación y diagnóstico. Tabla generada a partir de la información obtenida de (114, 127).

2.4. Clínica del cáncer de pulmón

2.4.1. Diagnóstico

El diagnóstico del cáncer de pulmón suele comenzar con una evaluación clínica por parte del médico, en la que recoge información sobre el historial médico del paciente, los síntomas actuales y cualquier antecedente familiar de cáncer. Los síntomas asociados al cáncer de pulmón son amplios y variados, entre los que se incluye la tos persistente, la disnea, el dolor torácico y, en algunos casos, el esputo con sangre (128). Una vez que

existe sospecha clínica, se emplean técnicas de imagen, comenzando generalmente con una radiografía de tórax para detectar posibles masas o nódulos anormales en los pulmones. Otros estudios de imagen, como la tomografía computarizada y la tomografía por emisión de positrones, permiten observar de manera más detallada, proporcionando información sobre el tamaño, la forma y la ubicación de las lesiones y si se han extendido a otras áreas (129). En el caso de que en las imágenes revelen una masa sospechosa, se realiza una biopsia para obtener una muestra de tejido pulmonar, que puede realizarse mediante broncoscopia, aspiración con aguja o cirugía, en el caso de que sea necesario extirpar una parte del pulmón. Estas muestras son enviadas a un patólogo, quien confirma la presencia del tumor y determina el tipo histológico a través de las características morfológicas e inmunohistoquímicas antes mencionadas. Además, el patólogo puede realizar análisis moleculares para detectar mutaciones genéticas específicas en las células tumorales y así orientar el tratamiento hacia terapias dirigidas (130).

2.4.2. Estadía y pronóstico

Una vez que se ha confirmado el diagnóstico de cáncer de pulmón, es fundamental realizar una estadificación para determinar la extensión de la enfermedad y evaluar si el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos o a otros órganos.

La clasificación TNM es el sistema estándar que se utiliza para describir el alcance del cáncer en el cuerpo del paciente: “T” indica el tamaño del tumor primario, “N” evalúa la afectación de los ganglios linfáticos, y “M” señala la presencia de metástasis en áreas distales. Cada uno de estos componentes (T, N y M) se subdivide en varias categorías y las combinaciones específicas se agrupan en distintos estadios. La octava edición de la clasificación TNM, actualmente en vigor para el cáncer de pulmón, organiza a los pacientes en tres categorías principales: estadio temprano (pacientes con estadios I, II o incluso IIIA), localmente avanzado (estadio III) y avanzado/metastásico (estadio IV) (131) (**Tabla 3**).

La estadificación es esencial no solo para establecer el pronóstico del paciente, sino también para orientar las opciones de tratamiento más adecuadas. Además del estadiaje, existen otros factores que influyen en el pronóstico, como la edad y sexo del paciente, los subtipos histológicos, el grado de diferenciación tumoral, el estado general del paciente (ECOG, del inglés *Eastern Cooperative Oncology Group*), la presencia de mutaciones

genéticas específica o la presencia de ciertos marcadores tumorales (132). Por ejemplo, los pacientes con mejor pronóstico suelen ser aquellos cuyos tumores presenten un grado más alto de diferenciación o que poseen ciertas mutaciones que los hacen sensibles a terapias dirigidas. Asimismo, la elevada mortalidad del cáncer de pulmón también se debe a la ausencia de programas de detección temprana eficaces y a la naturaleza inespecífica de los síntomas. Esto hace que la mayoría de casos se diagnostiquen en fases avanzadas, cuando las probabilidades de supervivencia son considerablemente menores.

8a Edición de la clasificación TNM					
T/M	Etiqueta	N0	N1	N2	N3
T1	T1a ≤ 1cm	IA1	IIB	IIIA	IIIB
	T1b > 1 a ≤ 2cm	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c > 2 a ≤ 3 cm	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a > 3 a ≤ 4 cm	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b > 4 a ≤ 5 cm	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	T3 > 5 a ≤ 7 cm	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 Invasión	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 Nódulos satélites	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4 > 7 cm	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 Invasión	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 Nódulos ipsilaterales	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1	M1a Nódulos contralaterales	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1a Perforación pleural, pericárdica	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b Lesión única	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c Lesiones Múltiples	IVB	IVB	IVB	IVB

Tabla 3. Octava edición de la clasificación TNM para el cáncer de pulmón. Se detallan los criterios de evaluación del tumor primario (T), el compromiso de los ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis a distancia (M). Tabla adaptada de (132).

2.4.3. Tratamiento

Para los pacientes con cáncer de pulmón en estadio temprano, el tratamiento principal es la resección quirúrgica del tumor, siempre que sea viable. En el caso de pacientes en estadio I, suele optarse por una estrategia de seguimiento, mientras que en los estadios II y IIIA se recomienda administrar terapia adyuvante basada en cisplatino, ya que esta quimioterapia ha demostrado mejorar la supervivencia general en un 4-5% a cinco años en pacientes con tumores resecados en estos estadios (133). En los últimos años, se ha incluido el uso de osimertinib como tratamiento adyuvante en pacientes resecados con estadios I-IIIA que presentan delecciones en el exón 19 de *EGFR* o mutaciones L858R en el exón 21 (134). En cuanto a los pacientes con CPCNP en estadios

I-II que no son candidatos para cirugía, se prefieren alternativas basadas en radioterapia, como la radioterapia ablativa estereotáctica (135).

En lo que respecta a los pacientes en estadio III, son considerados un grupo diverso que se subdivide en aquellos con tumores resecables e irresecables. Según la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO, del inglés *European Society of Medical Oncology*), los tumores resecables en estadio IIIA son considerados en algunos casos como enfermedad en estadio temprano (136). Sin embargo, en pacientes con N2 confirmado en estadio III se suele recomendar terapia de inducción, ya sea con quimioterapia o quimio-radioterapia, antes de proceder a la cirugía. En casos de pacientes resecados en estadio III que no recibieron quimioterapia de inducción y que presentan enfermedad residual, puede valorarse la radioterapia postoperatoria (137). Para los pacientes en estadio III con tumores irresecables, la quimio-radioterapia concurrente con platino es el tratamiento que se suele elegir. Si no hay progresión de la enfermedad después de la quimio-radioterapia y el tumor expresa PD-L1 (del inglés, *programmed death-ligand 1*), se considera un tratamiento de consolidación con durvalumab, que ha demostrado beneficios en supervivencia (138). La proteína PD-L1 es una molécula que se encuentra en la superficie de las células tumorales que inhibe la respuesta inmune, permitiendo que escapen y sean eliminadas por el sistema inmunológico.

Los pacientes con cáncer de pulmón metastásico representan un grupo con un abordaje más complejo. Su tratamiento incluye varias líneas y modalidades, en el que la cirugía tiene un rol limitado y las terapias dirigidas contra *EGFR*, *ALK*, *RET*, *MET* o *BRAF* en adenocarcinomas pulmonares desempeñan un papel fundamental al mejorar la supervivencia (139). Es importante señalar que, según las recomendaciones actuales de ESMO en pacientes con CPCNP metastásico sin mutaciones *driver*, aquellos que presentan un PD-L1 > 1% se les administre una combinación de nivolumab e ipilumab. Por otro lado, en pacientes con un PD-L1 ≥ 50%, se sugiere la administración de pembrolizumab, atezolizumab y cemiplimab como tratamientos en monoterapia (140, 141).

Actualmente, se están realizando numerosos ensayos clínicos que investigan nuevas combinaciones de inmunoterapia, incluyendo su aplicación junto con terapias moleculares dirigidas y tratamientos de radioterapia. Hay varios estudios evaluando el papel de la inmunoterapia en pacientes con CPCNP en estadios no avanzados, donde la cirugía sigue siendo considerada la opción más curativa cuando es viable. Recientemente,

se ha destacado la eficacia de la inmunoterapia como tratamiento neoadyuvante seguido de resección quirúrgica en pacientes con CPCNP resecable, según un ensayo clínico de fase III que incluyó a pacientes en estadios I–III (142).

2.5. Desarrollo y biología molecular del cáncer de pulmón

2.5.1. Células madre del cáncer

El origen celular del cáncer de pulmón continúa siendo un tema complejo y aún no del todo esclarecido. Una de las hipótesis actuales sugiere que podría estar relacionado con las células madre adultas presentes en el tejido del epitelio pulmonar. Estas células madre poseen una notable capacidad de autorrenovación y pueden diferenciarse en otros tipos de células pulmonares, lo que las hace esenciales para el mantenimiento y la regeneración del tejido. En el pulmón adulto, se identifican varias poblaciones clave: las células basales en la tráquea y bronquios; las células neuroendocrinas y células Club en los bronquiolos; y en los alveolos, las células BASCs y los AT2 (**Figura 11**) (143). Dado que estas células madre adultas tienen una vida prolongada, podrían acumular mutaciones a lo largo del tiempo, transformándose así en células malignas y desencadenando el proceso de tumorigénesis.

Esta idea se fundamenta en la teoría de las células madre del cáncer (CSCs, del inglés, *cancer stem cells*), que plantea que el crecimiento de los tumores está impulsado por poblaciones residuales de CSCs. Estas CSCs son las principales responsables de iniciar y perpetuar el tumor, además de contribuir a la resistencia al tratamiento y a la formación de metástasis (144). Como se comentó en los apartados anteriores, sabemos que algunos subtipos histológicos del cáncer de pulmón parecen surgir en zonas específicas del aparato respiratorio, y muestran marcadores característicos de las células madre presentes en esos microambientes, lo que sugiere que cada tipo de tumor podría tener su origen en CSCs localizadas en esos nichos celulares.

La distribución de los tumores en el sistema respiratorio apoya esta teoría. Se considera que el carcinoma de células escamosas se origina principalmente en las vías respiratorias más proximales (tráquea y bronquios principales), donde las células basales son las responsables del recambio celular. Estas células expresan los marcadores CK5/6 y TP63, que también son característicos de las carcinomas de células escamosas (145).

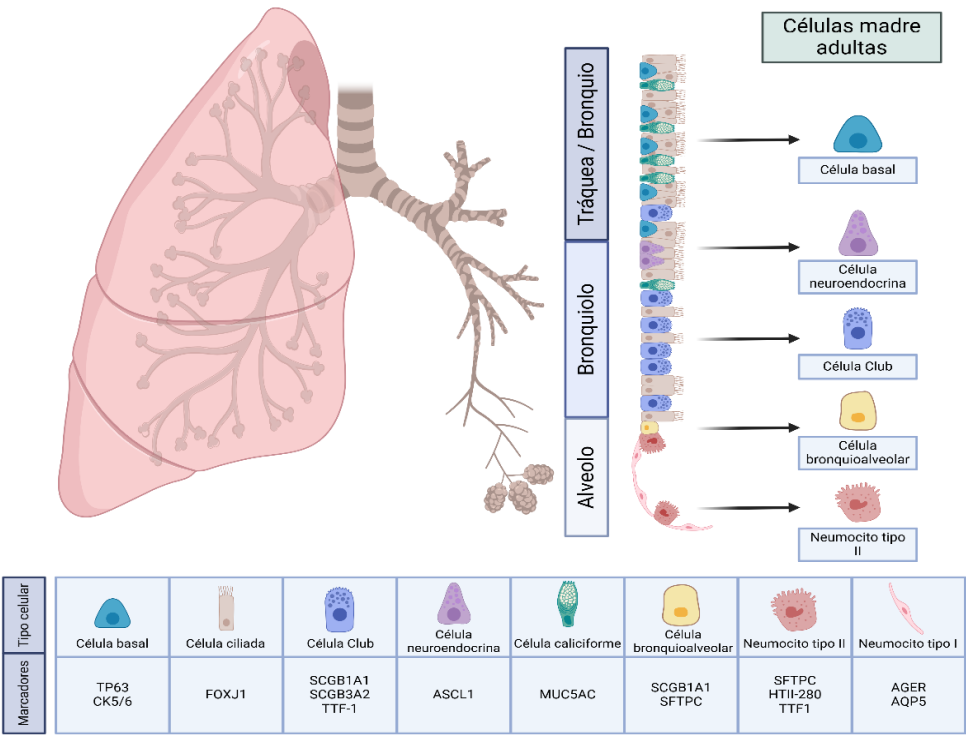


Figura 11. Células madre en el pulmón adulto. Se representa la composición celular del epitelio pulmonar en cada región, destacando las células madre responsables de la regeneración y reparación tisular a lo largo del árbol bronquial. La tabla asociada muestra los tipos celulares y los marcadores inmunohistoquímicos usados para su caracterización. Figura adaptada de (143).

En las regiones bronquiolares, se desarrollan tanto el CPCP como otros tumores neuroendocrinos. En esta zona, se encuentra una subpoblación células neuroendocrinas pulmonares con capacidad de replicación y con expresión de ASCL1, un factor de transcripción clave en la diferenciación neuroendocrina. Esta subpoblación podría representar entonces las células precursoras del CPCP (146).

Finalmente, en las regiones más distales del pulmón, en los sacos alveolares, es común que se desarrollen los adenocarcinomas. En esta región anatómica residen los AT2, identificados por la expresión de SFTPC y la ausencia de SCGB1A1, y que han sido considerados el origen del adenocarcinoma pulmonar. Sin embargo, investigaciones recientes en modelos de ratón han propuesto otra posible célula de origen para este tipo de cáncer: las BASCs, que expresan tanto SFTPC como SCGB1A1 y se localizan en la región de transición entre los bronquios y los alvéolos. Estas BASCs podrían estar involucradas en la génesis de algunos adenocarcinomas, lo que abre nuevas perspectivas sobre el origen celular de este subtipo de cáncer de pulmón (147, 148).

2.5.2. Mutaciones en oncogenes y en genes supresores tumorales

El cáncer de pulmón está impulsado principalmente por alteraciones genéticas en oncogenes y genes supresores de tumores, las cuales desestabilizan los mecanismos normales que regulan el ciclo celular, el crecimiento, y la muerte celular. Estas mutaciones provocan un crecimiento celular descontrolado, resistencia a los mecanismos de reparación del ADN y la transformación del epitelio pulmonar en neoplasias malignas, contribuyendo de esta manera a la progresión del cáncer (149). Es importante, por tanto la identificación de mutaciones específicas y las vías involucradas para desarrollar tratamientos dirigidos que mejoren la supervivencia de los pacientes.

Por una parte, los oncogenes son versiones alteradas de genes que normalmente promueven el crecimiento y la división celular. Cuando estos genes sufren mutaciones, se activan de manera descontrolada e impulsan el crecimiento y la proliferación de las células cancerosas. Las anomalías en los oncogenes pueden ocurrir por amplificaciones, mutaciones puntuales y reordenamientos estructurales (150).

Un oncogén altamente predominante en el cáncer de pulmón es el *KRAS*, localizado en el brazo corto del cromosoma 12, y que forma parte de la familia de proto-oncogenes *RAS*, encargados de codificar las proteínas *RAS*. Estas proteínas participan en numerosas vías de señalización como *MAPK* (del inglés, *mitogen-activated protein kinase*) y *PI3K-AKT* (del inglés, *phosphoinositide 3-kinase* y *protein kinase B*), que promueven la proliferación celular y previenen la apoptosis (151). Las mutaciones activadoras de *KRAS* son más comunes en el adenocarcinoma de pulmón, donde se encuentran en el 25-40% de los casos. Estas mutaciones son más frecuentes en las poblaciones occidentales que en las asiáticas, y especialmente en hombres y fumadores. Las mutaciones de *KRAS* son muy raras o están ausentes en los carcinomas de células escamosas y en el CPCP (152). Aunque históricamente han sido difíciles de tratar con terapias dirigidas, recientemente se han realizado ensayos clínicos con inhibidores específicos para mutaciones, como el sotorasib para la mutación G12C, que han mostrado ser eficaces al ralentizar o detener el crecimiento de las células tumorales (153).

Otro gen frecuentemente mutado es el *EGFR*, que se localiza en el cromosoma 7 y codifica la tirosina quinasa *EGFR*. Este receptor está involucrado en numerosas vías de señalización relacionadas con la proliferación celular, la supervivencia, la diferenciación,

la neovascularización, la migración y la invasión. Por tanto, las mutaciones en el gen *EGFR* causan la activación descontrolada de estas vías, promoviendo así la tumorigénesis (154). La mayoría de las mutaciones en *EGFR* se encuentran en el adenocarcinoma, aunque también se observan en carcinomas adenoescamosos. Son comunes en mujeres jóvenes y no fumadoras. Las mutaciones de *EGFR* suelen responder a tratamientos dirigidos como los inhibidores de tirosina quinasa (TKI, del inglés *tyrosine kinase inhibitors*), aunque con el tiempo pueden aparecer resistencias (155).

En cuanto a los genes supresores de tumores, se caracterizan por funcionar como reguladores negativos que controlan el crecimiento y la división normal de la célula, además de que participan en la reparación del ADN y la apoptosis. Cuando estos genes mutan, pierden su función protectora, lo que facilita que se acumule daño genético y tenga lugar el desarrollo del cáncer (156).

En el cáncer de pulmón, el *TP53* (del inglés, *tumor protein 53*) es el gen supresor de tumores más frecuente mutado. Ubicado en el cromosoma 17, este gen codifica la fosfoproteína nuclear p53, que se une a las regiones de ADN dañado y actúa como un factor de transcripción al promover la reparación del daño y la apoptosis cuando este daño es irreparable. Cuando se producen las mutaciones en *TP53*, sus funciones de protección se pierden, lo que permite un crecimiento descontrolado de las células y la acumulación de otras mutaciones (157). Las anomalías en *TP53* ocurren en el 90% de los CPCP y en el 65% de los CPCNP, siendo más común en carcinomas de células escamosas que en adenocarcinomas. En el CPCNP, estas mutaciones están asociadas a personas fumadoras o a la exposición del tabaco del ambiente (158).

PTEN (del inglés, *phosphatase and tensin homolog*) es otro gen supresor de tumores, localizado en el cromosoma 10 y que codifica una fosfatasa de lípidos, la cual antagoniza la vía de señalización de supervivencia, inhibiendo en condiciones normales el crecimiento y la proliferación descontroladas de las células (159). Aunque las mutaciones de *PTEN* no son tan comunes, se detectan en aproximadamente el 5% de los CPCNP, siendo más frecuentes en carcinomas de células escamosas que en adenocarcinomas (10,2% vs 1,7%). Además, estas mutaciones se relacionan con un historial de tabaquismo (160).

3. Organoides para el estudio de la embriología humana y el cáncer

3.1. El uso de los organoides frente a los modelos *in vivo* e *in vitro* tradicionales

En las últimas décadas, se han desarrollado diversos modelos experimentales para su uso tanto en la investigación básica como en la investigación translacional. En el estudio del pulmón humano, estos modelos han surgido como herramientas clave para descifrar, en un entorno más controlado, los mecanismos celulares y moleculares aún desconocidos del desarrollo pulmonar humano, así como de aquellos involucrados en la aparición y progresión del cáncer. Además, han permitido evaluar tratamientos que se encuentran en fases preclínicas.

Los modelos *in vivo*, como el uso de ratones, ofrecen un contexto biológico que permite estudiar la interacción de distintos tipos celulares dentro de una estructura en tres dimensiones (3D), simulando la complejidad del tejido vivo (161). Los ratones genéticamente modificados destacan porque se les puede introducir mutaciones específicas en genes de interés, a través de la creación de modelos *knock-out* (donde se inactiva un gen) y *knock-in* (donde se introduce una mutación), lo que permite estudiar procesos fisiológicos clave, como la morfogénesis de las ramificaciones del árbol bronquial, o para profundizar en la comprensión de cómo una mutación específica puede inducir o contribuir al desarrollo del cáncer (162). Otro modelo *in vivo* relevante son los ratones a los que se les realizan xenoinjertos derivados de pacientes (PDX, del inglés *patient-derived xenograft*), que implican el trasplante de tejido tumoral humano en ratones inmunodeficientes. Este modelo conserva las características biológicas y moleculares del tumor original, por lo que se pueden utilizar para evaluar la eficacia de tratamientos personalizados (163). A pesar de su utilidad, los modelos *in vivo* presentan desventajas: son costosos, requieren mucho tiempo y no siempre replican la biología humana de manera precisa debido a las diferencias entre especies. Varios estudios han evidenciado las importantes diferencias que existen entre los pulmones humanos y los de los animales, que incluyen variaciones en el tiempo de desarrollo, la fisiología pulmonar, el genoma y la expresión génica, así como las vías moleculares involucradas. Por ejemplo, está demostrado que los pulmones humanos presentan diferencias anatómicas significativas en la distribución de las células madre en comparación con los pulmones

de roedores, lo que dificulta la extrapolación directa de los resultados obtenidos en modelos humanos a la biología humana (164, 165).

Modelos *in vivo* como los cultivos celulares en dos dimensiones (2D), que consisten en células cultivadas sobre superficies planas, han sido ampliamente utilizados en la investigación debido a su simplicidad y bajo coste. Estos cultivos se dividen en dos categorías principales: las líneas celulares inmortalizadas, que consisten en células modificadas genéticamente para proliferar de manera indefinida en cultivo, y las células primarias, que provienen directamente de tejidos frescos y están compuestas por células no transformadas (166). Otro tipo de cultivo 2D son los co-cultivos, que son más complejos que los cultivos en monocapa al cultivar al menos dos tipos diferentes de células en proximidad, ya sea en contacto directo o mediante insertos con membranas porosas (167). Estos modelos permiten estudiar interacciones celulares, como las de las células epiteliales y mesenquimales embrionarias, o las respuestas inmunitarias del tumor. Sin embargo, una de las principales limitaciones de los cultivos 2D es su incapacidad para replicar la estructura 3D del tejido, lo que impide reproducir adecuadamente procesos tan complejos como el desarrollo embrionario o el microambiente tumoral (168).

Recientemente, los métodos de cultivo en 3D utilizando células madre han ganado popularidad como una alternativa *in vitro* que ofrece una representación más fiel de la arquitectura tisular. Se han desarrollado diversos modelos 3D para estudiar poblaciones de células madre, como los esferoides, que son agregados celulares simples con una complejidad limitada (169), y los organoides.

3.1.1. Principales características en el cultivo de organoides

Los organoides son estructuras 3D derivadas de las células madre, lo que les confiere la capacidad de autorenovación, de autoorganización y de diferenciación en diversos tipos celulares, replicando la diversidad celular, la funcionalidad y las características moleculares del tejido de origen. Gracias a estas propiedades, los organoides se han convertido en herramientas clave para la investigación básica y translacional, permitiendo estudios más representativos y precisos sobre la biología del desarrollo, enfermedades y respuesta a tratamientos (170).

Para comprender mejor cómo se generan los organoides, es importante conocer los tipos de células madre que existen, que se clasifican tanto por su capacidad de

diferenciación como por su origen. Según su potencial de diferenciación, encontramos (171, 172):

- Las células madre totipotentes, como el cigoto y los blastómeros en los primeros 1-3 días después de la fertilización. Pueden formar todos los tipos de células del organismo, incluidas las extraembrionarias, como la placenta.
- Las células madre pluripotentes derivadas de la masa celular interna del blastocisto (4-14 días después de la fertilización). Tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), aunque no en células extraembrionarias.
- Las células madre multipotentes, con capacidad para generar varios tipos celulares, pero solo dentro de un linaje específico o familia celular. Un ejemplo son los AT2, que pueden diferenciarse en los AT1.
- Las células madre unipotentes, limitadas a diferenciarse en un solo tipo de célula, especializándose en un solo linaje específico. Aunque tienen una capacidad limitada de diferenciación, son importantes para el mantenimiento y regeneración de tejidos específicos, como las células basales de las vías aéreas proximales.

Por otra parte, las células madre también se pueden definir según su origen (173, 174):

- Las células madre embrionarias (ESCs, del inglés *embryonic stem cells*), derivadas de la masa celular interna del blastocisto, son pluripotentes y pueden diferenciarse en cualquier tipo de célula endodérmica, mesodérmica y ectodérmica.
- Las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés *induced pluripotent stem cells*), células somáticas adultas que han sido reprogramadas para alcanzar un estado pluripotente.
- Las células madre adulta (ASCs, del inglés *adult stem cells*), son células multipotentes encontradas en tejidos específicos del organismo, y están especializadas en generar células dentro de su propio linaje tisular.
- Las CSCs, derivadas de tumores y con capacidad de generar una población celular heterogénea similar a la del tumor primario.

Para desarrollar organoides, es fundamental proporcionar un entorno adecuado que favorezca su crecimiento y diferenciación, lo que requiere de dos elementos esenciales: un medio de cultivo enriquecido que incluya factores de crecimiento y moléculas reguladoras que actúan sobre las vías de señalización involucradas en la proliferación, la supervivencia celular y la autorrenovación (175); y un andamiaje que imite la matriz extracelular (ECM, del inglés *extracellular matrix*) y permita el crecimiento en 3D, generalmente un hidrogel. El Matrigel, de origen animal y rico en proteínas como laminina y colágeno IV, es el hidrogel más utilizado para promover la adhesión, organización e interacción celular en los cultivos de organoides (176).

La historia del cultivo de organoides comienza con el primer cultivo de organoides intestinales a partir de células madre adultas, los cuales expresaban un marcador específico asociado a células madre de intestino, conocido como Lgf5 (del inglés *leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor*) (177). Este avance, realizado hace más de una década, abrió el camino a la generación de organoides de diversos tejidos, incluyendo cerebro, hígado y riñón. Sin embargo, no fue hasta el 2015 cuando se desarrolló un protocolo especializado para generar organoides pulmonares. Este método, diseñado por Spence y su grupo, permitió la producción de organoides pulmonares humanos derivados de células madre pluripotentes, tanto ESCs como iPSCs (178). Los organoides obtenidos mediante este protocolo replicaban la arquitectura del tejido pulmonar original y presentaban una variedad de células especializadas, como células basales, ciliadas y Club. En 2019, se lograron establecer las condiciones que permitían el cultivo a largo plazo de organoides pulmonares, y en la actualidad, es posible generar organoides pulmonares a partir de ASCs y CSCs (179).

En la presente tesis, nos centraremos en el cultivo de tres tipos distintos de organoides, clasificados según su célula de origen: los organoides de pulmón embrionario (LEOs, del inglés *lung embryonic organoids*), derivados de una población de células progenitoras multipotentes presentes en las *tips* del árbol bronquial en desarrollo; los organoides de tejido normal de pulmón (LNOs, del inglés *lung normal organoids*), generados a partir de ASCs multipotentes; y los organoides de tejido tumoral de pulmón (LCOs, del inglés *lung cancer organoids*), obtenidos a partir de las CSCs presentes en el tumor (**Figura 12**).

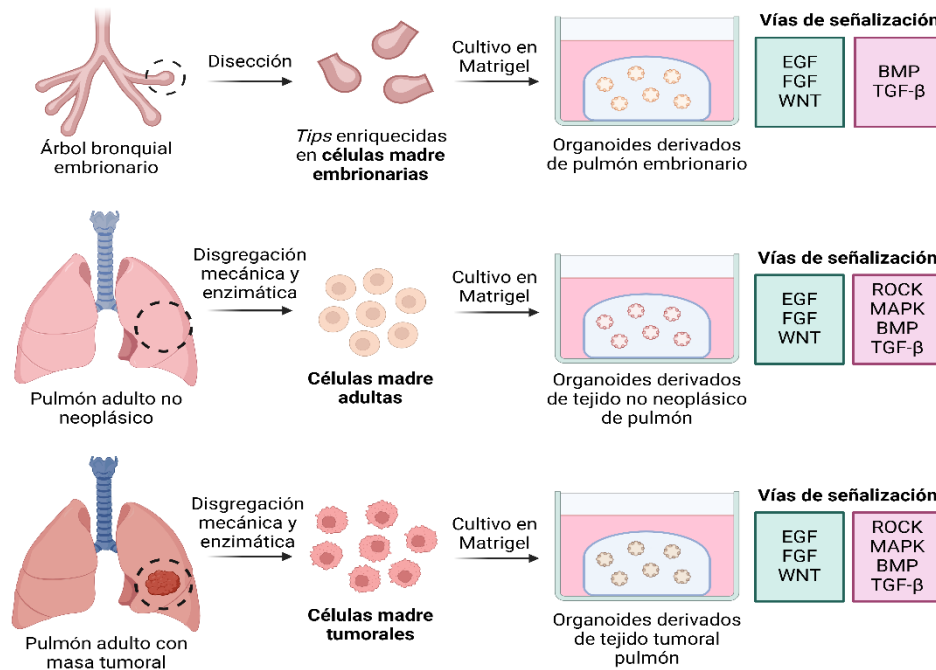


Figura 12. Generación de organoides a partir de células progenitoras multipotentes del pulmón embrionario, de ASCs y de CSCs. De las *tips* del árbol bronquial embrionario, que contienen células progenitoras multipotentes, se generan organoides embrionarios. En el caso de tejido pulmonar adulto sin patologías, este se disgrega y digiere enzimáticamente para obtener células madre adultas que darán lugar a organoides derivados de tejido sano. Por otro lado, de un tejido pulmonar tumoral, tras la disgregación y digestión, se obtienen células madre del cáncer que se utilizan para generar organoides derivados de tejido tumoral. Para el cultivo de estos tres tipos de organoides pulmonares se requiere la activación e inhibición de diversas vías de señalización. Figura original creada con BioRender.

3.2. Cultivo de organoides derivados de pulmón embrionario

Como se explicó en el apartado dedicado al desarrollo embrionario del pulmón, durante la fase pseudoglandular el árbol bronquial en desarrollo alberga en su extremo distal o *tip* una población enriquecida en células progenitoras multipotentes. Estas células, caracterizadas por la expresión de los marcadores SOX2⁺, SOX9⁺, ID2⁺, darán lugar a las células de las vías bronquiales. Posteriormente, en la fase canalicular, estas células progenitoras de la *tip* pasarán a expresar SOX2⁻, SOX9⁺, ID2⁺, y se diferencian en células alveolares. Para poder cultivar los LEOs, se ha desarrollado un modelo que utiliza la población de células madre provenientes de las *tips* del pulmón en desarrollo

Para obtener LEOs a partir de las *tips* pulmonares, se han de seguir varios pasos tras la obtención de los pulmones de embriones o fetos abortados. Primero, se realiza una

digestión enzimática del tejido pulmonar para disgregar las células mesenquimales, la enzima más utilizada para ello es la dispasa. Luego se diseca la porción más distal del pulmón, la *tip*, y se cultiva en un hidrogel como el Matrigel para proporcionar un entorno 3D adecuado (**Figura 13**). En cuanto al medio de cultivo, se utiliza un medio basal compuesto por DMEM/F12, enriquecido con GlutaMax como fuente estable de glutamina, y HEPES para mantener el pH en niveles fisiológicos. Con el fin de prevenir contaminaciones bacterias, se añaden antibióticos comunes como penicilina y estreptomicina, y en ocasiones también se incluye anfotericina para evitar la proliferación de hongos. Adicionalmente, algunos autores incorporan suplementos *multitarget* que favorezcan el crecimiento y la viabilidad a largo plazo. Entre estos, destaca B27, una mezcla de vitaminas y nutrientes que estimula la proliferación celular y la formación de organoides; N-acetilcisteína (NAC), un antioxidante que protege las células del estrés oxidativo; y N2, para supervivencia y el crecimiento celular óptimos (143). Asimismo, es necesario suplementar el medio con factores de crecimiento y otros reactivos necesarios para el desarrollo y mantenimiento adecuados de los organoides.

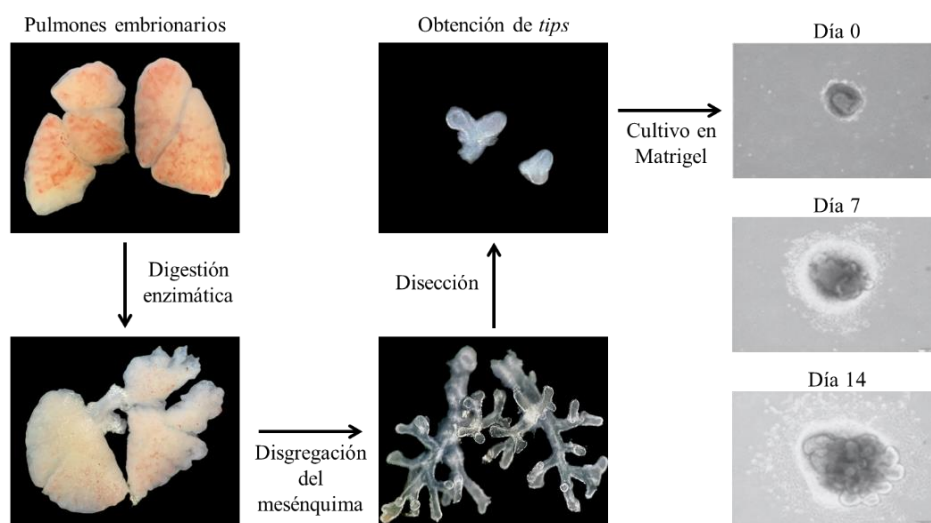


Figura 13. Proceso de generación de los organoides de pulmón embrionario a partir de las *tips* del árbol bronquial en desarrollo. Los pulmones embrionarios son digeridos enzimáticamente con dispasa para disgregar el mesénquima, seguidos de la disección y obtención de las *tips*, que se cultivan en Matrigel con un medio de cultivo adecuado para su desarrollo. Figura con imágenes originales.

Para poder preservar la población de célula progenitoras SOX2⁺, SOX9⁺ en los LEOs, es esencial incluir al menos tres factores clave: FGF7, CHIR99021 y RA. Estos factores demostraron ser los mínimos para asegurar la expansión y supervivencia de los LEOs hasta por 6 semanas, además de mantener la expresión de SOX2 y SOX9 por al menos 4

semanas en cultivo (180). Sin embargo, también se ha desarrollado un medio de cultivo optimizado, al que se añaden factores adicionales para mejorar aún más la tasa de éxito de establecimiento y la expansión prolongada de los organoides derivados de *tips*. Este medio completo de auto-renovación activa de manera precisa las vías de señalización de EGF (del inglés *epidermal growth factor*), FGF (del inglés *fibroblast growth factor*) y WNT y bloquea selectivamente las vías de BMP y TGF- β . Se estableció gracias al trabajo de Nikolić y su grupo, el cual incluye siete factores esenciales: EGF, FGF7, FGF10, NOGGIN, R-SPONDIN 1, CHIR99021 y SB431542. Para evaluar la importancia de cada factor, se realizaron comparaciones con 7 combinaciones de medios, en las que se eliminaba un factor diferente a cada uno. Los resultados indicaron que los organoides SOX2⁺, SOX9⁺ lograron crecer en todas las condiciones experimentales, aunque los cultivados en medios incompletos presentaban un tamaño reducido en comparación con aquellos en el medio completo. Se observó que la omisión de CHIR99021 llevaba a la desintegración de los organoides en sucesivos pases, mientras que la ausencia de NOGGIN promovía una expansión excesiva de las células mesenquimales. La eliminación de FGF10 desde el primer pase mostraba una regionalización temprana de los organoides, revelando poblaciones de células SOX2⁺, SOX9⁺ junto a células SOX2, SOX9⁺. Finalmente, la adición de SB431542 mejoraba notablemente tanto la eficiencia de formación de organoides como su tamaño (**Tabla 4**). Adicionalmente, se observó que la eliminación de cualquiera de los factores SB431542, FGF7, FGF10 y CHIR99021 provocaba una reducción significativa de los niveles de SOX9, mientras que la ausencia simultánea de FGF7 y FGF10, o CHIR99021, conllevaba un incremento de los niveles de SOX2, lo que sugiere que tanto la señalización de FGF como WNT son necesarias para mantener la capacidad de autorrenovación de las *tips* pulmonares y evitar su diferenciación prematura hacia otros linajes celulares (71).

Los LEOs no solo pueden mantenerse en un estado indiferenciado, sino que también pueden ser dirigidos hacia una diferenciación bronquiolar o alveolar *in vitro*, lo que demuestra la plasticidad de este modelo. Para inducir la formación de estructuras bronquiolares, los organoides pueden cultivarse en un medio de diferenciación de vías aéreas ya establecido, conocido como el PneumaCult. En este medio, los organoides con un número de pase alto presentan células diferenciadas como caliciformes MUC5AC⁺ y basales CK5⁺. En cambio, en organoides de pase bajo, donde aún se encuentran células mesenquimales, se observaba la diferenciación de células basales TP63⁺, células

caliciformes MUC5AC⁺ (del inglés, *mucin 5AC*) y células ciliadas ACT⁺ (del inglés, *acetylated tubulin*) (71). Recientemente se ha publicado un medio de diferenciación alveolar para LEOs, el cual contiene factores como la dexametasona, 8-Br-cAMP, IBMX y DAPT, que facilitan la diferenciación hacia AT2 y AT1 (181).

Reactivo	Vías de señalización	Funciones	Concentración
<i>Advanced DMEM/F12</i>	-	<i>Medio base</i>	1x
<i>Penicilina/ Estreptomicina</i>	-	<i>Antibióticos</i>	100 µg/mL
<i>GlutaMax 100x</i>	-	<i>Fuente de glutamina</i>	2 mM
<i>Hepes</i>	-	<i>Buffer</i>	10 mM
<i>R-SPONDIN 1</i>	Señalización WNT/ β-catenina	<i>Autorrenovación de las células madre</i>	500 ng/mL
<i>NOGGIN</i>	Señalización BMP	<i>Autorrenovación y mantenimiento de las células madre</i>	100 ng/mL
<i>FGF7</i>	Señalización FGFR2B	<i>Proliferación de las células epiteliales pulmonares</i>	100 ng/mL
<i>FGF10</i>	Señalización FGFR2B	<i>Ramificación y crecimiento de estructuras pulmonares</i>	100 ng/mL
<i>N-acetilcisteína</i>	-	<i>Antioxidante</i>	1,25mM
<i>Suplemento B27 (sin Vitamina A)</i>	Señalización de la insulina	<i>Factores de crecimiento y nutrientes</i>	1:50
<i>Suplemento N2 (100x)</i>	-	<i>Factores de crecimiento y nutrientes</i>	1:100
<i>EGF</i>	Señalización EGFR	<i>Proliferación y supervivencia celular</i>	50 ng/mL
<i>CHIR 99021</i>	Señalización WNT Señalización GSK3	<i>Proliferación celular</i>	3 µM
<i>SB431542</i>	Señalización p38 MAPK	<i>Previene diferenciación no deseada</i>	10 µM

Tabla 4. Medio de cultivo de auto-renovación para organoides de pulmón embrionario. Las vías de señalización representadas en color verde son activadas por el reactivo correspondiente, mientras que las vías de color rojo muestran las que son inhibidas. GSK3, del inglés *glycogen synthase kinase 3* (71).

3.2. Cultivo de organoides derivados de tejido normal y de tejido tumoral de pulmón

Los organoides derivados de tejidos adultos son una herramienta valiosa para investigar la biología y la patología del pulmón humano, ya que permiten reproducir con gran fidelidad las características fisiológicas y genéticas tanto de las vías respiratorias como de las estructuras alveolares. Además, al generarse a partir de tejidos de pacientes, estos organoides posibilitan la creación de modelos personalizados, lo cual es fundamental para el estudio detallado de enfermedades como la fibrosis quística (182), infecciones por virus respiratorios (183) o el cáncer (184).

Para obtener las células madre necesarias para crecer estos organoides, el tejido debe disociarse en pequeños agregados celulares, separándolos de la ECM. Este proceso comienza con una disociación mecánica en la que el tejido se corta en fragmentos pequeños con bisturí. Luego, estos fragmentos se someten a una digestión enzimática, utilizando generalmente colagenasa, una enzima que rompe los enlaces peptídicos del colágeno en la ECM, facilitando la separación de las células entre sí. Una vez que se han aislado los agregados celulares, se siembran en una matriz 3D como el Matrigel (185). Posteriormente, se agregan medios de cultivo específicos que promueven el crecimiento y diferenciación celular, permitiendo que el organoide se desarrolle en condiciones que simulan el microambiente tisular original

El medio basal, compuesto por DMEM/F12 y que se suele suplementar con GlutaMax, HEPES y penicilina/estreptomicina, se puede complementar con diversos factores de crecimiento y reactivo, por lo que se han clasificado dos tipos principales de medio de cultivo: los medios enriquecidos y los medios mínimos (**Tabla 5**). Los medios mínimos incluyen entre cinco y seis sustancias, mientras que los enriquecidos contienen entre ocho y trece, destacando la ausencia de R-SPONDIN 1/CHIR99021 y NOGGIN en los medios mínimos (143). Una ventaja clave de los medios enriquecidos es su capacidad para mantener y expandir los organoides pulmonares a largo plazo, hasta pases superiores a 19 (aproximadamente un año), además de favorecer una alta tasa de proliferación y tamaño (186).

El primer estudio que describió el uso de un medio enriquecido para LNOs y LCOs fue publicado en 2019 por Sachs y su grupo, quienes establecieron un medio enriquecido

INTRODUCCIÓN

con factores de crecimiento como FGF7, FGF10, NOGGIN y R-SPONDIN 1 (179). Estos factores mejoraron la proliferación y mantenimiento de un estadio indiferenciado de los organoides pulmonares. Sin embargo, a su vez propician el crecimiento excesivo de LNOs en el cultivo de los LCOs, reduciendo su pureza. Para contrarrestar este problema, se puede añadir al medio NUTLIN-3A, un agente que induce apoptosis en organoides con la forma natural de p53, seleccionando aquellos con p53 mutado. Sin embargo, este enfoque no es universal, ya que no todos los pacientes con cáncer de pulmón presentan mutaciones en *TP53*, lo que limita la aplicabilidad del método y provoca la pérdida de especímenes sin dicha mutación. Otros laboratorios que desarrollaron medios enriquecidos para expansión prolongada y optaron por omitir la selección con NUTLIN-3A también enfrentaron una alta contaminación de organoides normales (187, 188).

				Reactivos añadidos al Medio de Cultivo Basal													
Grupos de investigación		Muestras de tejido tumoral	Tasa de éxito	B-27	A83-01	NA	FGF10	NOGGIN	SB202190	Y-27632	R-SPONDIN 1	NAC	FGF7	EGF	FGF2	N2	Otros reactivos
Medios de Cultivo Enriquecido	Sachs N. et al. 2019	ADC, SCC, NEC, (n=16)	88%														Nutlin-3a
	Dijkstra KK. et al. 2020	ADC (n=46), SCC (n=4), NEC (n=2), Otros (n=7)	40.70%														
	Shi R. et al. 2020	ADC (n=29), SCC (n=36)	87.65%														CHIR99021, SAG, FGF-4
	Li Z. et al. 2020	ADC (n=15)	80%														
	Li Y.F. et al. 2020	CPCNP (n=14)	71.40%														PGE2, Gastrin1, War3A
	Kim SY. et al. 2021	ADC (n=100)	83%														
Medios de cultivo Mínimo	Kim M. et al. 2019	ADC (n=14), SCC (n=6), CPCP (n=2), NEC (n=1)	86.44%														
	Hu Y. et al. 2021	ADC (n=55), SCC (n=23), CPCP (n=4), Otros (n=5)	78.26%														Forskolina, Dexametasona

Tabla 5. Los principales medio de cultivo de organoides tumorales de pulmón y los reactivos añadidos. Los reactivos añadidos al medio de cultivo se indican con las cajas en gris, mientras que las blancas señalan los que no se incluyen. ADC: adenocarcinoma, SCC: carcinoma de células escamosas, NEC: carcinoma neuroendocrino, CPCNP: cáncer de pulmón de célula no pequeña, CPCP: cáncer de pulmón de célula pequeña, NA: nicotinamida, NAC: N-acetilcisteína, PGE2: prostaglandina E2, SAG: del inglés *smoothened agonist*. Tabla adaptada de (143).

En contraste, los medios de cultivo mínimos se emplean para reducir la presencia de organoides normales en los cultivos de LCO. Al usar medios que incluyen solo factores esenciales, como EGF, N2, B27 y Y-27632, se consigue una mayor pureza en los organoides tumorales. Sin embargo, esto también resulta en organoides con menor tamaño y tasas de proliferación, lo que puede limitar ciertos tipos de estudios y experimentos (189, 190).

3.3.1. Organoides de tejido normal de pulmón

Entre los organoides derivados de tejido adulto, nos encontramos con los LNOs, obtenidos a partir de ASCs, que pueden ser utilizados para estudiar los mecanismos moleculares que controlan la proliferación y diferenciación de células madre pulmonares, siendo útiles para modelar y comprender mejor la respuesta regenerativa del tejido pulmonar ante lesiones y enfermedades. Dentro de los LNOs en humanos, se pueden distinguir dos tipos dependiendo de la célula de origen y de los factores que se añadan al medio y que favorezcan su diferenciación: los organoides de las vías aéreas proximales y los organoides de las áreas más distales (**Figura 14**).

Los LNOs de vías aéreas proximales son estructuras con lumen derivadas de células madre localizadas en las vías respiratorias, principalmente células basales. Estos, reciben nombres específicos: traqueosferas, si se originan en la tráquea, y broncosferas, si derivan de los bronquios. Estas estructuras están formadas por un epitelio pseudoestratificado que presenta una capa externa de células basales TP63⁺, CK5⁺ y una capa interna de células ciliadas funcionales (FOXP1⁺), células caliciformes (MUC5AC⁺) y células Club (SCGB1A1⁺, SCGB3A2⁺) (191). Para obtener esta diferenciación completa en estructuras de la vía aérea proximal, se necesita cultivar los organoides con un medio como el PneumaCult (192).

Por otra parte, los LNOs de las áreas distales se denominan alveolosferas y se observan al microscopio como estructuras quísticas con células cúbicas y delgadas que recuerdan la forma de los alveolos. Estos organoides son generados a partir de células madre localizadas en la región alveolar, especialmente las AT2, que pueden diferenciarse en AT1 y así contener ambos tipos celulares. Los organoides alveolares presentan una capa simple de células alveolares formada por células AT2 positivas para SFTPC y HTII-280, y células AT1 positivas para AGER (del inglés, *advanced glycation end products receptor*) y AQP5 en la capa interna (193). Estudios recientes han mostrado que las células AT2 co-cultivadas con células mesenquimales del pulmón adulto pueden generar organoides bronquiolares que contienen células basales, células Club, células ciliadas y células AT2 (194). Obtener este tipo de organoides supone un desafío actualmente, ya que al intentar inducir la diferenciación distal mediante la adición de reactivos de maduración alveolar (como dexametasona, 8-Br-cAMP e IBMX) y cultivarlos en 3D en Matrigel, los organoides no logran mantener su estado diferenciado de forma estable. Con

el tiempo, se observa una regresión hacia una morfología de pared gruesa, indiferenciada, en lugar de conservar la estructura quística diferenciada. Para lograr mantener las alveolosferas, es necesario cultivar estos organoides en suspensión en placas de no adherencia (195).

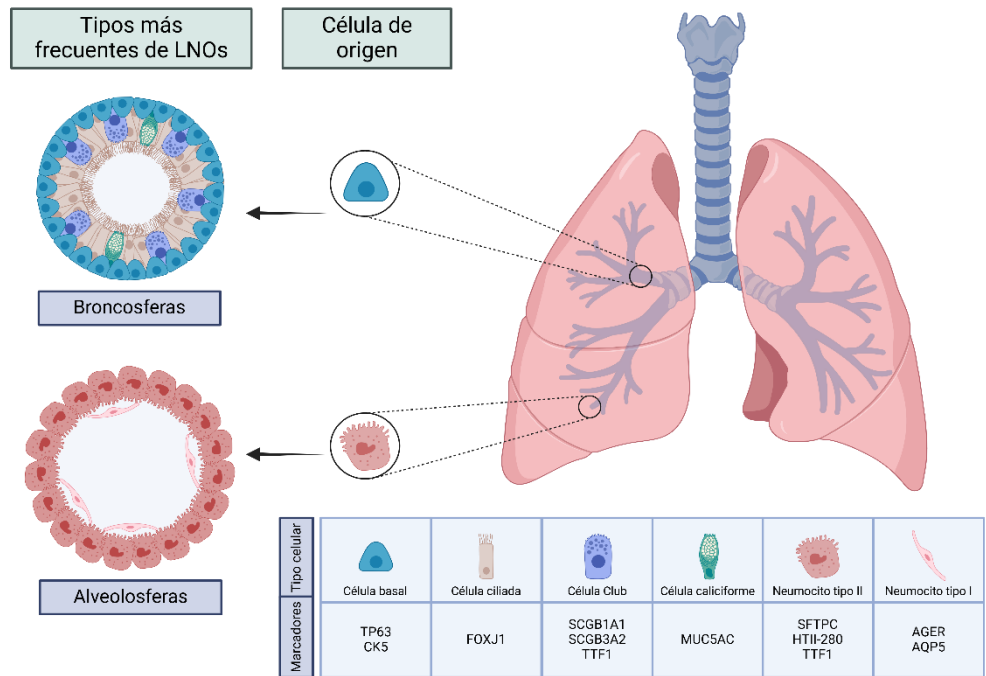


Figura 14. Composición celular de los dos tipos principales de organoides pulmonares normales observados en humanos y sus células de origen. En la tabla se muestran los diferentes tipos celulares junto con los marcadores de inmunohistoquímica utilizados para su identificación. Figura adaptada de (143).

3.3.2. Organoides de tejido tumoral de pulmón

La posibilidad de generar LCOs derivados de las CSCs que repliquen las características histológicas, las mutaciones y la expresión génica del tumor abriría la puerta a desarrollar modelos tumorales personalizados que acerquen la investigación experimental del cáncer de pulmón a la clínica. Para ello, es fundamental verificar en qué medida los LCOs replican las características del tumor original.

Desde el punto de vista morfológico, los LCOs obtenidos de pacientes con CPCNP suelen presentar características tumorales típicas, como núcleos de gran tamaño, glándulas mucinosas y variaciones en la forma y polaridad celular. En contraste, los LNOs exhiben una estructura quística organizada (143). Aunque la mayoría de los LCOs tienen una disposición densa e irregular, pueden desarrollarse tanto como estructuras sólidas como en forma de lúmenes de paredes delgadas, por lo que diferenciar LCOs de LNOs

basándose únicamente en la histomorfología no siempre es posible (**Figura 15**). La evaluación de los marcadores de inmunohistoquímica típicos de los CPCNP ha confirmado que los LCOs derivados de estos tumores expresan los marcadores característicos de sus respectivos tipos. Así, los organoides derivados de adenocarcinomas presentan la expresión de TTF1 y NAPSA, mientras que los derivados de carcinoma de células escamosas muestran positividad para P40 y CK5/6, reflejado fielmente los patrones de sus tumores originales (190).

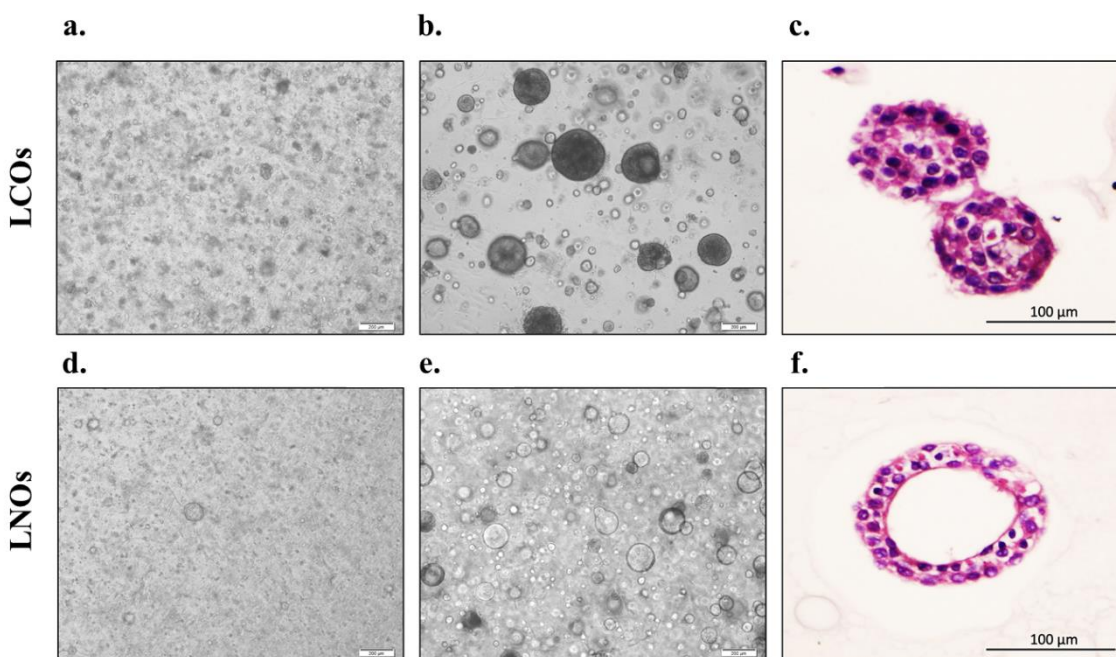


Figura 15. Imágenes del cultivo de organoides obtenidos de tejido tumoral y tejido normal pareado de un paciente con adenocarcinoma de CPCNP resecado. **a.** Imagen de campo claro de organoides obtenidos de tejido tumoral (LCOs) en el pase 1, día 4 y **b.** en el pase 2, día 15. Barras de escala 200 µm **c.** Tinción con hematoxilina-eosina de LCOs fijados en formalina e incluidos en parafina del pase 2. Barra de escala 100 µm. **d.** Imagen de campo claro de organoides obtenidos de tejido normal pareado (LNOs) en el pase 1, día 4 y **e.** en el pase 2, día 15. Barras de escala 200 µm. **f.** Tinción con hematoxilina-eosina de LNOs normales fijados en formalina e incluidos en parafina del pasaje 2, día 16. Barra de escala 100 µm. Figura adaptada de (143).

Al analizar el perfil genómico de los LCOs y compararlo con el de sus tumores de origen, se ha observado una variabilidad en los resultados, generalmente dependiendo del medio de cultivo utilizado para generarlos. Cuando los LCOs se cultivan en medios enriquecidos, no se reproduce fielmente las mutaciones observadas en los pacientes, lo que podría estar relacionado con la posible contaminación por LNOs, afectando así la precisión de los ensayos de sensibilidad a fármacos (186). Por otro lado, LCOs cultivados

con medios de cultivo mínimo, se mantuvieron las alteraciones en la variación en el número de copias (CNV, del inglés *copy number variation*), y las tasas de sustitución de bases y los tipos de mutaciones coincidieron con los descritas en los tumores de origen (189). Sin embargo, una preocupación adicional es la estabilidad genética de los LCOs a lo largo de los pasajes en cultivo, ya que ciertos subtipos celulares podrían ser seleccionados bajo condiciones de cultivo específicas. Estudios preliminares de secuenciación del genoma completo en pasajes tempranos y tardíos de LCOs han mostrado estabilidad en CNVs, mutaciones de genes clave y firmas mutacionales, aunque será necesario realizar investigaciones adicionales en cohortes más amplias y diversas para confirmar estos resultados (189).

Por último, también es relevante destacar el desarrollo de los co-cultivos de LCOs. El microambiente tumoral (TME, del inglés *tumor microenvironment*) está compuesto por un conjunto heterogéneo de poblaciones celulares que interactúan de manera dinámica tanto con las células circundantes como con la ECM, lo que favorece el crecimiento y la progresión tumoral (196). Para replicar el TME, se han realizado co-cultivos de LCOs con otros tipos celulares, como mesenquimales, células inmune (incluyendo linfocitos y poblaciones mieloides) o células endoteliales. Aunque actualmente son limitados los estudios que han utilizado co-cultivos de LCOs con células del sistema inmune, este campo está en expansión, ya que podría facilitar la predicción de respuestas a inmunoterapia dirigidas en el cáncer de pulmón. Un ejemplo de ello es un estudio en el que se co-cultivaron LCOs de pacientes diagnosticados con CPCNP y células de la sangre periférica. En este caso, se observó que las células T atacaban y eliminaban eficazmente a las células tumorales, mientras que los LNOs continuaban proliferando sin alteraciones (197).

4. La proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina tipo 3 (IGFBP-3)

4.1. El sistema de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs)

El sistema de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs, del inglés *insulin-like growth factors*) engloba un conjunto de proteínas y receptores involucrados en la regulación del crecimiento, desarrollo y mantenimiento de los tejidos del organismo. Este sistema incluye principalmente los péptidos IGF-I e IGF-II, los receptores IGF tipo I y II (IGF-IR e IGF-IIR, del inglés *type I IGF receptor* y *type II IGF receptor*), las proteínas de unión a IGF (IGFBPs, del inglés *IGF binding-proteins*) y varias proteasas que regulan la actividad de las IGFBPs (198).

Los IGFs son hormonas solubles con actividad mitogénica, que se dividen en dos tipos: IGF-I y IGF-II. Ambas son hormonas peptídicas de pequeño tamaño, con una masa molecular de aproximadamente 7 kDa (kilodalton) y que comparten alrededor de un 50% de homología con la insulina (199). Son producidos en su mayoría por el hígado y tienen actividades endocrinas, paracrinas y autocrinas. Los IGFs son transportados por el torrente sanguíneo y circulan en forma de un complejo ternario con la subunidad ácido-lábil (ALS, del inglés *acid-labile subunit*) y las IGFBPs, por lo que se mantienen inactivos hasta su liberación (200). Los receptores con los que interactúan específicamente los IGFs son las proteínas IGF-IR e IGF-IIR, proteínas que se encuentran en la superficie de las células. También, los IGFs pueden unirse al receptor de la insulina (IR, del inglés *insulin receptor*), pero con una menor afinidad (201).

El IGF-IR es una proteína transmembrana formada por dos subunidades alfa y dos subunidades beta, que presenta una afinidad mucho mayor por el IGF-I que por el IGF-II y la insulina. Además, este receptor presenta una actividad de tirosina quinasa, lo que permite la transmisión de señales dentro de la célula. En lo que respecta al IGF-IIR, este se une principalmente al IGF-II y tiene menor afinidad por IGF-I y ninguna por la insulina (202). Se considera que la mayoría de los efectos de los IGFs ocurren a través de su interacción con el IGF-IR, mientras que el IGF-IIR no tiene actividad tirosina quinasa, por lo que actúa principalmente como un receptor de "limpieza", regulando los niveles de

IGFs en circulación al mediar su internalización y degradación. Además, también actúa como receptor de manosa-6-fosfato, interactuando con enzimas lisosomales (203).

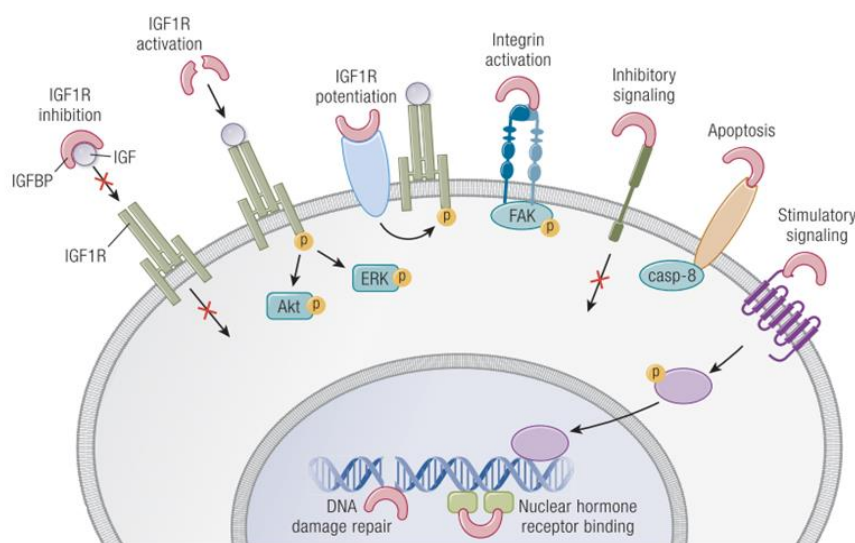


Figura 16. Ilustración de las interacciones del sistema de los factores de crecimiento insulínico (IGFs) con la célula. Las proteínas de unión a IGFs (IGFBPs) desempeñan un papel central al regular la disponibilidad de IGF-I e IGF-II para su interacción con el receptor IGF-IR. Esta regulación se logra principalmente al impedir el acceso de los IGFs al receptor, aunque las IGFBPs también pueden influir en la señalización del IGF-IR mediante modificaciones postraduccionales o interacciones con proteínas reguladoras. Además, las IGFBPs modulan procesos celulares como la supervivencia, la migración y el metabolismo a través de vías independientes del sistema IGF, incluyendo interacciones con integrinas y otras proteínas de superficie celular e intracelulares. Dentro del núcleo, las IGFBPs están implicadas en la regulación de receptores hormonales nucleares, la reparación del daño en el ADN y la senescencia celular (204).

Existen seis tipos conocidos de IGFBPs a los que se pueden unir IGF-I e IGF-II con alta afinidad: las proteínas homólogas IGFBP-1 a IGFBP-6 (del inglés, *IGF-binding protein 1 and 6*). Se caracterizan por desempeñar diversas funciones, como la proliferación, crecimiento, diferenciación, supervivencia, migración y desarrollo celular, tanto solubles en el entorno extracelular, como dentro de la célula (**Figura 16**). Cada IGFBP se compone de tres regiones principales: los dominios amino- y carboxi-terminales, que contienen varios enlaces disulfuro intradominio, y un dominio central o de enlace, carente de estos enlaces (205). Dentro de estos dominios se localizan varios motivos funcionales, algunos específicos y otros compartidos (como los sitios de unión a ligandos), que otorgan a cada IGFBP una funcionalidad distintiva. Cada IGFBP se asocia

con una sola molécula de IGF-I o IGF-II mediante la interacción con los residuos de los dominios amino- y carboxi-terminales, regulando así la actividad biológica de estas moléculas al aumentar su vida media y prevenir su rápida eliminación (206). Sin embargo, esta unión generalmente inhibe la capacidad de los IGF para activar sus receptores en la superficie celular. Para revertir esta inhibición, las IGFBPs son fragmentadas por proteasas específicas, como las proteasas de serina, las catepsinas y las metaloproteinasas de matriz (MMPs, del inglés *matrix metalloproteinases*), o por glucosaminoglicanos (GAGs).

La posibilidad de que las IGFBPs puedan tener efectos en el organismo de forma independiente a su regulación de la señalización de IGF a través del receptor fue, durante un tiempo, un tema de debate controvertido. Sin embargo, estudios realizados en fibroblastos de ratones modificados genéticamente para carecer de *Igf1r*, demostraron que la sobreexpresión de IGFBP-3 podía inhibir el crecimiento celular, confirmando así la existencia de funciones adicionales de las IGFBPs (207). Hoy en día, se sabe que las seis IGFBPs no solo regulan la disponibilidad de los IGFs para su receptor principal IGF-IR, sino que también participan en diversas rutas intracelulares independientes de la señalización mediada por IGF-IR mediante interacciones con otros factores de crecimiento y moléculas distintas a los IGFs.

4.2. La estructura de IGFBP-3

De las seis IGFBPs conocidas, IGFBP-3 es la más ampliamente estudiada, siendo objeto de numerosas investigaciones en diversas especies, como humanos, ratones y ratas. Esta proteína está codificada por el gen *IGFBP3* ubicado en el cromosoma 7 en los humanos. Su precursor contiene una secuencia en el extremo N-terminal compuesta por 27 aminoácidos, la cual guía su secreción. Esta secuencia es eliminada cuando la cadena polipeptídica en formación de IGFBP-3 entra al retículo endoplasmático, en donde prosigue su procesamiento final. Una vez madura, IGFBP-3 consta de 264 aminoácidos y tiene un peso molecular de 28.7 kDa. Su estructura está organizada en tres dominios como el resto de IGFBPs: el N-terminal, la región central o de enlace, y el C-terminal (**Figura 17**). De estos, la región central es menos conservada, mientras que los extremos N-terminal y C-terminal son ricos en cisteína y altamente conservados. El dominio N-terminal posee 12 residuos de cisteína que forman 6 puentes disulfuro intradominio,

mientras que el dominio C-terminal contiene 6 cisteínas que a su vez forman 3 puentes disulfuro específicos, lo que contribuye a la estabilidad de la estructura de la proteína.

En la forma madura de IGFBP-3, el dominio N-terminal está compuesto por 87 aminoácidos después del péptido señal, y aproximadamente el 60% de su secuencia de aminoácidos es idéntica o altamente similar a los dominios N-terminal de las otras IGFBPs. Este dominio alberga residuos clave para la unión con IGF, y se ha demostrado que las mutaciones que sustituyen tres aminoácidos en esta región (I56, L80 y L81) por glicina (G56, G80 y G51) afectan negativamente a la capacidad del IGFBP-3 para unirse a IGF. Aunque no se han identificado otros motivos funcionales en el dominio N-terminal, se ha observado que los fragmentos proteolíticos de la región amino-terminal de IGFBP-3 pueden interrumpir la función mitogénica independiente de IGF, lo que sugiere que podría existir otro subdominio aún no identificado en esta región.

Por otro lado, la región central de IGFBP-3 contiene 96 aminoácidos, que abarca desde el residuo 88 al 183, y que comparte menos del 15% de similitud de secuencia con otras proteínas de la superfamilia IGFBP. Este dominio, que conecta la región N-terminal con la C-terminal, no está involucrado en la unión a IGF, pero sí en la interacción con receptores de membrana celular, como con la proteína transmembrana 219 (TMEM 219, del inglés *transmembrane protein 219*), permitiendo que el IGFBP-3 ejerza un efecto tipo receptor-ligando. Además, en esta región se han identificado varias modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, la fosforilación y la proteólisis, que pueden influir en sus interacciones celulares tanto dependientes como independientes de IGF. Se han localizado tres sitios de glicosilación en los residuos de asparagina 89, 109 y 172; cinco sitios de fosforilación en los residuos de serina 111, 113, 156 y 165 y en el residuo de treonina 170; así como sitios de hidrólisis de metaloproteinasas y serina proteasas.

Por último, el dominio C-terminal de IGFBP-3, al igual que el N-terminal, es crucial para la unión al IGF. El hecho de que los residuos responsables de esta interacción se encuentren en ambos extremos de la proteína sugiere que su conformación genera un “bolsillo” en el que ambos dominios interactúan, facilitando así una unión eficiente con el IGF. Este dominio también contiene una secuencia de localización nuclear (NLS, del inglés *nuclear localization signal*) que facilita su transporte al núcleo. Además, presenta sitios de unión a transferrina, GAGs, heparina, un dominio de unión a metales y un sitio de unión a ALS, lo que le permite participar en la captación celular, el transporte nuclear

y la regulación de funciones celulares esenciales. En conjunto, el dominio C-terminal de IGFBP-3, además de compartir similitudes estructural con la tiroglobulina, juega un papel clave en la captación y localización de la proteína dentro de las células, facilitando sus diversas funciones de transporte y señalización intracelular.

En resumen, IGFBP-3 tiene una estructura adaptada para realizar múltiples funciones celulares y moleculares, tanto dependientes de IGF como independientes. Esta proteína regula procesos fundamentales como la proliferación y diferenciación celular, esenciales para el crecimiento y desarrollo de tejidos y órganos, y puede influir en distintos contextos fisiológicos, incluyendo el desarrollo del cáncer.

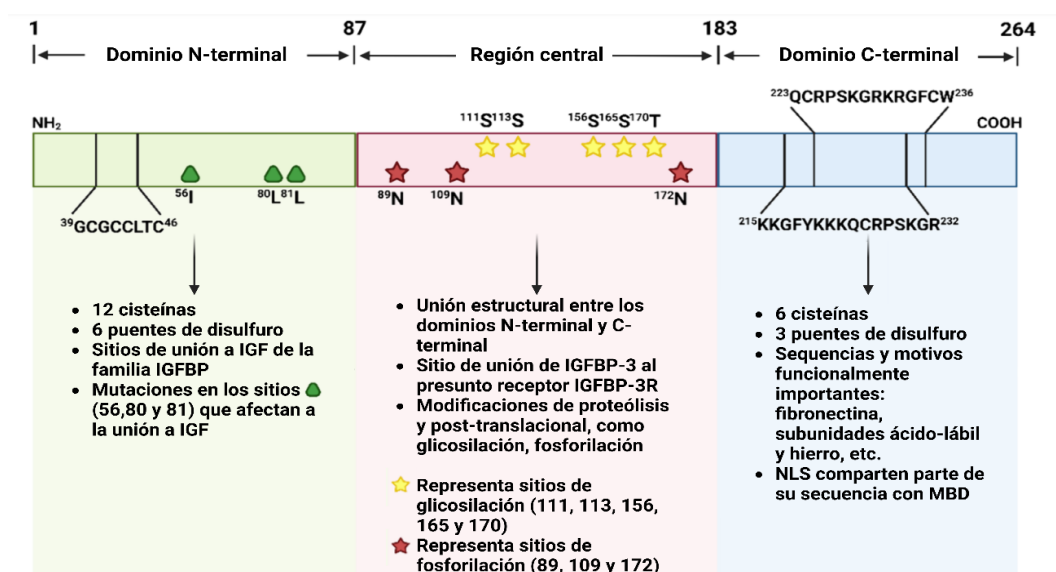


Figura 17. Representación de la estructura molecular de IGFBP-3. La molécula de IGFBP-3 se compone de tres dominios estructurales diferenciados: el dominio N-terminal, que abarca los aminoácidos 1 a 87; el dominio intermedio, que se extiende de los aminoácidos 88 a 183; y el dominio C-terminal, que incluye los aminoácidos 184 a 264. Cada uno de estos dominios cumple una función biológica distinta. Figura adaptada de (208).

4.3. Acciones de IGFBP-3 dependientes de IGF

En sus funciones dependientes de IGF, IGFBP-3 desempeña un papel central en la regulación de los IGFs, modulando tanto su disponibilidad como su actividad biológica en el entorno extracelular. Es la proteína de unión a IGF más abundante en circulación, ligándose aproximadamente al 80% del IGF-I. Por ejemplo, en contextos específicos como la enfermedad de Alzheimer, un aumento en los niveles de IGFBP-3 se asocia con una reducción en la biodisponibilidad de IGF-I en el cerebro, contribuyendo así al deterioro cognitivo (209). En el sistema circulatorio, IGFBP-3 forma complejos ternarios

con los IGFs y con ALS, lo que estabiliza y prolonga la vida media de ambos. Estos complejos no solo facilitan el transporte de los IGFs en el organismo, sino que también controlan su acceso a los receptores de membrana, en particular a IGF-IR, modulando así su activación. Para ello, el complejo ternario se degrada por la acción de las MMPs o a través de la asociación de IGFBP-3 a los GAGs.

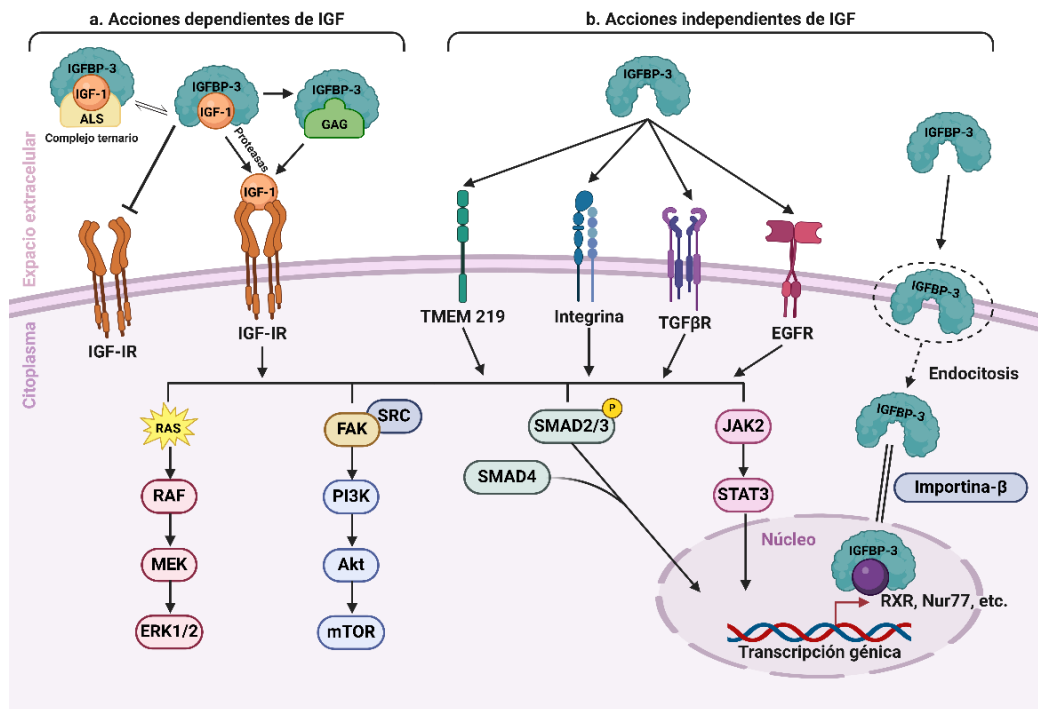


Figura 18. Ilustración de las funciones de IGFBP-3 dependientes e independientes de IGF.

a. IGFBP-3 forma un complejo ternario con IGF y subunidades lábiles al ácido (ALS), que puede disociarse por la acción de proteasas o a través de su interacción con glucosaminoglicanos (GAGs). **b.** IGFBP-3 interactúa de manera independiente de IGF con otros sistemas de factores de crecimiento, como TGF- β y EGF, así como con ligandos de integrinas. Estas interacciones activan múltiples vías de señalización intracelular, regulando procesos como la apoptosis, la diferenciación celular y la angiogénesis. Además, IGFBP-3 puede entrar en el citoplasma en forma citosólica, y su transporte al núcleo está mediado por importina- β . Una vez en el núcleo, IGFBP-3 modula la transcripción génica mediante su unión a receptores nucleares, como RXR y Nur77, contribuyendo así a efectos biológicos específicos. Figura adaptada de (208).

Cuando IGF-I o IGF-II se unen a IGF-IR, este receptor de tirosina quinasa se autofosforila y activa las cascadas de señalización intracelular asociadas, como la vía PI3K/AKT/mTOR y la vía MAPK, que son fundamentales para el crecimiento, proliferación y supervivencia celular. La vía PI3K/AKT/mTOR regula funciones clave en el metabolismo celular y supervivencia celular, con mTOR desempeñando un rol central en la proliferación, el crecimiento celular y la síntesis de proteínas. Por otro lado,

la vía MAPK, que incluye una cascada de fosforilación que incluye RAF (del inglés, *rapidly accelerated fibrosarcoma*), MEK (del inglés, *mitogen-activated protein kinase*) y ERK (del inglés, *extracellular signal-regulated kinase*), se asocia con la proliferación celular, la diferenciación y la respuesta al estrés. Además, ambas vías pueden interactuar y modularse mutuamente. Por ejemplo, la activación de AKT puede inhibir componentes de la vía MAPK y viceversa, en función del contexto celular y los estímulos presentes (**Figura 18a**).

4.4. Acciones de IGFBP-3 independientes de IGF

IGFBP-3 cumple diversas funciones independientes del eje IGF/IGF-1R, regulando procesos celulares clave sin depender de su unión a los IGFs (**Figura 18b**). Estas funciones abarcan interacciones directas con componentes de la ECM y proteínas de la membrana plasmática, lo cual contribuye a la proliferación, diferenciación y migración celular en escenarios distintos, como el desarrollo y el cáncer.

A nivel subcelular, IGFBP-3 contiene dominios estructurales que le permiten ubicarse en el citoplasma y translocarse al núcleo. En el citoplasma, se ha descrito que IGFBP-3 puede interactuar con proteínas intracelulares y modular diversas vías de señalización que afectan a la proliferación, diferenciación celular, crecimiento y angiogénesis. Además, IGFBP-3 es capaz de entrar al núcleo, transportado por importina- β , donde se une a receptores nucleares como RXR (del inglés, *retinoid x receptor*) y Nur77, regulando la expresión de genes específicos.

Los mecanismos detrás de estas funciones siguen siendo objeto de investigación, pues pueden ser diferentes dependiendo del contexto celular; sin embargo, las evidencias actuales sugieren que IGFBP-3 puede interactuar con distintas proteínas de señalización en la membrana celular, en el citoplasma y en el núcleo, adaptándose a las necesidades del entorno (**Figura 19**). En el siguiente subapartado, hablaremos de la interacción de IGFBP-3 con la señal de traducción de la vía del TGF- β /Smad, relevante para el tema de esta tesis.

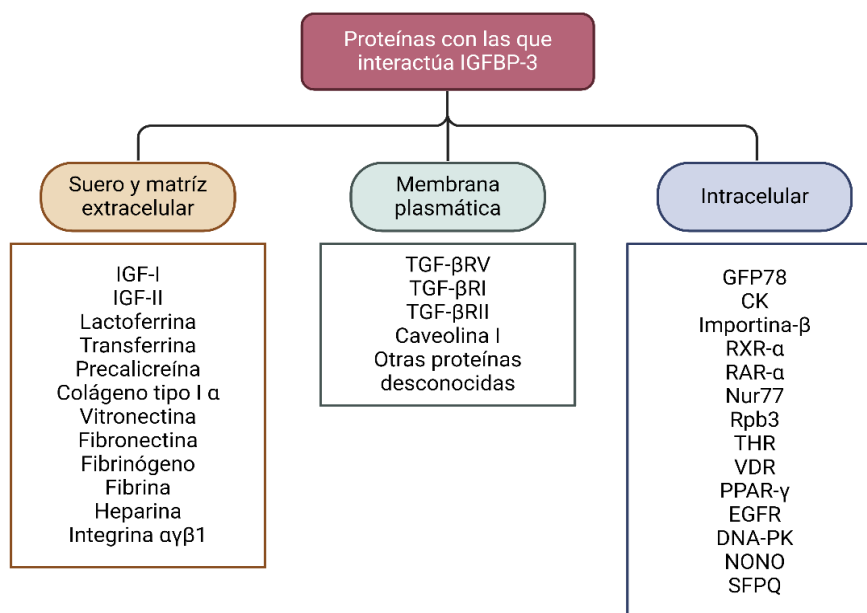


Figura 19. Diagrama de las interacciones de IGFBP-3. Se muestran las proteínas que interactúan con IGFBP-3, agrupadas en función de la localización extracelular, de membrana plasmática e intracelular. Figura adaptada de (210).

4.4.1. Interacción de IGFBP-3 con la vía de señalización TGF-β/Smad

IGFBP-3 interactúa con la vía de señalización TGF-β, desempeñando un papel clave en la regulación de la proliferación celular, apoptosis y otros procesos de diferenciación celular. Este mecanismo se inicia cuando TGF-β se une a su receptor tipo II (TGF-βRII, del inglés *TGF-β receptor II*), que luego recluta y fosforila al receptor tipo I (TGF-βRI del inglés *TGF-β receptor I*), activando así una cascada de señalización. Este complejo activa los factores de transcripción SMAD2 y SMAD3, que al fosforilarse se asocian con SMAD4 y se translocan al núcleo para regular la transcripción génica. En células de cáncer de mama T47D, que carecen de TGF-βRII y, por lo tanto, son insensibles a TGF-β, la sobreexpresión de IGFBP-3 detiene la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, disminuyendo la proliferación. Sin embargo, IGFBP-3 exógeno no logra inhibir el crecimiento de estas células sin TGF-βRII, lo que sugiere que la señalización de TGF-β es crítica para este efecto. Al restaurar TGF-βRII en estas células, se recupera la capacidad de IGFBP-3 para inhibir el crecimiento, destacando la importancia de la colaboración entre IGFBP-3 y la señalización de TGF-β en la regulación celular.

Curiosamente, en contraste con su efecto en la vía de TGF-β, IGFBP-3 también ha demostrado inhibir la fosforilación de Smad inducida por BMP2 (del inglés *bone morphogenetic protein 2*) en embriones de pez cebra (211). Las BMPs son una serie de

factores de señalización miembros de la superfamilia TGF- β que activan la vía de Smad. En estudios realizados con células estromales del endometrio humano, se ha demostrado que la expresión de IGFBP-3 es inducida indirectamente por BMP2 a través de ID1 (del inglés *inhibitor of DNA binding 1*), lo que permite a IGFBP-3 facilitar la migración celular y contribuir a la remodelación endometrial (212). Esta capacidad de IGFBP-3 para modular múltiples vías de señalización, dependiendo del receptor y del entorno celular, subraya su versatilidad en la regulación de procesos celulares, incluidos su papel en el desarrollo y progresión del cáncer.

4.5. El papel de IGFBP-3 en el desarrollo embrionario

IGFBP-3 desempeña diversas funciones biológicas dependiendo del entorno celular y los contextos fisiológicos en los que se encuentre. Entre estas funciones, destaca su papel fundamental en el desarrollo embrionario.

Se ha descrito que IGFBP-3 participa en la regulación y el transporte de los IGF durante el desarrollo embrionario temprano en el humano. En este contexto, se ha observado que los niveles de IGFBP-3 son significativamente más altos en el líquido extraembrionario coelómico y en el suero materno en comparación con el líquido amniótico. Aunque los niveles de IGFBP-3 no cambian significativamente con la edad gestacional en el líquido extraembrionario coelómico y el suero materno, se ha identificado la presencia de una proteasa específica de IGFBP-3 en estos fluidos. Esta proteasa modula la actividad de IGFBP-3 mediante su proteólisis, lo que reduce la afinidad de IGFBP-3 por los IGFs. Este procesamiento influiría en la disponibilidad y la función de los IGFs, afectando así la regulación de las células durante el embarazo y, en última instancia, contribuyendo al desarrollo embrionario (213).

En el contexto de la maduración del oocito y del desarrollo temprano del embrión humano. Se ha observado que los niveles elevados de IGFBP-3 en el fluido folicular en el momento en el que se extrae el oocito para su fecundación *in vitro*, están significativamente relacionados con una mejor calidad del embrión a las 48 horas post-fertilización, lo que sugiere que IGFBP-3 tiene un papel positivo en la maduración del oocito y en el desarrollo temprano del embrión hasta el segundo día. Junto con IGFBP-4, los altos niveles de IGFBP-3 en el fluido folicular, se correlacionaron con una mayor tasa de fertilización exitosa y un mejor desarrollo embrionario temprano (214).

Asimismo, también se conoce que IGFBP-3 está regulado negativamente por el factor de transcripción CDX2 (del inglés, *caudal type homeobox 2*), el cual se une al promotor del gen *IGFBP3* y reprime su transcripción, expresión y secreción (215). CDX2, conocido por su rol en la diferenciación de trofoblastos, podría ser clave en la producción y funciones biológicas de IGFBP-3 en la placenta. El único miembro de la familia de IGFBPs producido por los trofoblastos es el IGFBP-3, que también secretan una proteasa de IGFBP-3, lo que sugiere una regulación adicional de su actividad. En conjunto, CDX2 podría desempeñar un papel crucial en la modulación de IGFBP-3 durante la diferenciación trofoblástica (216).

En otras especies, IGFBP-3 regula la proliferación y la diferenciación de las células embrionarias, concretamente en las células miogénicas embrionarias porcinas. Se ha descrito que, cuando estas células son tratadas con TGF- β 1, IGFBP-3 actúa de forma independiente a los IGFs y se transloca al núcleo, provocando la inhibición de la proliferación celular. Además, cuando las células reciben señales de IGF-I para diferenciarse, IGFBP-3 modula esta señalización, inhibiendo la diferenciación de las células miogénicas (217).

4.6. El papel de IGFBP-3 en la diferenciación celular

Además de su función en el transporte y regulación de IGFs, IGFBP-3 está implicado en la regulación de la diferenciación celular en diversos tejidos, como en los adipocitos y las células endoteliales. En las células preadipocíticas 3T3-L1, el IGFBP-3 exógeno juega un papel inhibitorio en la adipogénesis, un proceso en el que los preadipocitos se diferencian en adipocitos maduros. Este efecto inhibitorio se logra a través de la activación de la vía SMAD2/3 medida por TGF- β , lo que limita la diferenciación de las células hacia el fenotipo adipocítico. A pesar de que el IGFBP-3 exógeno no muestra un efecto adicional cuando se combina con TGF- β 1, ambos parecen actuar en la misma vía de señalización, inhibiendo la expresión de marcadores adipogénicos como adiponectina y resistina. Por otro lado, el IGFBP-3 endógeno, que es la forma natural de IGFBP-3 en las células, tiene un rol regulador en la respuesta de las células a TGF- β . Cuando el IGFBP-3 endógeno es reducido, se observa que el efecto inhibitorio de TGF- β 1 sobre la adipogénesis es parcialmente revertido. Esto sugiere que el IGFBP-3 endógeno modula la sensibilidad de las células a los efectos inhibitorios de TGF- β , facilitando la diferenciación adipogénica bajo condiciones específicas. En conjunto, el

IGFBP-3 exógeno inhibe la adipogénesis al activar la vía de señalización SMAD2/3 de TGF- β , mientras que el IGFBP-3 endógeno parece regular la sensibilidad de las células a esta señalización, permitiendo la diferenciación adipogénica bajo ciertas condiciones (218).

En otro contexto celular, IGFBP-3 también juega un papel crucial en la diferenciación, concretamente en el de células precursoras endoteliales CD34⁺ (del inglés, *cluster of differentiation 34*), que son responsables de la formación de vasos sanguíneos. Cuando las células precursoras endoteliales son expuestas a IGFBP-3, se produce una rápida diferenciación hacia células endoteliales, un aumento de la migración celular y la formación de tubos capilares, lo que indica que IGFBP-3 no solo regula la diferenciación celular, sino que también favorece la angiogénesis (219).

4.7. El papel de IGFBP-3 en el cáncer

El efecto de IGFBP-3 en el cáncer es un tema de gran relevancia y complejidad, ya que desempeña un doble papel: en algunos tipos de cáncer actúa como inhibidor tumoral, mientras que en otros funciona como promotor del tumor. Este comportamiento también varía según se trate de IGFBP-3 en su forma endógena o exógena. En ciertos cánceres, como de vejiga, mama y próstata, IGFBP-3 tiene un efecto antitumoral, induciendo apoptosis e inhibiendo el crecimiento celular (220, 221). Sin embargo, en otros tipos de cáncer, como el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y el glioblastoma, su sobreexpresión está asociada con peores pronósticos, lo que sugiere que IGFBP-3 puede promover el crecimiento tumoral en ciertos contextos (222).

En el glioblastoma, se encontró que la estimulación de EGFRvIII (del inglés, EGFR variant III) inducida por TGF- β provoca un aumento en la expresión de IGFBP-3 a través de las vías de señalización de Smad, ERK y AKT. IGFBP-3, al estar elevado, contribuye a reforzar la actividad de TGF- β y EGFRvIII, promoviendo el comportamiento maligno característico de este tipo de células tumorales. La inhibición de IGFBP-3, por otro lado, reduce la activación de estas vías de señalización y, con ello, disminuye la agresividad del tumor. Estos resultados sugieren la existencia de un bucle de retroalimentación positivo en el que IGFBP-3 refuerza los efectos de TGF- β y EGFRvIII, impulsando aún más la progresión tumoral en el glioblastoma (223).

Además, IGFBP-3 juega un papel crucial en la metástasis. Por ejemplo, su expresión elevada puede facilitar la metástasis cerebral en el adenocarcinoma pulmonar, un proceso clave en la invasión y diseminación de las células tumorales (224). Los mecanismos que subyacen a estos efectos duales incluyen tanto vías dependientes de IGF como vías independientes de IGF, que activan cascadas de señalización que regulan el crecimiento celular, la supervivencia y la metástasis.

Por tanto, el potencial de IGFBP-3 en la oncología clínica es significativo, ya que podría actuar como un marcador pronóstico, ayudando a evaluar la agresividad de los tumores y guiando las decisiones terapéuticas. Por otro lado, aunque su regulación terapéutica aún está en estudio, la modulación de su expresión o actividad podría inhibir el crecimiento tumoral y desarrollar nuevas estrategias de tratamiento.

5. Los microARNs

5.1. Clasificación de los ARNs no codificantes

Antes de la finalización del Proyecto Genoma Humano en 2003, se asumía que la complejidad del ser humano como organismo estaba directamente relacionada con el número de genes que codificaban proteínas. Sin embargo, esta idea fue descartada tras el análisis completo del genoma humano, que reveló que los humanos poseen entre 20.000 y 25.000 genes, una cifra similar a la de organismos más simples, como el gusano redondo *Caenorhabditis elegans*, que cuenta con cerca de 20.000 genes (225, 226). Solamente entre el 1.5% y el 2% del genoma humano corresponde a genes codificadores de proteínas, por lo que se asumió que el resto del genoma carecía de función, siendo catalogado como “ADN basura”. Sin embargo, investigaciones posteriores como el proyecto ENCODE, demostraron que al menos el 80% del genoma humano es biológicamente activo y se transcribe en ARN (ácido ribonucleico) (227). La mayoría de estos transcritos de ARN no están destinados a la formación de una proteína funcional, y se clasifican como ARN no codificantes (ncARNs).

Los ncARNs son fundamentales en la regulación de diversos procesos celulares, como la transcripción, el empalme, la estabilidad y la traducción del ARN mensajero (ARNm). Además, su papel se extiende más allá de las funciones normales de la célula, ya que también están involucrados en la regulación de condiciones patológicas como el cáncer, los trastornos neurodegenerativos y las enfermedades metabólicas (228). Los ncARNs se clasifican en distintas categorías en función de su longitud, biogénesis, orientación (sentido o antisentido) y funciones biológicas (229, 230). Dentro de esta clasificación, destacan dos grupos principales: los ncARNs largos (lncARNs), y los ncARNs pequeños.

Los lncARNs incluyen moléculas con más de 200 nucleótidos de longitud y cumplen sus funciones directamente, sin requerir de un procesamiento previo. Participan en la regulación de la expresión génica a través de diversos mecanismos, como la modulación de la estructura de la cromatina, la regulación de la transcripción y el control del procesamiento del ARN (231). Entre ellos, destacan los lncARNs intergénicos (lincARNs) y los ARNs circulares (circARNs).

Por otra parte, los ncARNs pequeños tienen una longitud de aproximadamente 20-30 nucleótidos y derivan de precursores más largos (229). En este grupo se incluyen los microARNs (miARNs), que regulan la expresión génica uniéndose de manera complementaria al ARNm y promoviendo su degradación o inhibiendo su traducción (232); los ARN pequeños de interferencia (siARNs), involucrados en el silenciamiento génico, dirigen la degradación específica de ARNm mediante mecanismos de interferencia de ARN (233); y los ARNs interactuantes con PIWI (piARNs), los cuales regulan la actividad de los elementos transponibles y tienen un papel crucial en la protección del genoma germinal (234).

Además, los ARN ribosomales (ARNr) y otros ncARNs de "mantenimiento" desempeñan funciones estructurales y catalíticas fundamentales. Los ARNr forman parte esencial del ribosoma y están implicados en la síntesis de proteínas (235), mientras que otros ARN pequeños, como los ARN nucleolares pequeños (snoARNs), participan en la modificación química y el procesamiento de otros ARN (236).

5.2. Función y biogénesis de los microARNs

Los miARNs son moléculas de ncARNs de entre 22 a 24 nucleótidos de longitud, que se encuentran en todas las células eucariotas y están altamente conservadas. Su función principal es la regulación postranscripcional de la expresión génica (237). Para ello, los miARNs se unen a secuencias complementarias en los ARNm objetivo, denominadas elementos de respuesta a miARN (MREs, del inglés *microRNA response elements*), lo que provoca la inhibición de la traducción o la degradación del ARNm (238).

El origen de los miARNs comienza a partir de transcritos primarios, los pri-miARNs, que pueden contener la información para la síntesis de una sola proteína (monocistrónicos) o de múltiples proteínas (policistrónicos). Estos transcritos pueden ser codificados tanto por intrones de genes codificantes como no codificantes, o incluso por algunas regiones exónicas (239). Los pri-miARNs son transcritos por la ARN polimerasa II, lo que implica que contienen una caperuza m7G en su extremo 5' y una cola poli(A) en su región no traducida 3', diferenciándolos de otros tipos de ncARNs (240). En el núcleo, el pri-miARN es procesado por la RNasa III Drosha, en un complejo con la proteína DGCR8, la cual actúa como una guía para el corte. El producto resultante es un precursor de miARN en forma de horquilla (pre-miARN), que tiene aproximadamente 65

nucleótidos de longitud. Este pre-miARN es exportado al citoplasma mediante la proteína Exportina-5 dependiente de GTP (241).

Una vez en el citoplasma, el pre-miARN es procesado por la RNasa III DICER, que corta la horquilla para generar un miARN de cadena doble. DICER, junto con la proteína TRBP, forma un complejo que incorpora el miARN de cadena sencilla al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, del inglés *RNA-induced silencing complex*), que incluye la proteína Argonata 2 (Ago2). Este complejo RISC facilita el reconocimiento y la unión del miARN maduro a los sitios de respuesta en los ARNm objetivo (242). El reconocimiento específico del objetivo se basa en la "secuencia semilla", una región conservada en el miARN que se empareja con la región no traducida 3' del ARNm objetivo, particularmente entre los nucleótidos 2-7 (243). Esta interacción miARN/ARNm impide la traducción del ARNm y puede inducir su degradación (**Figura 20**).

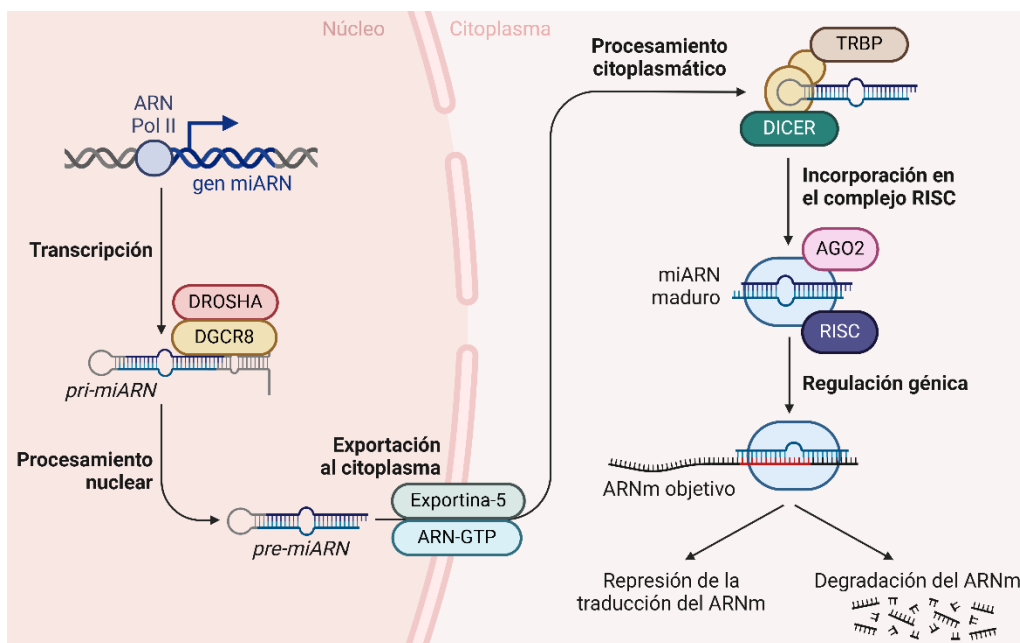


Figura 20. Ilustración de la biogénesis de los microARNs (miARNs). El procesamiento de los miARNs comienza con la transcripción del pri-miARN en el núcleo, seguido de su procesamiento por el complejo Drosha-DGCR8 para generar el pre-miARN. Este precursor es exportado al citoplasma mediante la Exportina-5, en donde DICER lo corta para formar un dúplex de ARN. Finalmente, la hebra guía se incorpora al complejo RISC, permitiendo la regulación de la expresión génica mediante el silenciamiento de ARNm específicos (244). Figura creada con BioRender.com.

5.3. El papel de los microARNs en el desarrollo pulmonar embrionario y en el cáncer de pulmón

Los miARNs desempeñan un papel crucial tanto en el desarrollo embrionario del pulmón como en la patogénesis de enfermedades pulmonares, incluido el cáncer. Estas pequeñas moléculas reguladoras afectan a cientos de genes objetivo, lo que les otorga una capacidad única para influir en numerosas vías celulares, como aquellas relacionadas con procesos de desarrollo, regulación de células madre y oncogénesis.

Durante el desarrollo pulmonar, los miARNs interactúan con diversas vías de señalización para regular procesos clave como la proliferación y la diferenciación celular. Sin embargo, la mayoría de los estudios de perfiles de expresión de miARNs se han realizado en pulmones de ratón o rata, mientras que los estudios en muestras embrionarias humanas son limitados (245). Como se explicó al comienzo de la introducción, en la etapa pseudoglandular del desarrollo pulmonar humano predominan células progenitoras epiteliales no diferenciadas. En esta etapa, la señalización paracrina entre el mesénquima y el epitelio no diferenciado activa la morfogénesis de la ramificación pulmonar. Estudios han demostrado que, durante este periodo en humanos, los miembros del clúster miR-17–92 se encuentran altamente expresados, por lo que participarían promoviendo la proliferación celular e inhibiendo la diferenciación, al igual que ocurre en modelos murinos. Por otro lado, los miARNs de la familia let-7 se encuentran subexpresados, lo que podría evitar la supresión de genes asociados con la proliferación, facilitando así este proceso (234).

Así como los miARNs desempeñan un papel esencial durante el desarrollo embrionario, también son fundamentales en la carcinogénesis. En el contexto del cáncer, las alteraciones en la expresión de los miARNs pueden tener efectos significativos: algunos pueden promover el crecimiento tumoral actuando como protooncogenes, mientras que otros, cuando sus niveles son reducidos, pueden funcionar como supresores tumorales (246). Diversos estudios han demostrado que la expresión anómala de los miARNs es esencial en todas las etapas de la enfermedad, desde su inicio hasta la progresión, metástasis y resistencia a tratamientos (238, 247). Además, se ha comprobado que los miARNs poseen un gran potencial como biomarcadores para el diagnóstico temprano del cáncer de pulmón y para predecir la recaída de la enfermedad, como es el caso del miR-34a.

El miR-34a pertenece a la familia de miARNs miR-34, que forma parte de la red de p53, y cuya expresión es inducida directamente por p53 en respuesta a daños en el ADN o estrés oncogénico (248). En un estudio realizado con pacientes de CPCNP sometidos a resección quirúrgica sin tratamiento posterior hasta la recaída, se observó que los niveles bajos de miR-34a en el tejido tumoral se correlacionaban con una alta probabilidad de recaída. Asimismo, se encontró que la metilación del promotor del gen *MIRN34A* se asociaba con una disminución en la expresión de miR-34a. Los pacientes con mutaciones en *TP53* y niveles bajos de miR-34a presentaban la mayor probabilidad de recaída, por lo que miR-34a se podría utilizar como un marcador independiente para la predicción de recaídas en estos pacientes (249).

Además, el miR-34a desempeña un papel crucial como regulador negativo en las CSCs, particularmente en el CPCNP. En estudios recientes, se ha encontrado que el miR-34a muestra niveles de expresión reducidos en células de CPCNP, y su alteración contribuye a la tumorigénesis. En investigaciones realizadas con tres líneas celulares de CPCNP (A549, H460 y H1299), la transfección de miR-34a redujo la formación de clones, la expansión clonogénica y la regeneración tumoral en modelos *in vivo*. Asimismo, en células H460 purificadas con alta expresión de CD44 (un marcador característico de células madre), al sobreexpresar miR-34a mediante un vector lentiviral se inhibió el crecimiento tumoral. Por el contrario, la supresión de miR-34a mediante oligonucleótidos antisentido (ASOs, del inglés *antisense oligonucleotides*) en células con baja expresión de CD44 (del inglés, *cluster of differentiation 44*) promovió el desarrollo tumoral (250). Estos resultados refuerzan la potencial utilidad del miR-34a como una posible terapia dirigida para el tratamiento del CPCNP, al ofrecer una nueva estrategia para combatir la tumorigénesis y la recurrencia en este cáncer.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

La hipótesis de la presente tesis se basa en las siguientes premisas:

1. Durante la etapa pseudoglandular del desarrollo embrionario del pulmón, se producen importantes cambios tanto morfológicos e histológicos como moleculares, los cuales están asociados a la ramificación del árbol bronquial y al crecimiento y maduración del mesénquima acompañante.
2. Podemos diferenciar una etapa pseudoglandular temprana (semana 8), en la que se forman yemas bronquiales primitivas compuestas por túbulos simples revestidos por una gruesa capa de epitelio y rodeados por un mesénquima laxo. Estas yemas bronquiales experimentan una ramificación progresiva, lo que da lugar a generaciones cada vez mayores de vías respiratorias, caracterizadas inicialmente por un epitelio pseudoestratificado que, en la etapa pseudoglandular tardía (semana 12), queda revestido por un epitelio respiratorio columnar simple. Posteriormente, las células epiteliales se diferenciarán en células ciliadas, caliciformes y basales, rodeadas de un mesénquima con una red capilar simple.
3. Los cambios moleculares de expresión génica y de ARNs no codificantes han sido poco estudiados en muestras embrionarias humanas, y no se conocen con certeza las implicaciones funcionales de su desregulación en humanos.
4. Durante el desarrollo tumoral, se han identificado con frecuencia vías moleculares desreguladas que son relevantes para el desarrollo embrionario del mismo órgano.
5. Los organoides pulmonares son modelos tridimensionales que replican las características histológicas, funcionales y estructurales del tejido pulmonar.

Hipótesis: El estudio de los perfiles de expresión génica y de microARNs que regulan el desarrollo pulmonar humano puede permitir la identificación de nuevas vías moleculares relevantes, útiles para una mejor comprensión de la embriología humana, las enfermedades pulmonares y el cáncer de pulmón. El uso de organoides de pulmones embrionarios humanos permitirá verificar la relevancia funcional de los genes identificados, mientras que el desarrollo de modelos de organoides derivados de pacientes con cáncer de pulmón facilitará la validación de la importancia de las vías identificadas en el proceso de tumorigénesis.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Basándonos en la hipótesis anteriormente planteada, establecemos los siguiente objetivos generales y específicos:

1. Objetivos generales:

1. Caracterizar los perfiles moleculares, génicos y de microARNs relevantes del desarrollo pulmonar humano durante la etapa pseudoglandular.
2. Desarrollar modelos de organoides de pulmones embrionarios humanos y de pacientes con cáncer de pulmón para el estudio de la relevancia funcional de los genes identificados.

2. Objetivos específicos:

1. Analizar los perfiles de expresión génica mediante arrays de expresión para identificar genes diferencialmente expresados entre la etapa pseudoglandular temprana y tardía.
2. Evaluar las interacciones entre los genes identificados y determinar las vías moleculares que intervienen en el proceso de diferenciación pulmonar.
3. Analizar los perfiles de expresión de microARNs diferencialmente expresados entre la etapa pseudoglandular temprana y tardía.
4. Identificar las posibles interacciones entre genes y microARNs identificados.
5. Establecer organoides de pulmones embrionarios humanos y determinar sus condiciones de cultivo óptimas.
6. Realizar estudios funcionales en organoides de pulmonares embrionarios humanos para validar la relevancia funcional de los genes/microARNs identificados.
7. Desarrollar organoides derivados de pacientes con cáncer de pulmón y evaluar sus condiciones de cultivo óptimas para facilitar la potencial translación de los resultados obtenidos en el análisis de la embriogénesis al estudio del cáncer de pulmón.
8. Proponer recomendaciones para la selección del medio de cultivo, según los objetivos de estudio, en investigaciones sobre enfermedades pulmonares y aplicaciones en medicina personalizada.

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

1. Primer artículo:

“Discovering genes and microRNAs involved in human lung development unveils IGFBP3/miR-34a dynamics and their relevance for alveolar differentiation”

Resumen

Introducción. La etapa pseudoglandular del desarrollo pulmonar humano se caracteriza por la presencia de túbulos simples revestidos por epitelio y rodeados por mesénquima, los cuales se ramifican para formar las vías respiratorias. Este proceso es impulsado por las interacciones dinámicas entre el epitelio y el mesénquima. Aunque los mecanismos moleculares subyacentes han sido caracterizados en modelos animales, los mecanismos moleculares específicos en humanos aún no se comprenden completamente.

Metodología. Se realizó un análisis del perfil de expresión génica y de miARNs en pulmones embrionarios humanos de 7 a 12 pcw. La localización de las proteínas correspondientes a los genes seleccionados se examinó mediante técnicas de inmunofluorescencia en cortes de tejido pulmonar embrionario. Mediante análisis bioinformáticos, se identificaron varias interacciones relevantes entre mARNs y miARNs, y su expresión fue evaluada en células epiteliales y mesenquimales purificadas, así como en estructuras específicas del árbol bronquial en desarrollo, como las *tips* y las *stalks*. Además, se llevaron a cabo experimentos de silenciamiento génico en células mesenquimales pulmonares y en organoides desarrollados a partir de *tips* de pulmones embrionarios humanos, complementados con ensayos de diferenciación de organoides. La expresión de los marcadores de pluripotencia y de diferenciación celular (en concreto, de las AT2 y AT1) se analizó mediante qRT-PCR (del inglés, *quantitative real-time polymerase chain reaction*). Paralelamente, se estudiaron las proteínas fosforiladas de la vía TGF- β utilizando arrays proteicos de membrana. Finalmente, los explantes pulmonares se cultivaron en condiciones de interfaz aire-líquido con y sin la adición de péptidos recombinantes.

Resultados: Se identificaron 88 genes diferencialmente expresados (DEG, del inglés, *differentially expressed genes*) durante la etapa pseudoglandular, destacando *IGFBP3*,

cuya expresión disminuyó de manera significativa a lo largo de las semanas analizadas. La expresión proteica de IGFBP-3 se localizó principalmente en el epitelio pulmonar, mientras que su ausencia en el mesénquima sugería una regulación postranscripcional. El análisis de miARNs identificó a miR-34a como un regulador potencial de *IGFBP3*. El silenciamiento de miR-34a en células mesenquimales resultó en un aumento de los niveles de IGFBP-3, confirmando su función como regulador negativo. Además, la reducción de *IGFBP3* fue esencial para favorecer la diferenciación alveolar, lo que se evidenció por un aumento en la expresión de genes específicos de AT1 y AT2, como *SFTPC* y *LAMP3* (del inglés, *lysosomal associated membrane protein 3*), acompañado con la inhibición de genes asociados a la pluripotencia, incluidos *SOX2*, *OCT4* (del inglés, *octamer-binding transcription factor 4*) y *NANOG*. Este proceso de diferenciación estuvo controlado por la inhibición de la señalización de TGF- β , a través de la inhibición de p-SMAD2, y por la activación de la vía BMP, representada por la activación de p-SMAD1.

Conclusiones: El estudio demuestra que miR-34a regula la expresión de *IGFBP3* en el epitelio pulmonar durante la etapa pseudoglandular. Esta regulación es crucial para la diferenciación alveolar, destacando la importancia de la dinámica *IGFBP3*/miR-34a en los procesos de desarrollo del epitelio pulmonar embrionario.

RESEARCH

Open Access



Discovering genes and microRNAs involved in human lung development unveils IGFBP3/miR-34a dynamics and their relevance for alveolar differentiation

Melissa Acosta-Plasencia^{1†}, Joan J. Castellano^{1,2†}, Tania Díaz¹, Yangyi He^{1,3}, Ramón M. Marrades^{4,5,6,7} and Alfons Navarro^{1,4,5*} 

Abstract

Background During pseudoglandular stage of the human lung development the primitive bronchial buds are initially conformed by simple tubules lined by endoderm-derived epithelium surrounded by mesenchyme, which will progressively branch into airways and start to form distal epithelial sacculles. For first time alveolar type II (AT2) pneumocytes appears. This study aims to characterize the genes and microRNAs involved in this differentiation process and decipher its role in the starting alveolar differentiation.

Methods Gene and microRNA profiling was performed in human embryonic lungs from 7 to 12 post conception weeks (pcw). Protein expression location of candidate genes were analyzed by immunofluorescence in embryonic lung tissue sections. mRNA/miRNA target pairs were identified using computational approaches and their expression was studied in purified epithelial/mesenchymal cell populations and in isolated tips and stalks from the bronchial tree. Additionally, silencing experiments in human embryonic lung mesenchymal cells and in human embryonic tip-derived lung organoids were performed, as well as organoid differentiation studies. AT2 cell markers were studied by qRT-PCR and by immunofluorescence. The TGFβ-β phosphorylated pathways was analyzed with membrane protein arrays. Lung explants were cultured in air/liquid interface with/without peptides.

Results We identified 88 differentially expressed genes, including IGFBP3. Although IGFBP3 mRNA was detected in both epithelial and mesenchymal populations, the protein was restricted to the epithelium, indicating post-transcriptional regulation preventing IGFBP3 protein expression in the mesenchyme. MicroRNA profiling identified miR-34a as an IGFBP3 regulator. miR-34a was up-regulated in mesenchymal cells, and its silencing in human embryonic lung mesenchymal cells increased IGFBP3 levels. Additionally, IGFBP3 expression showed a marked downregulation from 7 to 12 pcw, suggesting its involvement in the differentiation process. The differentiation of human tip-derived lung embryonic organoids showed a drastic reduction in IGFBP3, supported by the scRNAseq data. IGFBP3 silencing in organoids activated an alveolar-like differentiation process characterized by stem cell markers downregulation and upregulation of AT2 markers. This process was mediated by TGFβ signalling inhibition and BMP pathway activation.

[†]Melissa Acosta-Plasencia and Joan Josep Castellano have contributed equally to this work.

*Correspondence:
 Alfons Navarro
anavarroponz@ub.edu

Full list of author information is available at the end of the article

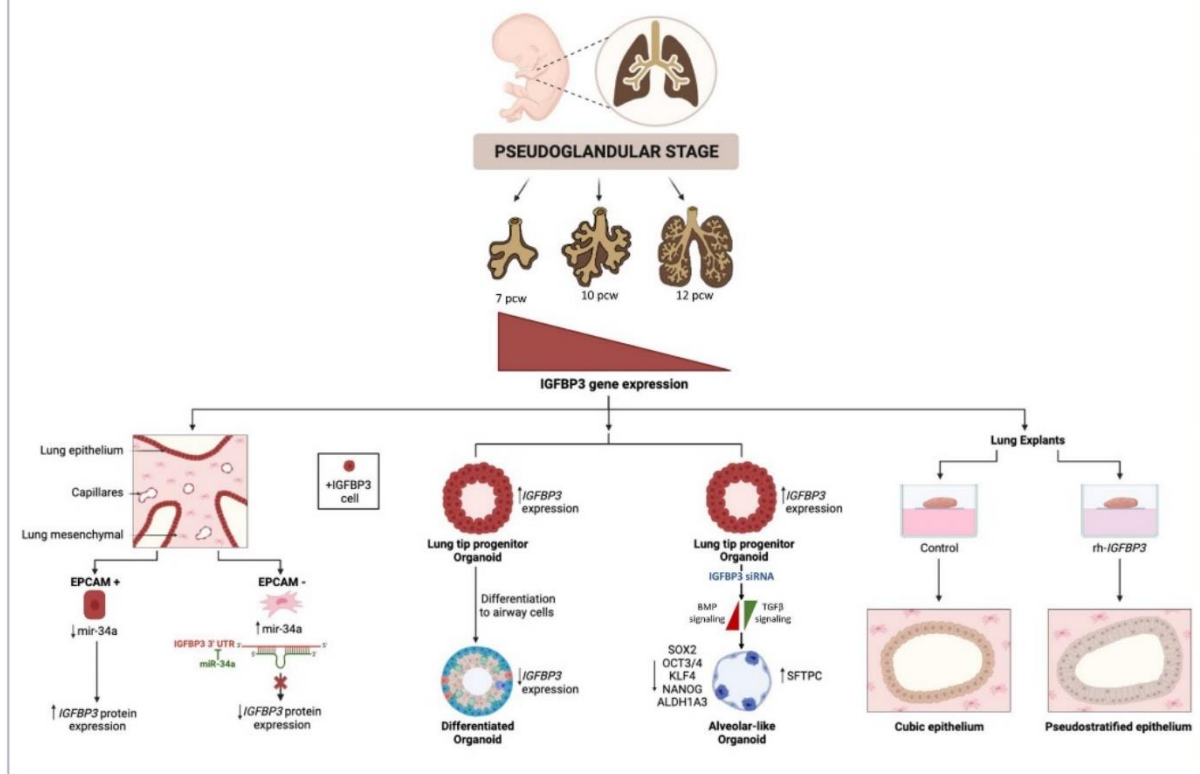


© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

Conclusions The IGFBP3/miR-34a axis restricts IGFBP3 expression in the embryonic undifferentiated lung epithelium, and the progressive downregulation of IGFBP3 during the pseudoglandular stage is required for alveolar differentiation.

Keywords Human lung embryogenesis, IGFBP3, miR-34a, Organoids, Mesenchyme, Epithelium, Tips, Stalks, Alveolospheres

Graphical abstract



Background

Human lung development begins at 3–4 post conception weeks (pcw) and can be divided into five stages according to major histological changes: embryonic (3–4 to 6–8 pcw), pseudoglandular (6–8 to 16 pcw), canalicular (16 to 26–28 pcw), saccular (26–28 to 32–36 pcw) and alveolar (32–36 to pcw to 2–4 years postnatal age) [1–3]. During the pseudoglandular stage, a gradual process of bronchial bud branching leads to the formation of successive generations of airways. Histologically, in the early pseudoglandular stage, the primitive bronchial buds are simple tubules lined by a thick layer of endoderm-derived epithelium, surrounded by abundant loose mesenchyme [1, 4]. These bronchial buds undergo progressive branching, resulting in increasing generations of airways initially characterized by a pseudostratified

epithelium, which, around 12 pcw (late pseudoglandular stage), becomes lined by a simple columnar respiratory epithelium [4, 5]. Later, the epithelial cells will differentiate into ciliated cells, goblet cells and basal cells, surrounded by mesenchyme with a simple capillary network [6]. This epithelium is notable for prominent subnuclear vacuolization, conferring a “pseudoglandular” appearance to these simple tubules [1].

At molecular level, numerous studies have demonstrated the importance of paracrine signaling coordination between mesenchyme and undifferentiated epithelium for normal cell differentiation and lung morphogenesis [7–10]. Although most studies have been performed in animal models, key differences have been reported recently in human lung development [9, 11] and organoid studies have begun to decipher the role of

molecular pathways directly in human samples [12–14]. Single-cell RNAseq has highlighted the existence of a proximal–distal gradient in epithelial differentiation and different niche regions in the mesenchymal compartment with distinct signaling interactions [15–18].

Despite these advancements, the number of studies using human embryonic samples remains limited. Additionally, variability among samples due to differences in gestational age measurement or interindividual differences necessitates further research and validation through functional studies. Moreover, many signaling networks have not been thoroughly studied, particularly the role of non-coding RNAs, including microRNAs (miRNAs), in regulating human lung development [4, 19, 20]. miRNAs are small non-coding RNA molecules (22–24 nucleotides in length) that negatively regulate the expression of their target genes post-transcriptionally, mainly by blocking the translation of messenger RNA (mRNA) into protein or degrading it [21, 22]. Furthermore, they have been described to play an important role in stem cell regulation [23, 24]. Most miRNA profile studies in lung development have been performed in rats [25, 26] or mouse fetal lungs [27–29], with few in human embryonic samples [4, 27, 30].

For the proper development of the human lung, coordination between epithelial cells and the surrounding mesenchyme is essential. Numerous molecules are involved in cell differentiation and morphological development of the lung, such as SOX2 and SOX9 genes, TGF β family and the WNT pathway. The insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) family comprises six secreted proteins (IGFBP1 to IGFBP6) that can bind and regulate the insulin-like growth factors (IGFs), which regulate cell proliferation, differentiation and survival [31]. IGFBP3 is the most abundant circulating IGFBP and can be found in the uterus, mammary gland, and placenta [32]. The mature IGFBP3 protein plays numerous key roles in the adult human by acting both in an IGF-dependent and -independent manner. It is known to interfere with TGF β /Smad signaling, inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis [33, 34]. IGFBP3 is a soluble protein that can participate in local and distal communication [35], highlighting its interest in development. Although most studies have been focused on the role of the soluble IGFBP3, different functions have been described for cellular IGFBP3, including the control of stemness and differentiation processes [36, 37].

In the present study, we investigated genes and miRNAs involved in the differentiation process during human pseudoglandular stage by studying human embryonic lungs from 8 to 12 pcw of development. During the analysis, we identified the interaction

between IGFBP3 and miR-34a and demonstrated that miR-34a mediated regulation restricted the expression of IGFBP3 protein to the epithelium, where it plays a role in the proximal–distal differentiation process. IGFBP3 silencing is essential for allowing alveolar differentiation.

Methods

Human embryonic samples

Twenty-five clinically aborted embryos and fetuses were donated with written informed consent to the Body Donation Service of the Human Anatomy and Embryology Unit of the Faculty of Medicine and Health Sciences of University of Barcelona for morphological and molecular studies. The samples included lungs from the 7th to the 13th pcw of development. Lung samples were obtained under control of an Olympus stereo microscope SZ61. The study was approved by the Bioethics Commission of the University of Barcelona (project approval number IRB00003099).

RNA extraction

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) as per the manufacturer's protocol. The RNA concentration was quantified using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer. The quality of total RNAs was estimated by Agilent 2100 Bioanalyzer using the RNA 6000 NANO kit. For the microarray study, only samples with RIN > 8 were included.

mRNA profiling

Global gene expression in 6 whole embryonic lung samples and 3 adult lung normal tissues were analyzed by Affymetrix GeneChip Human Gene 2.1 ST array in the Genomics core facility from IDIBAPS. Raw.cel files were provided which were used for further analysis. Bioinformatic analysis was performed using R version 4.1.1 and Bioconductor packages. Background correction, filtering and normalization were performed with robust multi-array analysis (RMA) method from oligo package (Bioconductor). Differential expression analysis was performed using *limma* package. Hierarchical cluster analysis of top differentially expressed genes (DEG) were plotted using *heatmap.2* from *gplots* package. Enrichment analysis for Gene Ontology (GO) terms was performed using topGO package from Bioconductor.

miRNA profiling

miRNA expression analysis was performed as previously described using TaqMan[®] Array Human MicroRNA Set Cards v2.0 (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) [38] that included 758 miRNAs. Real-time quantitative PCR reactions were performed on an ABI 7900 HT Sequence Detection System (ThermoFisher).

Relative miRNA expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Normalization was performed with miR-191, based on preliminary analyses comparing the stability of several endogenous controls including RNU6B, RNU24, RNU43, RNU44, RNU48 and MammU6 and potential endogenous miRNAs; miR-191 had the lowest variability. As calibrator sample, we used the mean miRNA value of an adult lung normal tissue. All miRNAs that were expressed in less than 10% of the samples or with an unreliable quantification were excluded from further analysis, leaving a final working set of 257 miRNAs.

miRNA target identification

RmiR package (Bioconductor version 2.6) was used to identify potential miRNA-mRNA pairs as previously performed [38]. Using RmiR we cross-correlate the expression data from the DEG mRNA signature with the whole miRNA expression data in the same embryonic samples (n=6), based on the predicted targets from TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) database. The identified mRNA/miRNA pairs with a minimum negative correlation of -0.4, were validated in all available embryonic samples (n=22) using single miRNA and miRNA assays by real time PCR.

Immunofluorescence

Formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue sections were pre-treated as follows: 5- μ m-thick tissue sections were mounted onto Dako Silanized Slides (Dako, Glostrup, Denmark). For dewaxing and antigen retrieval, the sections were manually immersed in Target Retrieval solution (S1699, Dako) and heated at 95–99 °C for 20 min in Dako PT Link instrument. Then the temperature was allowed to go down until 65 °C and then the slides were washed three times in PBS at room temperature (RT) for 5 min each.

Cultured mesenchymal cells were pre-treated as follows [10]: cells seeded on coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde in DPBS at RT followed by permeabilization with 0.5% of Triton X-100 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) in DPBS 1x (PBTx) at RT for 5 min.

Both, FFPE and Fixed cultured cells, were then blocked with 1% Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) and 5% Normal Donkey Serum (NDS) (Sigma-Aldrich, Sant Luis, Missouri, USA) in PBTx for 60 min at RT. After that they were incubated with primary antibodies (Table S1) diluted in blocking solution overnight at 4 °C in darkness. After primary antibody washing (3×5 min PBS), secondary antibodies (Table S1) diluted in 5% NDS in PBTx 0.1% were incubated for 2 h at RT in darkness. Finally, samples were stained and

mounted on microscope slides using Fluoroshield with DAPI (Sigma-Aldrich).

Immunofluorescence analysis was performed using Olympus BX51 Fluorescence Microscope (Olympus, Tokyo, Japan) and cell images were acquired by DPCController and DPManager software (Olympus).

Isolation of epithelial and mesenchymal enriched populations

Fetal lung samples were mechanically dissociated using a scalpel and enzymatically dissociated using Collagenase/Dispase (Cat N. 10,269,638,001, Roche; Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA) (45 min at 37 °C) and Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red (Cat N. 25,200,056, Life Technologies) (10 min at 37 °C). Then samples were loaded in a 15 mL tube and incubated with DMEM and DNase I (10 mL DMEM + 13.5 μ L DNase I) during 10 min in agitation. To remove cell clumps, the samples were filtered using a 100 μ m and a 40 μ m filter. Filtered samples were centrifuged for 5 min at 550 g at 4 °C and the cell pellet was washed with 1 mL of Buffer (PBS, pH 7.2, 0.5% BSA, 2 mM EDTA) and transferred to a 1.5 mL tube. Then, cells were centrifuged 5 min at 550g at 4 °C and the cell pellet was resuspended in 300 μ L of Buffer. After cell counting, 5×10^7 cells were used for further processing.

To perform the magnetic labelling, cells were mixed with 100 μ L FcR Blocking Reagent, human (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany). Then, 100 μ L CD326 (EPCAM) Microbeads (Miltenyi Biotec) were added and incubated during 30 min at 4 °C. After incubation, 1 mL of Buffer was added and samples were centrifuged at 300g for 10 min. The cell pellet was resuspended in 500 μ L of buffer.

To proceed with the magnetic separation, the MS columns (Miltenyi Biotec) were placed in the magnetic field and hydrated with 500 μ L of Buffer. Cell suspension was applied to the column, and we collected the flow-through containing the EPCAM- cells (mesenchymal enriched population). Then the MS column was washed three times with 500 μ L of Buffer.

Finally, we removed the MS column from the magnetic field and placed the column in a 1.5 mL collection tube. Then 500 μ L of buffer was added to recover the EPCAM+ cells (epithelial enriched population).

mRNA and single miRNA quantification

mRNA and miRNAs were quantified as previously described using TaqMan assays (the arrays used are shown Table S1) [39, 40].

Culture and transfection of lung mesenchymal cells

Human embryonic lung mesenchymal cells were obtained from the culture of the mesenchymal enriched population obtained after EPCAM $\pm$ microbead purification, and cultured as previously described [10].

One day before transfection, 7×10^4 cells were seeded in 6-well plates. The following day, cells were transfected with 200 nM miR-34a-ASO (5'-ACAACCAGCTAAGACACTGCCA-3') or ASO control (5'-GATACCAGGGACATACGCTTGATCCTAGC-3') using Lipofectamine 3000 (Life Technologies). After 24 h incubation, miR-34a levels were quantified to corroborate proper miR-34a inhibition.

Tips and stalks acquirement from human embryonic lungs

Human embryonic lung lobes were incubated in Dispase II 8U/mL (D4693, Merck Millipore) 30 min in ice followed by 15 min in an orbital mixer at room temperature. Mesenchyme was dissected away under a stereoscopic microscope using sterilized ophthalmic microsurgery instrumental and tungsten needles. Tips and stalks were isolated by cutting the very end of the branching tip and the stalk area more proximally, as it is indicated in Fig. 5a and Video S1. Obtained tips and stalks were processed for organoid culture (tips) and for RNA purification (tips and stalks).

Organoid culture

Human embryonic lung organoids were obtained from culture of lung tips. Immediately after obtention, tips were transferred into cold liquid Matrigel (Corning Matrigel Growth Factor Reduced Basement Membrane Matrix, Corning, NY, USA), and then 30 μ L of Matrigel containing the tips were placed in a 12-well plate. The plate was then incubated for 30 min at 37 °C to allow Matrigel polymerize and solidify. Afterwards, each well was filled with 1000 μ L of organoid medium prepared according to [13]. Organoid medium contained: Advanced DMEM/F12 (ThermoFisher) supplemented with Amphotericin B (2.5 μ g/mL, ThermoFisher), 1 $\times$ Glutamax (ThermoFisher), 1 $\times$ N2 supplement (ThermoFisher), 1 $\times$ B27 supplement (ThermoFisher), 0.05% BSA (Sigma-Aldrich), 2% PS (ThermoFisher), FGF7 (10 ng/mL, Stemcell Technologies, Grenoble, France), CHIR99021 (3 μ M, Stemcell Technologies), Retinoic Acid (50 nM, Stemgent, Cambridge, Massachusetts, USA), 50 μ g/mL Ascorbic Acid (Sigma Aldrich) and 0.4 μ M 1-Thioglycerol (Sigma Aldrich). The plate was then incubated under standard tissue culture conditions (37 °C, 5% CO₂). Tips growth in a patterned structure before first passage and acquired a

spheric structure thereafter (Fig. S1). Organoids used in the different experiments were obtained at passage 3–4.

Organoid differentiation

To differentiate human embryonic lung tip-derived organoids to proximal airways, organoid medium was removed from the plate and exchanged by 1000 μ L of an established human airway differentiating medium, PneumaCult™ (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Organoids were grown in this medium for 5 pcw at regular culture conditions (37 °C, 5% CO₂).

Organoids recovery and paraffin embedding for immunofluorescence studies

Organoid medium was aspirated from the well and using 1 mL of cold Advanced DMEM/F12 medium we detached the Matrigel drop. Matrigel drop including organoids was transferred into a 15 mL tube and cold consecutive washes (3x) with 10 mL cold DMEM/F12 was required for organoid recovering from Matrigel. Lastly, organoids were further washed with 1 mL Corning Cell Recovery Solution (Corning, NY, USA) and incubated on ice for 30 min, inverting the tube after 15 min. Then, organoids were washed with cold DPBS and centrifuged at 200g for 5 min at 4 °C. Supernatant was discarded and afterwards organoids were fixed in paraformaldehyde 4% for 30 min at RT. Thereafter organoids were washed with DPBS for 3 times and after centrifuging at 200g for 5 min at 4 °C the pellet was included in 100 μ L of Histogel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) for 45 min (or until solidification). Once included in Histogel, dehydration procedure in scale-up ethanol concentrations (70%, 80%, 95% and 100%) was performed prior to xylene treatment and paraffin embedding.

Organoid nucleofection

Organoids (cultured according to [14]) were mechanically dissociated using glass Pasteur pipettes. After cell counting, 2×10^5 cells were re-suspended with Lonza P3-Primary cell nucleofection Solution and 1 μ L of IGFBP3 DsiRNA (Design id: hs.Ri.IGFBP3.13.1) or Negative Control DsiRNA (IDT, Coralville, Iowa) were added. Then the solution was transferred to 100 μ L nucleofection cuvette (V4XP-3012, Lonza, Basel, Switzerland). Nucleofection was performed using Lonza 4D Nucleofector with X unit using the program EA125. After nucleofection, organoid culture medium supplemented with 10 μ M Y-27632 (ROCK inhibitor, ROCKi, 72,304, StemCell) was added to the nucleofection cuvette and cell mixture was then recovered and seeded into Matrigel and distributed in 24-well plate wells and cultured with organoid culture medium with 10 μ M ROCKi. Sequential photos were obtained using EzScope

101 live cell imaging system (Blue-Ray Biotech, New Taipei City, Taiwan) during 48 h before RNA extraction.

Lung explant culture with IGFBP3

Small pieces of human embryonic lungs were placed on top of a Nucleopore Track-Etch membrane (Whatman, Florham Park, NJ) suspended over culture media (D-MEM/F12 supplemented with Penicillin/Streptomycin) in 12 well plates. 50 nM of Recombinant human IGFBP3 protein (Active) (ab280941, Abcam, Cambridge, UK) or PBS (Control) was added to the medium. The lung explants were cultured in the cell incubator (37 °C, 5% CO₂) for 2 days and then the samples were formalin-fixed and paraffin-embedded for histological analysis.

Protein arrays

C-Series Human TGF beta Pathway Phosphorylation Array C1 (cat. No. AAH-TGFB-1, RayBiotech, Georgia, USA) was used to evaluate 8 phosphorylated human proteins from TGFβ/Smad signaling, including ATF2 (P-Thr69/71), c-Fos (P-Thr232), c-Jun (P-Ser73), SMAD1 (P-Ser463/465), SMAD2 (P-Ser245/250/255), SMAD4 (P-Thr277), SMAD5 (P-Ser463/465) and TAK1 (P-Ser412). Organoids were nucleofected with control or IGFBP3 siRNA as previously described and total protein was purified at 24 h. Fifty µg of total protein was used for the analysis. The protein array incubation and protein detection was performed as per the manufacturer's protocol. Chemiluminescence detection was performed on ChemiDoc (Bio-Rad, California, USA). For protein quantification, intensities were measured using Quantity One software v4.6.3 (Bio-Rad). In total 6 protein Arrays (corresponding to 3 independent replicates) were used to identify differences between control and IGFBP3 siRNA-transfected organoids in three independent replicates.

In silico analysis of single cell RNAseq data on alveolar organoids

Single cell RNAseq data from control and alveolar differentiated organoids were obtained from [12]. The analysis of *IGFBP3* expression levels and cell location in the cell populations present in the control and alveolar differentiated organoids were analysed using CELLxGENE portal [41]. Available at <https://fetal-lung-organoid.cellgeni.sanger.ac.uk/>.

Statistical analysis

T-tests or U-Mann Whitney when appropriate, were used for comparisons between two groups of samples and ANOVA test for comparisons between more than two groups. Pearson correlation was used to correlate mRNA and miRNA expression. For all transfection experiments

comparing control vs. condition, one T-test analysis was used. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9 (La Jolla, CA, USA) or R program version 4.1.1.

Results

Analysis of differential mRNA expression from early to late pseudoglandular stage of human lung development

To identify genes involved in the regulation of the differentiation process occurring from 8 to 12 pcw of human embryonic lung development we performed expression arrays in 9 lung samples, including three 8–9 pcw, three 12 pcw embryonic lungs and 3 human adult tissues. The hierarchical cluster based on the whole mRNA expression revealed two well-differentiated groups: adult tissues; and embryonic tissues. Focusing on embryonic tissues we can observe that clearly early pseudoglandular stage samples (8 and 9 pcw samples) grouped together separately from late pseudoglandular stage samples (12 pcw) (Fig. 1a). The principal component analysis reinforced this observation by differentiating 3 basic groups from left to right in the graph (Dimension 1, explaining 47.8% of variance vs. Dimension 2, 24.7% of variance; and Dimension 1 vs. Dimension 3, 6.5% of variance): Adult tissues; 12 pcw; and 8–9 pcw embryonic lungs (Fig. 1b).

Differential expression analysis showed 88 differentially expressed genes (DEG) ($p < 0.001$; Table S2) between 8 and 9 pcw samples and 12 pcw samples. Figure 1c shows a heat map of the expression of the DEG in all analyzed samples allowing us to observe the expression trend of the DEG also in the adult tissue.

String analysis was performed to identify the interactome between the 88 DEG identified. Fifty-two genes (59.1%) showed described interactions with other genes from the signature. K-means analysis constated the presence of two main clusters of genes according to their interactions connected by *MYC* (Fig. 1d).

The enrichment analysis for Gene Ontology (GO) terms (Fig. 1e, and Table S3) showed that the most significantly enriched GO terms were related to “anion”, “ion” and “organic substance” transport (GO:0006820, GO:0006811, GO:0071702). Interestingly, also GO terms related to “generation of neurons”, “neurogenesis” and “neuron differentiation” can be observed (GO:0048699, GO:0022008, GO:0030182) which can be explained by the presence at this time of neural crest populations [16]. Also, more general GO terms related to development such as “cell development” and “regulation of multicellular organismal” can be observed (GO:0048468, GO:0051239).

Next, we investigated the expression trends of the DEG identified. The Hierarchical cluster analysis by genes

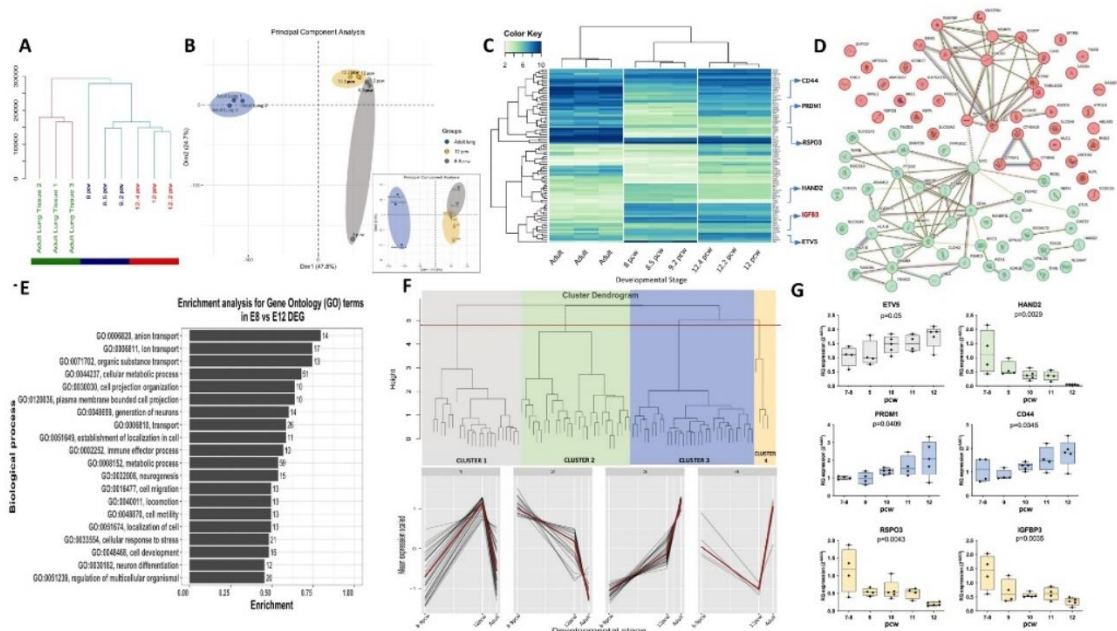


Fig. 1 Gene expression analysis in 8 vs 12 pcw human embryonic lungs and adult lung samples. **a** Hierarchical cluster analysis showing how the different samples group according to their expression pattern. **b** Principal component analysis showing that samples group according to their age using Dimension 1 (47.8% of variability) and Dimension 2 (24.7%). In the small box in the right bottom the PCA have been represented using Dimension 1 and Dimension 3 (6.5%) and shows similar aggregation clusters. **c** Heat map with the 88 differentially expressed genes (DEG) identified between 8 vs 12 pcw in human embryonic lungs. The hierarchical cluster showed that using this gene signature samples grouped in 3 groups: adult; 8–9 pcw; and 12 pcw. Arrows indicate the location of the genes that we have further analyzed in the following analysis, including IGFBP3 which is highlighted in red. **d** String analysis (<https://string-db.org>) showing the relation between the identified genes. Color nodes are based on the results of the k-means clustering analysis (n = 2). **e** Enrichment analysis for Gene Ontology (GO) terms using the DEG identified. The numbers indicated in the bars indicate the number of genes included in each GO term. **f** Hierarchical cluster analysis by gene showing 4 gene clusters with different expression trends. The expression trend from 8 pcw to adult of each cluster is shown in the bottom of the graph and the red line is showing the mean expression of all genes included in the cluster. **g** Expression analysis by real time PCR of selected genes of each cluster in embryonic samples from 7–8 (n = 4), 9 (n = 4), 10 (n = 5), 11 (n = 4) and 12 (n = 5) pcw human lung embryonic tissues

identified 4 clusters with different expression trends between 8 and 9 pcw to adult. Cluster 1 included genes whose expression increased from 8–9 to 12 pcw, but that decreased in adult lung tissue; Cluster 2 included genes that become downregulated from 8 pcw to adult; Cluster 3 included genes that became upregulated from 8–9 pcw to adult; and finally, Cluster 4 include genes which expression decreases from 8–9 to 12 pcw, but that become upregulated in adult tissue (Fig. 1F). To validate that these trends were continuous during the pseudoglandular stage we added embryonic samples from 10 and eleven pcw to the analysis. We chose several genes of each cluster and analyzed them by real-time PCR in at least 4 samples of each pcw from 7–8 to 12 (4 samples of 7–8 pcw, 4 samples of 9 pcw, 5 samples 10 pcw, 4 samples of 11 pcw and 5 samples of 12 pcw human lung embryonic tissues). For the analysis, we selected genes of interest in each cluster: *ETV5* from Cluster 1; *HAND2* from Cluster 2; *PRDM1* and *CD44*

from Cluster 3; and *RSPO3* and *IGFBP3* from Cluster 4. In all genes, we observed a linear trend in the expression level according to the developmental time. The ANOVA analysis showed significant differences between different pcw in all genes ($p \leq 0.05$) (Fig. 1g). For further analysis, we decided to focus on the *IGFBP3* gene.

IGFBP3 protein expression was restricted to the epithelium

The analysis by immunofluorescence of IGFBP3 protein expression in lung sections from 7 to 12 pcw of development showed that the protein expression was enriched in the epithelium and highly reduced in the surrounding mesenchyme (Fig. 2a). Especially, in 8- and 9-pcw samples the IGFBP3 expression was restricted in the epithelium and not detected in the surrounding mesenchyme. Colocalization of IGFBP3 and the epithelial marker E-CAD corroborated the epithelial expression (Fig. 2b).

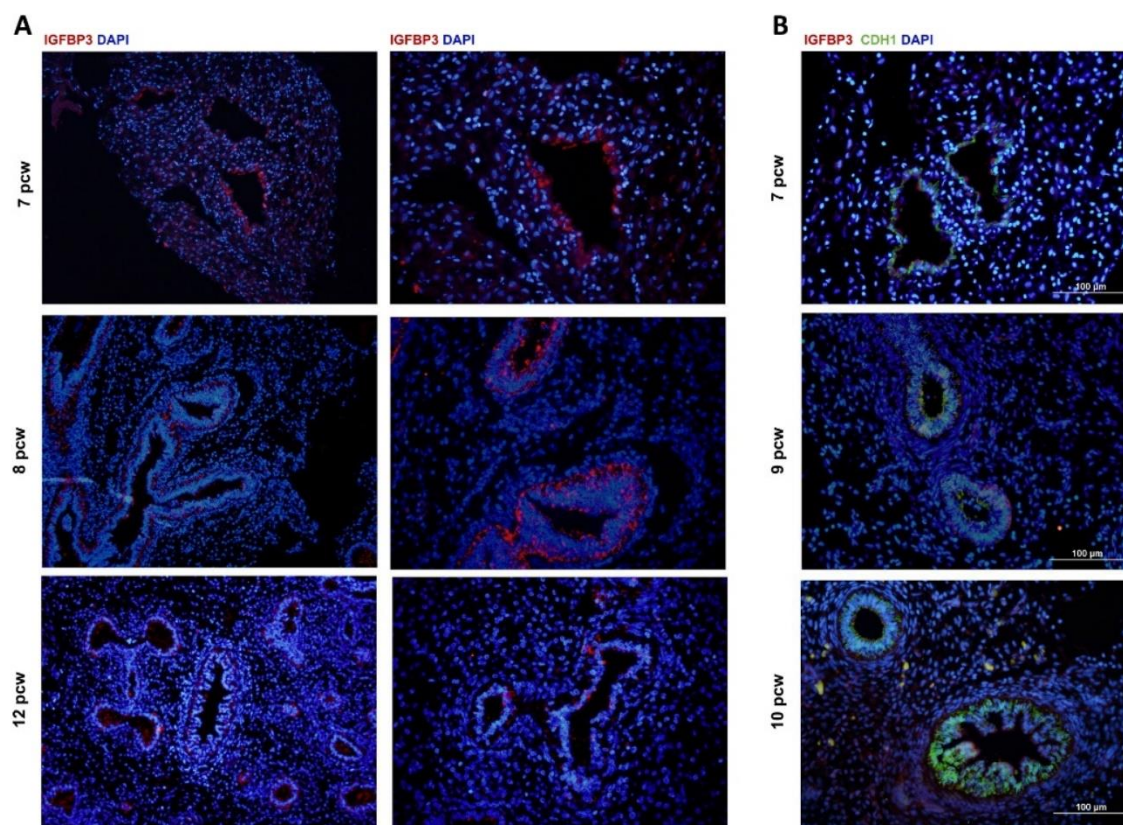


Fig. 2 Immunofluorescence detection of IGFBP3 in human lung embryonic and fetal tissues. **a** IGFBP3 protein expression in human embryonic lungs from 7 to 12 pcw showing preferential expression in epithelial cells. **b** IGFBP3 and E-CAD protein expression in 7–10 pcw lung embryonic tissues showing co-expression of both markers in epithelial cells

IGFBP3 mRNA expression in epithelial vs mesenchymal enriched populations

To determine whether the observed differences at the protein level between epithelium and mesenchyme were related to differences in mRNA expression between the different compartments, we decided to dissociate the tissue and isolate using an EPCAM antibody epithelial enriched populations (EPCAM+ population), and mesenchyme enriched population (EPCAM- population) and analyzed IGFBP3 expression separately. We could not observe significant differences in IGFBP3 mRNA levels between both populations that could explain the differences observed at the protein level (Fig. 3a). In fact, the expression in both populations decreased from 10 to 12 pcw (Fig. 3b) as previously observed when analyzing the whole lung (Fig. 1g). This result suggested the involvement of a potential post-transcriptional regulation, such as miRNAs, to explain the differences in IGFBP3 protein expression between epithelium and mesenchyme.

Analysis of differential miRNA expression from early to late pseudoglandular stage of human lung development

To identify miRNAs involved in the pseudoglandular stage differentiation process we analyzed the expression of 758 miRNAs in the same samples previously used in the mRNA profile ($n=6$, Fig. 1). Differential expression analysis identified 10 miRNAs differentially expressed between 8 and 9 pcw samples and 12 pcw lung samples (Fig. 3c and Table S4).

We performed an exploratory analysis using miRPath v2.0 to identify potential pathways regulated by the differentially expressed miRNAs. Twenty-one KEGG pathways were identified with a $p \leq 0.001$, with several genes being potential targets of the identified miRNAs (Fig. 3d and Table S3). The “*ErbB signaling pathway*” was the most significant pathway identified, including 24 genes targeted by 7 of the identified miRNAs. Other key lung pathways identified in the analysis included the “*PI3K-Akt signaling pathway*”, the “*Wnt signaling*”

pathway", the "TGF-beta signaling pathway" and the "p53 signaling pathway".

Identification of miRNAs regulating IGFBP3

To identify potential miRNAs targeting *IGFBP3* in the miRNA signature, we cross-correlated the miRNA expression with DEG identified in the same embryonic sample using RmiR program, which uses predicted target information from TargetScan (<http://www.targetscan.org/>). RmiR identified several gene-miRNAs pairs that showed an inverse expression correlation (minimum considered -0.4) and that TargetScan identified as potential candidates: TNXB and miR-148a ($r = -0.4154632$); RSPO3 and miR-16 ($r = -0.4288525$); PRDM1 and miR-186 ($r = -0.6858153$); RSPO3 and miR-195 ($r = -0.6850341$); HAND2 and miR-25 ($r = -0.4435238$); and the highest inverse correlation was identified between *IGFBP3* and miR-34a ($r = -0.7947488$).

In Fig. 3e are represented the 3'UTR region of *IGFBP3* and the binding sites of the conserved miRNAs predicted by TargetScan 8.0, which includes miR-34a, which was also one of the miRNAs identified differentially expressed between 8–9 and 12 pcw of lung development. To validate the identified correlation between miR-34a and *IGFBP3* during the pseudoglandular stage of lung development. We analyzed the expression of miR-34a using single TaqMan assays in all the embryonic samples available ($n=20$, Fig. 3f). miR-34a gradually increases its expression from 8 to 12 pcw of lung development (ANOVA $p=0.0091$). Moreover, the correlation analysis in all samples validated the negative correlation identified between *IGFBP3* and miR-34a ($r = -0.6826$; $p=0.0009$, Fig. 3g). In Fig. 3h, we can observe how *IGFBP3* shows an opposite pattern of expression with miR-34a, with the highest *IGFBP3* and the lowest miR-34a levels in the early pseudoglandular stage (8 pcw) and with

the lowest *IGFBP3* and highest miR-34a levels in late pseudoglandular stage (12 pcw). During 9, 10 and 11 pcw we can observe a gradual downregulation and upregulation of *IGFBP3* and miR-34a, respectively.

miR-34a is upregulated in the mesenchyme

When we analyzed the expression of miR-34a in epithelial enriched populations (EPCAM+) and mesenchyme enriched population (EPCAM-) we observed that it was significantly upregulated in EPCAM- cells ($p=0.0047$, Fig. 3i). Of note, the miR-34a expression in EPCAM- populations increased from 10 to 12 pcw (Fig. 3j) as previously observed when analyzing the whole lung (Fig. 3f), while in the EPCAM+ population, the miR-34a expression was maintained at constant low levels during these pcw.

miR-34a is inhibiting IGFBP3 translation in lung embryonic mesenchymal cells

To confirm that miR-34a is regulating *IGFBP3* protein levels in the embryonic lung mesenchyme, and therefore is responsible of the lack of *IGFBP3* protein expression in the mesenchymal compartment during pseudoglandular stage, we decided to culture primary lung embryonic mesenchymal cells where to inhibit miR-34a levels and study *IGFBP3* expression. We inhibited miR-34a using an antisense oligonucleotide (ASO) that reduced miR-34a expression a mean of 31% ($p=0.0818$, Fig. 4a) and this was associated with a significant increment of *IGFBP3* mRNA levels in the mesenchymal cells transfected with the miR-34a ASO ($p=0.0185$, Fig. 4b) in comparison to control cells transfected with a scrambled oligo. Interestingly, this increase in the mRNA levels was also observed at the protein level where we observed a 30% increase in the mesenchymal cells where we silenced miR-34a (Fig. 4c). To further validate this observation, we performed immunofluorescence analysis of *IGFBP3*

(See figure on next page.)

Fig. 3 *IGFBP3* is negatively regulated by miR-34a in the mesenchymal compartment. **a** *IGFBP3* mRNA expression analysis in EPCAM+ (epithelial enriched) vs EPCAM- (mesenchymal enriched) purified cells not showing significant differences between both populations. **b** *IGFBP3* mRNA expression by pcw in EPCAM+ vs EPCAM- cell populations showing that in both groups of cells *IGFBP3* mRNA expression decreases over time. **c** Heatmap of the 10 differentially expressed miRNAs identified between 8 and 12 pcw. **d** DIANA-miPath v2.0 analysis (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=mirpath/index>) using the 10 differentially expressed miRNAs identified. The KEGG signaling pathways identified are ordered by number of genes targeted by the selected miRNAs. The x-axis indicates the number of genes and miRNAs identified in the miRNA/target interaction analysis which are included in each KEGG pathway identified showed in the y-axis. **e** Schematic representation of the 3'UTR region of *IGFBP3* and the predicted conserved miRNAs targeting it, including miR-34a which base to base pairing is represented in the bottom of the figure. **f** Analysis by real time PCR of miR-34a expression in embryonic samples from 8 ($n=2$), 9 ($n=4$), 10 ($n=5$), 11 ($n=4$) and 12 ($n=5$) pcw human lung embryonic tissues showing that miR-34a expression increases over time. **g** Correlation analysis in paired samples of miR-34a and *IGFBP3* expression showing a significant negative correlation between both genes. **h** Quantification of *IGFBP3* and miR-34a shows an opposing pattern of expression. *IGFBP3* becomes downregulated over time while miR-34a becomes upregulated. **i** miR-34a expression analysis in EPCAM+ vs EPCAM- purified cells showing significant differences between both populations. miR-34a is upregulated in the mesenchymal enriched population. **j** miR-34a expression by pcw in EPCAM+ vs EPCAM- cell populations showing that while in the EPCAM- group of cells miR-34a expression increases over time, in the EPCAM+ group the miR-34a expression remains stable at low levels

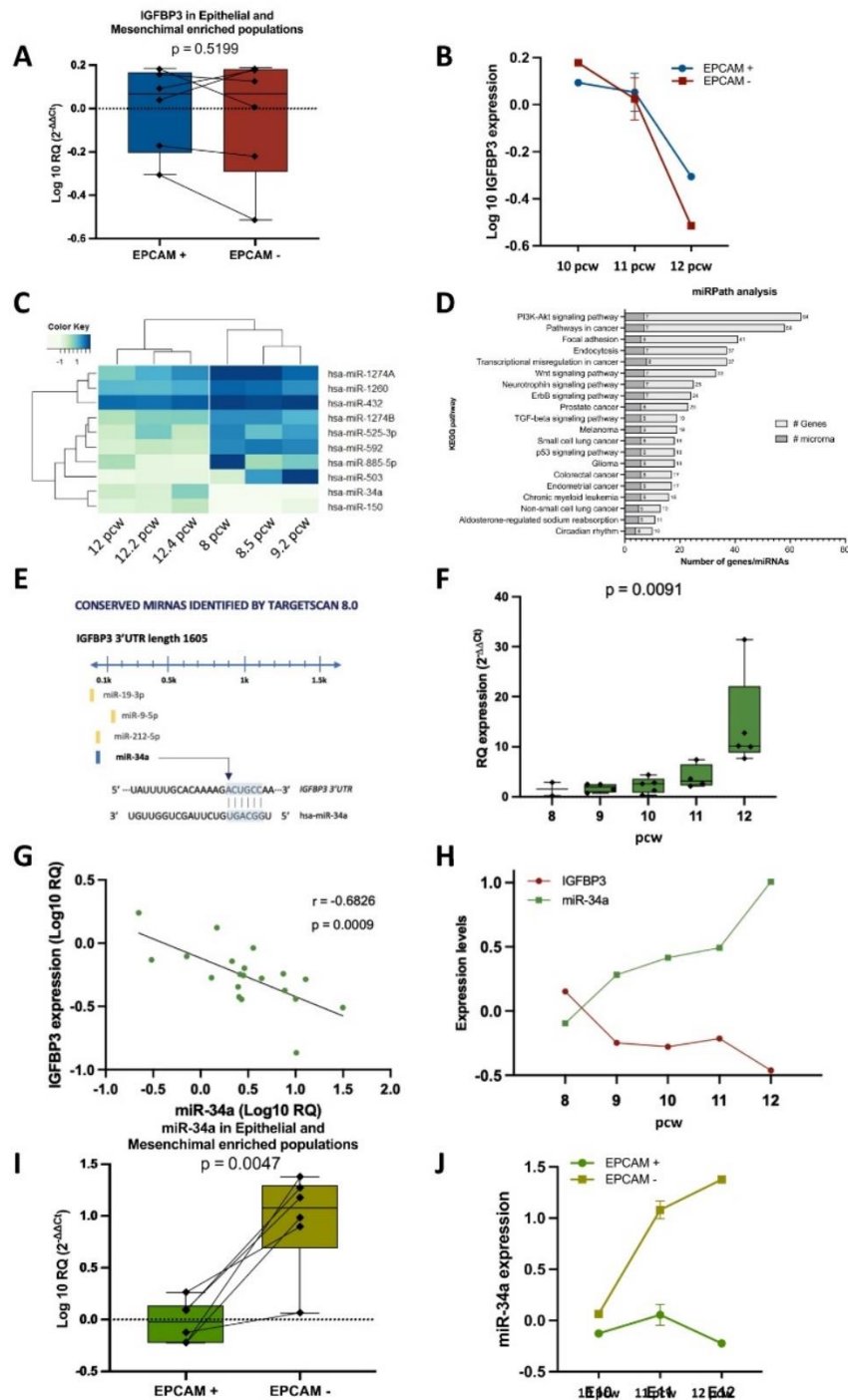


Fig. 3 (See legend on previous page.)

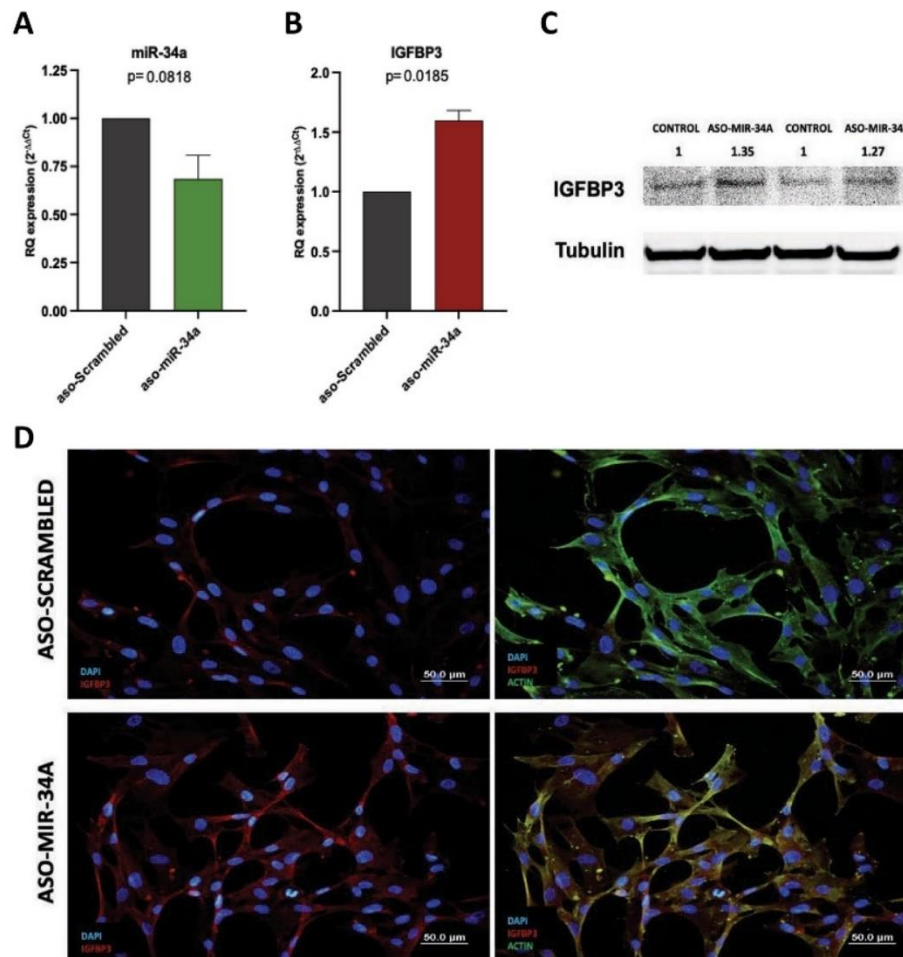


Fig. 4 miR-34a inhibition increases IGFBP3 levels in human lung embryonic mesenchymal cells. Transfection of human lung embryonic mesenchymal cells with an antisense oligonucleotide (ASO) against miR-34a or with a scrambled ASO and analysis of **a** miR-34a and **b** IGFBP3 mRNA levels ($n=4$ per group). **c** Analysis of IGFBP3 protein levels by western blot in human lung embryonic mesenchymal cells transfected with ASO-miR-34a or ASO-scrambled. The image showed is a cropped gel focused in the proteins of interest. Full-length blots are presented in Additional file 10. **d** Immunofluorescence analysis of IGFBP3 and Actin in human lung embryonic mesenchymal cells transfected with ASO-scrambled or with ASO-miR-34a

in the cultured embryonic lung mesenchymal cells after silencing miR-34a, and as shown in Fig. 4d, IGFBP3 protein levels increased in the cytoplasm of silenced cells and colocalized with Actin expression in these cells.

Differential expression of IGFBP3 in the proximal-distal airway and overexpression in tip-derived organoids

To study whether IGFBP3 expression in epithelial cells could be involved in proximal-distant patterning, we decided to analyze its expression in different locations of the bronchial tree. For this purpose, we isolated the bronchial tree by separating enzymatically first and

then manually the mesenchyme, and while working under the stereoscopic microscope, we isolated tips and stalks (Fig. 5a, Video S1). After RNA purification from both isolated tissues, the analysis of *MUC5AC* mRNA levels, a gene overexpressed in the proximal embryonic airway (stalks) [14], confirmed that we correctly purified enriched populations since *MUC5AC* were significantly overexpressed in stalk in comparison to the tip enriched population ($p<0.001$, Fig. 5b). The analysis of IGFBP3 mRNA levels in both populations showed an upregulation in the distal epithelial population, in the tips ($p=0.025$, Fig. 5c). Moreover, miR-34a showed an inverse

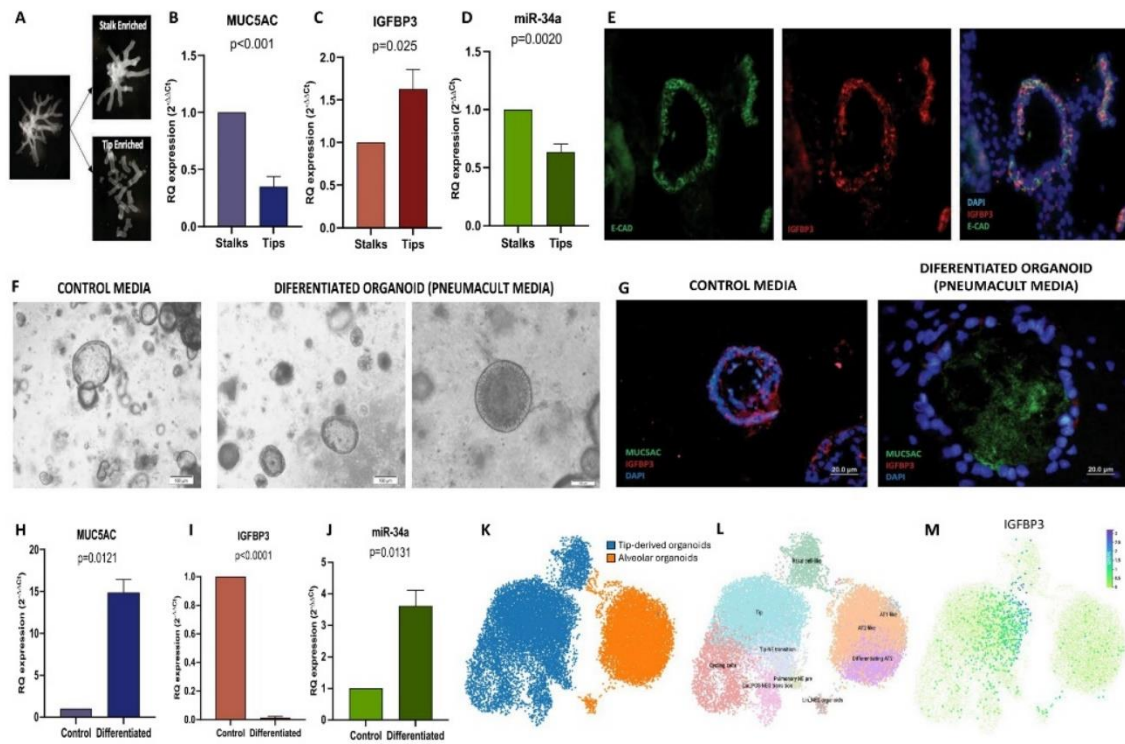


Fig. 5 IGFBP3 overexpression in tips and in tip-derived organoids becomes downregulated with the differentiation process. **a** Tip and stalk isolation after treatment of the bronchial tree with dispase and mechanical separation of the mesenchyme from the epithelium under the stereoscopic microscope. **b** Quantification of MUC5AC, **c** IGFBP3 and **d** miR-34a mRNA levels in tip and stalk enriched populations ($n = 9$ per group). **e** Immunofluorescence analysis of IGFBP3 and E-CAD in tip-derived organoids. **f** Microscope images showing gross morphology of tip-derived organoids cultured with control media vs differentiated organoids after 30-day culture with differentiation media (Pneumacult). **g** Immunofluorescence analysis of IGFBP3 and MUC5AC in organoids cultured with control media and after 30-day differentiation with Pneumacult media. **h** Analysis of MUC5AC, **i** IGFBP3 and **j** miR-34a mRNA levels in control and differentiated organoids ($n = 3$ per group). **k** UMAP visualization of single-cell RNA sequencing data from control and alveolar differentiated tip-derived organoids, with colors representing the cell of origin. **l** UMAP visualization showing the different cell types identified in the control and alveolar differentiated tip-derived organoids. **m** UMAP illustrating IGFBP3 transcript expression in the control and alveolar differentiated tip-derived organoids

expression, with downregulation in the tip population ($p = 0.002$, Fig. 5d). The protein analysis of IGFBP3 in tip-derived organoids confirmed at the protein level the upregulation of IGFBP3 in the tip population since IGFBP3 protein was highly expressed in the epithelial cells of tip-derived organoids (Fig. 5e). E-cadherin was used as an epithelial marker to confirm that IGFBP3 expression was in epithelial cells from the tip-derived organoids.

Organoid differentiation drastically reduces IGFBP3 expression

To study if IGFBP3 expression is lost due to the differentiation process occurring during the branching morphogenesis occurring during pseudoglandular stage we decided to differentiate tip-derived organoids to the proximal airway by culturing them

in differentiating medium. Differentiated organoids acquire morphological changes (Fig. 5f) derived of the appearance of differentiated cells such as ciliated and goblet cells. The presence of goblet cells produces an accumulation of mucus in the lumen of the organoid, positive for MUC5AC, which was used as a control for the organoid differentiation process in this article. Thus, it was observed that both MUC5AC protein expression (Fig. 5g) and mRNA expression (Fig. 5h) levels were elevated in differentiated organoids compared to controls. Analysis of IGFBP3 in control and differentiated organoids showed an obvious reduction of IGFBP3 levels in the epithelium of differentiated organoids (Fig. 5g, i), while miR-34a exhibited increased mRNA expression in the differentiated organoids compared to undifferentiated controls (Fig. 5j).

Single-cell RNAseq analysis of alveolar-differentiated organoids showed a drastic reduction of IGFBP3 levels

Using scRNA data from [12], we analyzed the expression of IGFBP3 in tip-derived organoids and alveolar-differentiated organoids. Confirming our previous results, we observed that IGFBP3 expression was drastically reduced after organoid differentiation (Fig. 5k–m). In control tip-derived organoids, IGFBP3 expression was mostly located in tip cells. Additionally, some high IGFBP3 expression was observed in basal cell-like cells. After differentiation, a few dispersed cells of the alveolar-differentiated organoid expressed IGFBP3 at low levels, with a signal concentrated in the lineage negative (Lin_NEG) organoid cell population (Fig. 5l, m).

IGFBP3 silencing induces alveolar differentiation in organoids

Based on the previous observation that showed the loss of IGFBP3 after differentiation, we aimed to assess its role in the differentiation process. Using nucleofection technology and DsiRNAs we inhibited the expression of IGFBP3 in 12 pcw tip-derived organoids (Fig. 6a). Time-lapse study after transfection capturing one frame every 5 h for 48 h showed that IGFBP3 silenced organoids become differentiated in alveolar-like structures (Fig. 6b, Video S2 and S3). In Fig. 6c can be observed the alveolar-like structures obtained after 48 h of IGFBP3 silencing in tip-derived organoids which resemble alveolospheres.

To explore the molecular changes occurring after IGFBP3 silencing we analyzed the expression of six stem cell markers and nine alveolar markers. Compared to control organoids, the IGFBP3 silenced organoids displayed a significant downregulation of stem cell markers including OCT4, KLF4, NANOG and ALDH1A3 (Fig. 6d), which denotes differentiation and loss of stemness potential in line with the observed morphological changes. Interestingly, a significant upregulation of the alveolar type 2 (AT2) cell marker SFTPC and LAMP3 (Fig. 6e) was observed denoting alveolar differentiation. Although not significant, other AT2 (Fig. 6e) and alveolar type 1 (AT1) (Fig. 6f) cell markers also showed upregulation 48 h after IGFBP3 silencing. Immunofluorescence analysis of SFTPC in control and silenced organoids confirmed the overexpression of the AT2 marker SFTPC in the IGFBP3 silenced organoids (Fig. 6g).

High IGFBP3 levels decelerate the differentiation process in lung explants

Lung explants from 10 pcw embryos cultured for 48 h with IGFBP3 peptide had a distinctive epithelial morphology compared to control explants (Fig. 6h). In the histological analysis (hematoxylin staining),

while a more cuboidal epithelium was observed in control explants after 48 h of culture, the IGFBP3 explants remained in a previous step showing a more pseudostratified epithelium that had not completed the differentiation to a cubic endodermic epithelium yet.

IGFBP3 silencing induces TGF β inhibition and BMP activation

To understand the signaling events that control IGFBP3-mediated alveolar differentiation, we decided to profile the levels of 8 phosphorylated proteins related to TGF β signaling pathway, a key pathway involved in several differentiation processes that have been described to interact with IGFBP3 [33, 34]. Twenty-four hours after silencing IGFBP3 in the tip-derived organoids, we observed a significant inhibition of TGF β signaling, indicated by the downregulation of p-SMAD2 ($p=0.0001$), and an increase in BMP signaling, demonstrated by the significant upregulation of p-SMAD1 ($p=0.0197$). Although not significant, there was also an upregulation of p-ATF2 ($p=0.0793$), p-c-Fos ($p=0.0692$) and p-c-Jun ($p=0.1441$). Additionally, a discrete downregulation of p-SMAD5 was noted ($p=0.0203$) (Fig. 6i, j). Interestingly, the downregulation of p-SMAD2 correlates with the downregulation of previously described transcriptionally activated target genes, including SOX2, OCT4 and NANOG (Fig. 6d, k). Also, the upregulation of p-SMAD correlates with the upregulation of activated target genes, including SFTPB, SFTPC and SFTPD (Fig. 6e, k), confirming the functional effect of IGFBP3 silencing on the downregulation and upregulation of the TGF β and BMP signaling, respectively (Fig. 6k).

Discussion

In this study, we conducted an in-depth analysis of the genes and miRNAs involved in the differentiation process from the early to late pseudoglandular stages of human lung development. Before branching initiation, the endodermal bud, surrounded by mesenchymal cells, begins to transform in a pseudostratified epithelium around 10 pcw, and by 12 pcw, a cuboidal epithelium can be observed. These epithelial modifications are closely related to changes in the mesenchymal compartment, which, through its signals, it is the main promoter of the epithelial transformations. We identified 88 DEG that, according to its interactome, could be grouped mainly into two distinct clusters connected by the proto-oncogene *MYC*, whose expression slightly decreases during the analyzed period. The *MYC* expression has been shown to be more generalized across different embryonic organs during mouse development compared to other family members [42]. Despite transcriptomic

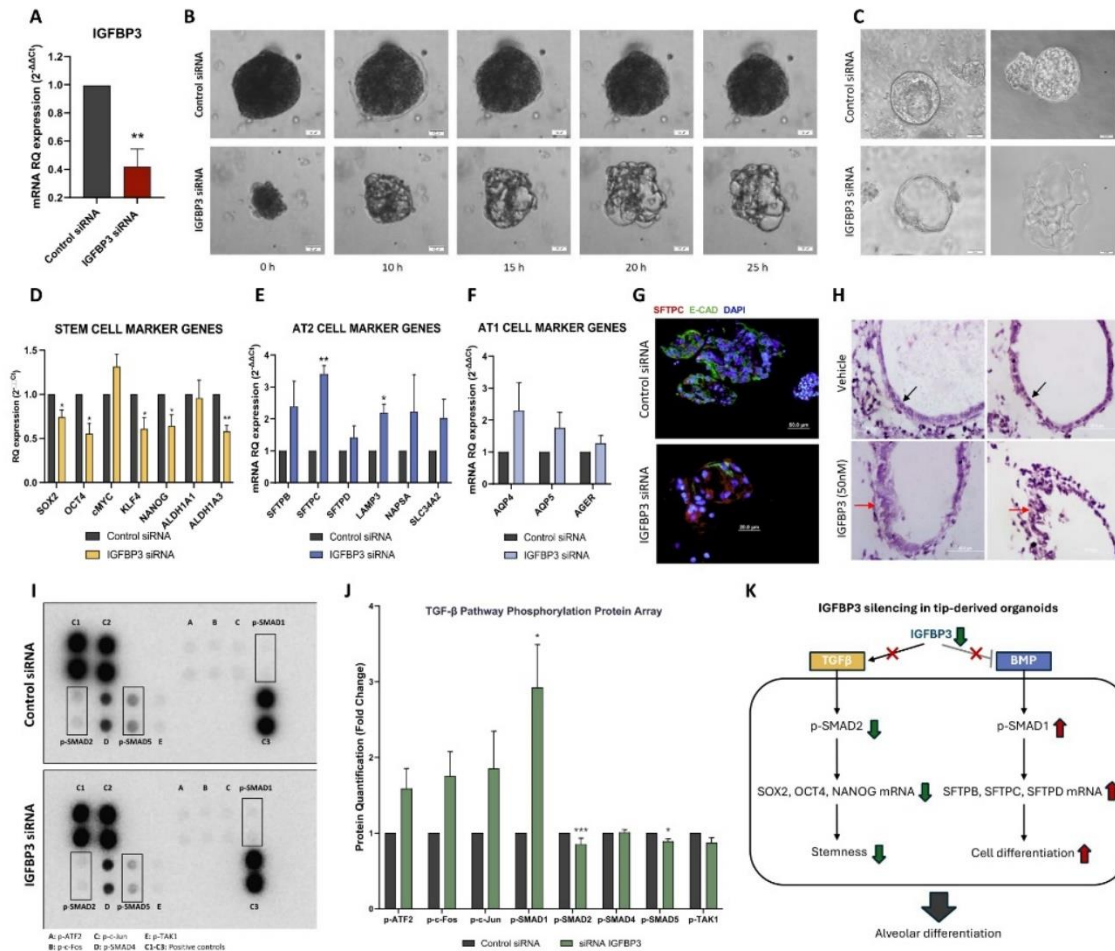


Fig. 6 Silencing of IGFBP3 in tip-derived organoids induces alveolar-like differentiation. **a** IGFBP3 mRNA levels in tip-derived organoids after siRNA silencing ($n=6$ per group). **b** Time-lapse images of control and IGFBP3 silenced tip-derived organoids during 25 h after transfection. **c** Representative images of Control and IGFBP3 silenced tip-derived organoids at 48 h post-transfection showed differentiation in alveolar-like structures in the IGFBP3 silenced group. **d** Expression analysis of stem cell markers in control and IGFBP3 siRNA-transfected organoids ($n=4$ per group). **e** Expression analysis of AT2 cell markers in control and IGFBP3 siRNA-transfected organoids ($n=4$ per group). **f** Expression analysis of AT1 cell markers in control and IGFBP3 siRNA-transfected organoids ($n=4$ per group). **g** Immunofluorescence analysis of SFTPC and E-CAD in control and IGFBP3 silenced organoids. **h** Hematoxylin staining of tissue sections of lung explants from 10 pcw embryos cultured for 48 h with or without IGFBP3 peptide. A distinctive epithelial morphology can be observed between both groups: the control group showed a cubic epithelium (black arrows) while the IGFBP3 group remained in a more undifferentiated stage (red arrows). **i** Representative images of one of the 3 independent replicates of TGF β protein arrays showing differences in p-SMAD1, p-SMAD2 and p-SMAD5 between control and IGFBP3 siRNA-transfected organoids. **j** Protein quantification in 3 independent replicates of TGF β related phosphorylated proteins using the protein Arrays in control and IGFBP3 siRNA-transfected organoids ($n=3$ per group). **k** Schematic representation of the effect of IGFBP3 silencing in tip-derived organoid on TGF β and BMP signaling. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

heterogeneity between different studies due to technical, analytical or sample differences [43], we identified genes in our signatures previously described such as *CD44*, which expression increases and has been shown to be expressed in the epithelial cells of the tips [12], and *ETV5*, a transcription factor associated with the

promotion of epithelial cell differentiation and inhibition of proliferation [44], which becomes upregulated from 8 to 12 pcw in our study. GO analysis allowed us to explore the pathways regulated by the identified genes in more detail. The DEGs could be grouped in several functional categories (Table S3), including “cell development”, which

is inherent to the process studied as it describes the progress of a specific cell from an immature to a mature state. This category contains 16 genes, including *ETV5* and *HAND2*. Additionally, other important functional groups identified were related to transport of anions and ions, which include 14 and 17 genes, respectively, such as *ATP11A* or *SLC10A2*. The importance of ion and anion transport during lung development has been studied and associated with the lungs as secretory organs during this period. Before birth, the placenta is in charge of the respiratory gas exchange, and the lungs are filled with liquid [45]. To produce the liquid that moves from the basal to the apical part of the epithelium and is eventually released into the lumen, robust control of the anions and ions such as Na^+ , K^+ , or Cl^- is necessary. Most of these studies have been performed in animal models, but alteration in these molecules have been associated with respiratory diseases in the newborns [46] and even with lung malformations [45]. With the emergence of organoids models we can envision that the results obtained in animal models can be translated to human embryology. Using human embryonic organoids we could study most of these processes directly in human embryonic samples.

Finally, it is noteworthy that we identified 15 genes grouped in GO categories associated with neuron generation and differentiation. This can be explained by the presence at this time of neural crest populations identified in recent single cell RNA studies [16].

To further analyze the gene signature, we grouped genes by expression trends across three time points: 8–9 pcw, 12 pcw, and adult. Four clusters were identified. A selected group of genes, including the epithelial transcription factor *ETV5* (cluster 1), the mesodermal transcription factors *HAND2* (cluster 2) and *PRDM1* (cluster 3), the cell surface receptor *CD44* (cluster 3), the soluble protein pro-angiogenic factor *RSPO3* (cluster 4) and the soluble protein *IGFBP3* (cluster 4). We validated that their expression trends were gradual by studying them in all available embryonic samples, which allowed us to include additional time points (8, 9, 10, 11 and 12 pcw). Most of these genes were chosen because they showed interactions with the miRNA signature: *RSPO3*-miR-16; *HAND2*-miR-25; *PRDM1*-miR-186 and *IGFBP3*-miR-34a. Further studies on these gene-miRNA pairs are warranted; however, in the present paper, we have only focused on one of these interactions. During the pseudoglandular stage, the lung is filled with liquid, and several molecules cross the epithelium to be secreted into the lumen. Subsequently, they circulate from the distal to the proximal respiratory airway, eventually passing through the larynx to be expelled out by the mouth and mixed with the amniotic liquid. Therefore,

we decided to focus on the study of *IGFBP3*, a soluble protein previously detected in amniotic liquid [47], as we hypothesized its involvement in distal–proximal communication through the lumen. We observed that the *IGFBP3* protein was restricted to epithelium, as miR-34a targeted it in the mesenchyme. These results underscore the necessity for current single-cell RNA studies to validate the results by analyzing the protein levels. As we observed, despite similar mRNA levels between different cell populations such as stromal and epithelial cells, the action of a miRNA can restrict the final protein to one compartment or the other, leading to important functional consequences.

Moreover, considering the KEGG pathways identified enriched in our miRNA signature, the miR-34a/*IGFBP3* axis is directly related with “p53 signaling pathway”. miR-34a have been described previously as a transcriptional target of p53 that collaborates in the induction of p53-mediated apoptosis [48]. In this line, *IGFBP3* regulates the escape from apoptosis, which is a characteristic of undifferentiated stem cells. Therefore, the downregulation of miR-34a and upregulation of *IGFBP3* in the epithelium seem to allow the escape from growth inhibition, senescence and apoptosis required for the maintenance of an undifferentiated stage during the first stages of lung development. Although acting independently they regulate cell death, it has also been described that working together regulates autophagy in a patient asthma model [49].

Finally, since distal–proximal differentiation begins during the pseudoglandular stage, we decided to evaluate the role of *IGFBP3* in this process. *IGFBP3* was upregulated in the tips, where a lung stem cell population resides. This observation was validated using human tip-derived organoids, where high *IGFBP3* levels were observed. Interestingly, *IGFBP3* expression became drastically reduced when we differentiate the tip-derived organoids. *IGFBP3* was mostly expressed in a stem cell population, which comprises most of the cells in the epithelium of the tip-derived organoid. The differentiation process drastically reduced their expression restricting it to only a few cells retaining the stem cell phenotype. Using single-cell RNAseq data from [12] we confirmed that in alveolar-differentiated tip-derived organoids, the expression of *IGFBP3* became drastically reduced. Initially, *IGFBP3* expression was mainly located in tip and basal-like cell populations of the undifferentiated organoid, but after differentiation, only a few cells retained *IGFBP3* expression. These cells were mainly located in lineage-negative cell populations in the differentiated organoid. This lineage-negative cell population were characterized by the expression of tip progenitors but not AT2 markers, confirming that

IGFBP3 after differentiation remains in cell populations not completely differentiated.

In this line, when we inhibited IGFBP3 expression using siRNAs in tip-derived organoids, an alveolar-like differentiation was triggered with a significant reduction of stemness. The silencing of IGFBP3 downregulated the expression of pluripotent stem cell markers OCT4, KLF4, Nanog and ALDH1A3. The most established role of IGFBP3 in stemness suggests that soluble IGFBP3, either directly through binding its receptor TMEM219 or indirectly by sequestering IGF-1, can inhibit stem cell proliferation and induce differentiation, as seen in colonic stem cells [50]. In contrast, in lung cancer stem cells, it has been reported that the neutralization of IGFBP3 reduces stemness potential, evidenced by the downregulation of ALDH1A1 and ALDH1A3. BIRC5 and IGFBP3 have an autocrine regulatory relationship, activating signaling mechanisms that regulate cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition [36]. BIRC5 regulates the secretion of IGFBP3, and the loss of IGFBP3 causes a downregulation of BIRC5 levels. Moreover, some authors have described that cellular IGFBP3 can be associated with a more stem-like state, with its function directly related to its cellular location. For instance, in osteosarcoma, it has been reported that nuclear localization of IGFBP3 is associated with a highly differentiated phenotype, while high cytoplasmic IGFBP3 levels are consistent with dedifferentiation [37]. Consistent with this, our immunofluorescence analysis showed high IGFBP3 levels in the cytoplasm of lung epithelial cells from both embryos and tip-derived organoids.

Upon observing morphological changes indicative of alveolar differentiation, we decided to study AT2 and AT1 cell markers whose upregulation supported the observed alveolar differentiation. Notably, the most remarkable upregulation was observed in the AT2 gene SFTPC, at both mRNA and protein levels. SFTPC, described to be exclusively expressed in the lung, serves as a highly specific marker for identifying AT2 cells [51, 52], thus validating the alveolar-like differentiation observed in our morphological analysis. Subsequently, employing an embryonic lung explant model cultured with IGFBP3 peptide, we corroborated the role of this protein in maintaining a more undifferentiated phenotype. Control lung explants exhibited a more differentiated cubic epithelium compared to explants cultured with high doses of IGFBP3. These findings collectively support the role of IGFBP3 as a stem cell gene whose loss is necessary for completing the differentiation process during lung pseudoglandular stage epithelium development.

Finally, to interrogate the mechanisms involved in IGFBP3 mediated alveolar differentiation, we analyzed

the Transforming Growth Factor (TGF) family-related proteins after silencing IGFBP3 in tip-derived organoids. The TGF superfamily consists of several ligands, including TGF β signaling proteins (including SMAD2) and BMP signaling proteins (including SMAD1). TGF β and BMP pathways have been described to regulate stemness and differentiation through opposing and cooperative activities [53]. Interestingly, after silencing IGFBP3 we observed a downregulation of the TGF β signaling mediated by a decrease in p-SMAD2, which leads to a reduction of SOX2, OCT4 and NANOG mRNA levels, resulting in diminished stem cell self-renewal. SOX2, OCT4 and NANOG has been previously demonstrated to be transcriptional targets of SMAD2 [54, 55]. At the same time, we noted an upregulation of BMP signaling, indicated by an increased levels of p-SMAD1, p-c-Jun and p-c-Fos. Notably, in mice, it has been demonstrated that the activation of BMP by p-SMAD1, helps to maintain the AT2 identity and allows these cells to differentiate into either AT2 or AT1 cells [56]. It is described that activation of BMP-SMAD1 promotes the expression of Nfatc3, an important transcription activator for surfactant proteins [57], which correlates with our results where we observed an upregulation of SFTPB, SFTPC and SFTPC. Moreover, Frum et al. have recently demonstrated that during alveolar differentiation, inhibition of TGF β and simultaneous activation of BMP are required during the differentiation process in humans [58]. Our results show that IGFBP3 activates the necessary crosstalk between TGF β and BMP signaling that ends in alveolar differentiation. TGF β signaling, responsible for maintaining a stem cell phenotype (undifferentiated state), needs to be inhibited, and at the same time BMP signaling needs to be upregulated to induce/maintain the specific lineage differentiation, first to AT2 and subsequently to AT1. In this line, supporting our results (Fig. 6k) it has been reported that in human embryonic stem cells SMAD2 through its transcriptional target Nanog can also repress BMP signaling to maintain the undifferentiated state [59].

Conclusions

In conclusion, our investigation has described a distinctive mRNA and miRNA signature that delineates the critical shift from the early to late pseudoglandular stage in human lung development highlighting the interplay between IGFBP3 and miR-34a which is critical for alveolar differentiation.

Abbreviations

AT1	Alveolar type 1
AT2	Alveolar type 2
ASO	Antisense oligonucleotide
BSA	Bovine serum albumin
DEG	Differentially expressed genes

FFPE	Formalin fixed paraffin embedded
GO	Gene ontology
microRNAs	MicroRNAs
NDS	Normal donkey serum
pcw	Post conception weeks
RMA	Multi-array analysis
RT	Room temperature

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03883-1>.

Additional file 1. Table S1. Primary and secondary antibodies and qPCR probes used in the study.

Additional file 2. Video S1. Isolation of lung tips under the stereoscopic microscope using tungsten needles.

Additional file 3. Fig. S1. Follow-up of tip-derived organoid growth before and after the first passage. **A** Tip-derived organoid growth from day 0 (tip inclusion into matrigel) to 14 showing patterned structure. **B** Patterned structure of tip-derived organoids resembling a disorganized bronchial tree. **C** and **D** Organoids generate spheric structures after the first passage losing the patterned structure.

Additional file 4. Table S2. List of differential expressed genes between 8- and 12-pcw embryonic lungs.

Additional file 5. Table S3. Gene ontology terms identified in the analysis of the differentially expressed genes between 8 and 12 pcw embryonic lungs and the list of genes included in each identified gene ontology term.

Additional file 6. Table S4. List of differential expressed miRNAs between 8 and 12 pcw embryonic lungs.

Additional file 7. Video S2. Time-lapse video where can be observed the morphological changes of organoids transfected with control siRNA during the first 48h after nucleofection.

Additional file 8. Video S3. Time-lapse video where can be observed the morphological changes of organoids transfected with IGF1BP3 siRNA during the first 48h after nucleofection.

Acknowledgements

The authors thank: Dr. S. Barambio for comments on embryology. D. Fuster for technical help. The Body Donation Service of the Human Anatomy and Embryology unit of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the University of Barcelona for providing funds for the purchase of laboratory materials. The authors declare that they have not used Artificial Intelligence in this study.

Author contributions

M.A.-P. and J.J.C. performed the research, the molecular analysis, and the statistical analysis, and wrote the manuscript. T.D., Y.H. R.M.M. collaborated on the research. A.N. designed the study, wrote the manuscript, performed the bioinformatic analysis and took responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the molecular and data analysis. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Funding

This work was supported by the Ministry of Economy and Competition (MINECO), co-financed with the European Union FEDER funds (SAF2017-88606-P; 2017); SEPAR-AstraZeneca Ayudas Investigación PII Oncología 2021; Becas SEPAR 2022 (n° de Proyecto 1326). Melissa Acosta-Plasencia is a FI-SDUR fellow from AGAUR.

Data availability

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and supplementary materials.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Written informed consent for the use of the clinically aborted embryos and fetuses was obtained from the legally authorized representatives. The representatives were thoroughly informed about the study and were assured of the confidentiality of their personal data. The study was approved by the Bioethics Commission of the University of Barcelona (Approval number: IRB00003099). Title of the approved project: "Characterization of piwiRNAs in Embryonic Lung Stem Cells and Their Importance in Non-Small Cell Lung Cancer" (Approval date: March 20, 2018).

Consent for publication

All authors read and approved the final manuscript for publication.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

¹Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy and Embryology Unit, Department of Surgery and Medical Specializations, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat de Barcelona (UB), c. Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain. ²Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, NY 10032, USA. ³School of Basic Medical Sciences, Chengdu University, Chengdu 610106, China. ⁴Thoracic Oncology Unit, Hospital Clinic, Barcelona, Spain. ⁵Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), c. Villarreal, 170, 08036 Barcelona, Spain. ⁶Department of Pneumology, Institut Clínic Respiratori (ICR), Hospital Clínic de Barcelona, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain. ⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain.

Received: 4 July 2024 Accepted: 10 August 2024

Published online: 26 August 2024

References

- Schittny JC. Development of the lung. *Cell Tissue Res*. 2017;367:427–44.
- Rackley CR, Stripp BR. Building and maintaining the epithelium of the lung. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2724–30.
- Ernst LM, Ruchelli ED, Carreon CK, Huff DS. Color atlas of human fetal and neonatal histology. Berlin: Springer; 2019.
- Navarro A, Marrades RM, Viñolas N, Quera A, Agustí C, Huerta A, et al. MicroRNAs expressed during lung cancer development are expressed in human pseudoglandular lung embryogenesis. *Oncology*. 2009;76(3):162–9.
- Joshi S, Kotecha S. Lung growth and development. *Early Human Dev*. 2007;83(12):789–94.
- Mullasery D, Smith NP, editors. Lung development. Seminars in pediatric surgery. Amsterdam: Elsevier; 2015.
- Mendelson CR. Role of transcription factors in fetal lung development and surfactant protein gene expression. *Annu Rev Physiol*. 2000;62(1):875–915.
- Shannon JM, Hyatt BA. Epithelial-mesenchymal interactions in the developing lung. *Annu Rev Physiol*. 2004;66:625–45.
- Nikolić MZ, Sun D, Rawlins EL. Human lung development: recent progress and new challenges. *Development*. 2018;145(16):dev163485.
- Canals J, Navarro A, Vila C, Canals JM, Díaz T, Acosta-Plasencia M, et al. Human embryonic mesenchymal lung-conditioned medium promotes differentiation to myofibroblast and loss of stemness phenotype in lung adenocarcinoma cell lines. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022;41(1):1–16.
- Danopoulos S, Alonso I, Thornton ME, Grubbs BH, Belluscì S, Warburton D, et al. Human lung branching morphogenesis is orchestrated by the spatiotemporal distribution of ACTA2, SOX2, and SOX9. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2018;314(1):L144–9.
- Lim K, Donovan AP, Tang W, Sun D, He P, Pett JP, et al. Organoid modeling of human fetal lung alveolar development reveals mechanisms of cell fate patterning and neonatal respiratory disease. *Cell Stem Cell*. 2023;30(1):20–37.

13. Miller AJ, Hill DR, Nagy MS, Aoki Y, Dye BR, Chin AM, et al. In vitro induction and in vivo engraftment of lung bud tip progenitor cells derived from human pluripotent stem cells. *Stem cell Rep.* 2018;10(1):101–19.
14. Nikolić MZ, Caritig O, Jeng Q, Johnson J-A, Sun D, Howell KJ, et al. Human embryonic lung epithelial tips are multipotent progenitors that can be expanded in vitro as long-term self-renewing organoids. *Elife.* 2017;6:e26575.
15. He P, Lim K, Sun D, Pett JP, Jeng Q, Polanski K, et al. A human fetal lung cell atlas uncovers proximal-distal gradients of differentiation and key regulators of epithelial fates. *Cell.* 2022;185(25):4841–60.
16. Cao S, Feng H, Yi H, Pan M, Lin L, Zhang YS, et al. Single-cell RNA sequencing reveals the developmental program underlying proximal–distal patterning of the human lung at the embryonic stage. *Cell Res.* 2023;33:421–33.
17. Sountoulidis A, Marco Salas S, Braun E, Avenel C, Bergenstråhle J, Theelke J, et al. A topographic atlas defines developmental origins of cell heterogeneity in the human embryonic lung. *Nat Cell Biol.* 2023;25(2):351–65.
18. Miller AJ, Yu Q, Czerwinski M, Tsai Y-H, Conway RF, Wu A, et al. In vitro and in vivo development of the human airway at single-cell resolution. *Dev Cell.* 2020;53(1):117–28.
19. Khoshgoo N, Kholdebarin R, Iwasio BM, Keijzer R. MicroRNAs and lung development. *Pediatr Pulmonol.* 2013;48(4):317–23.
20. Gross N, Kropp J, Khatib H. MicroRNA signaling in embryo development. *Biology.* 2017;6(3):34.
21. Mallory AC, Vaucheret H. MicroRNAs: something important between the genes. *Curr Opin Plant Biol.* 2004;7(2):120–5.
22. Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(4):189–97.
23. Navarro A, Monzó M. MicroRNAs in human embryonic and cancer stem cells. *Yonsei Med J.* 2010;51(5):622–32.
24. Zeng Z-L, Lin X-L, Tan L-L, Liu Y-M, Qu K, Wang Z. MicroRNAs: important regulators of induced pluripotent stem cell generation and differentiation. *Stem Cell Rev Rep.* 2018;14:71–81.
25. Bhaskaran M, Wang Y, Zhang H, Weng T, Baviskar P, Guo Y, et al. MicroRNA-127 modulates fetal lung development. *Physiol Genomics.* 2009;37(3):268–78.
26. Yang Y, Kai G, Pu X-D, Qing K, Guo X-R, Zhou X-Y. Expression profile of microRNAs in fetal lung development of Sprague-Dawley rats. *Int J Mol Med.* 2012;29(3):393–402.
27. Williams AE, Moschos SA, Perry MM, Barnes PJ, Lindsay MA. Maternally imprinted microRNAs are differentially expressed during mouse and human lung development. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* 2007;236(2):572–80.
28. Bouhaddioui W, Provost PR, Tremblay Y. Expression profile of androgen-modulated microRNAs in the fetal murine lung. *Biol Sex Differ.* 2016;7(1):1–13.
29. Mujahid S, Logvinenko T, Volpe MV, Nielsen HC. miRNA regulated pathways in late stage murine lung development. *BMC Dev Biol.* 2013;13:1–11.
30. Lin NW, Liu C, Yang IV, Maier LA, DeMeo DL, Wood C, et al. Sex-specific differences in microRNA expression during human fetal lung development. *Front Genet.* 2022;13:762834.
31. Daza DO, Sundström G, Bergqvist CA, Duan C, Larhammar D. Evolution of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) family. *Endocrinology.* 2011;152(6):2278–89.
32. Ranke MB. Insulin-like growth factor binding-protein-3 (IGFBP-3). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015;29(5):701–11.
33. Baxter RC. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3): novel ligands mediate unexpected functions. *J Cell Commun Signal.* 2013;7:179–89.
34. Varma Shrivastav S, Bhardwaj A, Pathak KA, Shrivastav A. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3): unraveling the role in mediating IGF-independent effects within the cell. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:286.
35. Yamada PM, Lee K-W. Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs. systemic action. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2009;296(5):C954–76.
36. Kahm Y-J, Jung U, Kim R-K. BIRC5 regulates IGFBP-3-induced autocrine loop in cancer stem cells. *bioRxiv.* 2023;2023.03.09.531969.
37. Ressler S, Radhi J, Aigner T, Loo C, Zwierschke W, Sergi C. Insulin-like growth factor-binding protein-3 in osteosarcomas and normal bone tissues. *Anticancer Res.* 2009;29(7):2579–87.
38. Diaz-Beya M, Navarro A, Ferrer G, Diaz T, Gel B, Camos M, et al. Acute myeloid leukemia with translocation (8; 16)(p11; p13) and MYST3-CREBBP rearrangement harbors a distinctive microRNA signature targeting RET proto-oncogene. *Leukemia.* 2013;27(3):595–603.
39. Moisés J, Navarro A, Santasusagna S, Viñolas N, Molins L, Ramirez J, et al. NKX2–1 expression as a prognostic marker in early-stage non-small-cell lung cancer. *BMC Pulm Med.* 2017;17(1):1–9.
40. Gallardo E, Navarro A, Vinolas N, Marrades RM, Diaz T, Gel B, et al. miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis.* 2009;30(11):1903–9.
41. Megill C, Martin B, Weaver C, Bell S, Prins L, Badajoz S, et al. Cellxgene: a performant, scalable exploration platform for high dimensional sparse matrices. *bioRxiv.* 2021:2021.04. 05.438318.
42. Zimmerman KA, Yancopoulos GD, Collum RG, Smith RK, Kohl NE, Denis KA, et al. Differential expression of myc family genes during murine development. *Nature.* 1986;319(6056):780–3.
43. Mooney M, McWeeney S. Data integration and reproducibility for high-throughput transcriptomics. *Int Rev Neurobiol.* 2014;116:55–71.
44. Liu Y, Hogan BL. Differential gene expression in the distal tip endoderm of the embryonic mouse lung. *Gene Expr Patterns.* 2002;2(3–4):229–33.
45. Hooper S, Harding R. Fetal lung liquid: a major determinant of the growth and functional development of the fetal lung. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995;22(4):235–41.
46. Pitkänen OM, O’Brodoich HM. Significance of ion transport during lung development and in respiratory disease of the newborn. *Ann Med.* 1998;30(2):134–42.
47. Murisier-Petetin G, Gremlich S, Damnon F, Reymondin D, Hohlfeld P, Gerber S. Amniotic fluid insulin-like growth factor binding protein 3 concentration as early indicator of fetal growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009;144(1):15–20.
48. He L, He X, Lim LP, De Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature.* 2007;447(7148):1130–4.
49. Yin H, Zhang S, Sun Y, Li S, Ning Y, Dong Y, et al. MicroRNA-34/449 targets IGFBP-3 and attenuates airway remodeling by suppressing Nur77-mediated autophagy. *Cell Death Disease.* 2017;8(8):e2998.
50. D’Addio F, La Rosa S, Maestroni A, Jung P, Orsenigo E, Nasr MB, et al. Circulating IGF-I and IGFBP3 levels control human colonic stem cell function and are disrupted in diabetic enteropathy. *Cell Stem Cell.* 2015;17(4):486–98.
51. Kalina M, Mason RJ, Shannon JM. Surfactant protein C is expressed in alveolar type II cells but not in Clara cells of rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992;6(6):594–600.
52. Mulugeta S, Beers MF. Surfactant protein C: its unique properties and emerging immunomodulatory role in the lung. *Microbes Infect.* 2006;8(8):2317–23.
53. Sakaki-Yumoto M, Katsuno Y, Derynck R. TGF- β family signaling in stem cells. *Biochim et Biophys Acta (BBA)-Gen Subj.* 2013;1830(2):2280–96.
54. Miyazono K, Ehata S, Koinuma D. Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. *Upsala J Med Sci.* 2012;117(2):143–52.
55. Xu R-H, Sampsel-Barron TL, Gu F, Root S, Peck RM, Pan G, et al. NANOG is a direct target of TGF β /activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell Stem Cell.* 2008;3(2):196–206.
56. Chung M-I, Bujnis M, Barkauskas CE, Kobayashi Y, Hogan BL. Niche-mediated BMP/SMAD signaling regulates lung alveolar stem cell proliferation and differentiation. *Development.* 2018;145(9):dev163014.
57. Luo Y, Chen H, Ren S, Li N, Mishina Y, Shi W. BMP signaling is essential in neonatal surfactant production during respiratory adaptation. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 2016;311(1):L29–38.
58. Frum T, Hsu PP, Hein RF, Conchola AS, Zhang CJ, Utter OR, et al. Opposing roles for TGF β -and BMP-signaling during nascent alveolar differentiation in the developing human lung. *NPJ Regen Med.* 2023;8(1):48.
59. Sakaki-Yumoto M, Liu J, Ramalho-Santos M, Yoshida N, Derynck R. Smad2 is essential for maintenance of the human and mouse primed pluripotent stem cell state. *J Biol Chem.* 2013;288(25):18546–60.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

2. Segundo artículo:

“Selection of the Most Suitable Culture Medium for Patient-Derived Lung Cancer Organoids”

Resumen

Introducción. En las últimas décadas, un modelo *in vitro* que ha ganado relevancia para estudiar enfermedades pulmonares han sido los organoides de pulmón derivados de pacientes. A día de hoy no se han estandarizado las condiciones de establecimiento y cultivo de estos organoides tumorales y normales. En este sentido diferentes grupos utilizan diferentes medios de cultivo que generan variabilidad en las características de los organoides generados. En el presente trabajo, se decidió comparar 3 de los medios de cultivo descritos más utilizados en la generación de organoides pulmonares, con el fin de identificar las condiciones más adecuadas para su cultivo y que nos permitan realizar una mejor translación de los resultados obtenidos en el estudio embrionario al cáncer.

Metodología. Se obtuvieron muestras de tejido tumoral y tejido normal emparejado de 71 pacientes diagnosticados con CPCNP en estadios tempranos, quienes fueron sometidos a resección quirúrgica. De las muestras de tejido tumoral se cultivaron LCOs, mientras que del tejido normal se generaron LNOs. Estos organoides se cultivaron en tres tipos de medios: un medio de cultivo permisivo (PCM, del inglés *permissive culture medium*), un medio de cultivo limitante (LCM, del inglés *limiting culture medium*) y un medio basal mínimo (MBM, del inglés *minimum basal medium*). Se evaluó la capacidad de estos medios para establecer cultivos de organoides, mantener la viabilidad celular, y promover características fenotípicas específicas. Para ello, se emplearon distintas metodologías, incluyendo análisis de imagen con Fiji de ImageJ, cuantificación de los niveles de ATP utilizando el reactivo CellTiter-Glo 3D, y estudios de inmunofluorescencia en cortes histológicos de organoides pulmonares.

Resultados. El PCM fue el medio más eficaz para establecer nuevas líneas de organoides y permitió su expansión a largo plazo, haciéndolo adecuado para estudios prolongados. En contraste, el MBM, aunque menos eficiente en términos generales, fue el único que logró prevenir el crecimiento excesivo de LNOs en los cultivos de LCOs, lo

cual es crucial para conseguir cultivos puros. Por otro lado, el LCM presentó un desempeño intermedio. Además, se observó que el medio de cultivo influía en la diferenciación de los LNOs. Los organoides cultivados en PCM tendieron a formar broncoesferas, mientras que en LCM se observaron alveolosferas, aunque con un crecimiento excesivo de células mesenquimales. En los LCOs, las características morfológicas también variaron según el medio empleado.

Conclusiones. La selección del el medio de cultivo tiene un impacto significativo en el desarrollo y diferenciación de los organoides pulmonares. Los resultados destacan la importancia de elegir las condiciones de cultivo adecuadas según los objetivos de estudio, especialmente en investigaciones sobre el cáncer de pulmón y aplicaciones en medicina personalizada.

Selection of the Most Suitable Culture Medium for Patient-Derived Lung Cancer Organoids

Melissa Acosta-Plasencia^a Yangyi He^{a, b} Daniel Martínez^{c, d, e}
Juan Pablo Orozco^f Antonio Carrasco^c Antonio Altuna-Coy^a
Tianmiao Yang^a Tania Díaz^a Laureano Molins^{d, e, g} Ricard Ramos^{d, e, g}
Ramón M. Marrades^{d, e, f, h} Alfons Navarro^{a, d, e}

^aMolecular Oncology and Embryology Laboratory, Department of Surgery and Medical Specializations, Human Anatomy and Embryology Unit, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain; ^bSchool of Basic Medical Sciences, Chengdu University, Chengdu, China; ^cDepartment of Pathology, Hospital Clínic de Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ^dThoracic Oncology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ^eInstitut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ^fDepartment of Pneumology, Institut Clínic Respiratori (ICR), Hospital Clínic de Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ^gDepartment of Thoracic Surgery, Hospital Clínic de Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ^hCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Keywords

Lung organoids · Lung cancer organoids · Culture medium · Non-small cell lung cancer · Alveolospheres · Bronchospheres

Abstract

Introduction: Patient-derived organoids have emerged as a promising in vitro model for precision medicine, particularly in cancer, but also in noncancer-related diseases. However, the optimal culture medium for culturing patient-derived lung organoids has not yet been agreed upon. This study aimed to shed light on the optimal selection of a culture media for developing studies using patient-derived lung organoids. **Methods:** Tumor and normal paired tissue from 71 resected non-small cell lung cancer patients were pro-

cessed for organoid culture. Lung cancer organoids (LCOs) were derived from tumor tissue and normal lung organoids (LNOs) from nonneoplastic lung tissue. Three different culture media were compared: permissive culture medium (PCM), limited culture medium (LCM), and minimum basal medium (MBM). We assessed their effectiveness in establishing organoid cultures, promoting organoid growth and viability, and compared their differential phenotypic characteristics. **Results:** While PCM was associated with the highest success rate and useful for long-term expansion, MBM was the best option to avoid normal organoid overgrowth in the organoid culture. The density, size, and viability of LNOs were reduced using LCM and severely affected with MBM. LNOs cultured in PCM tend to differentiate to bronchospheres, while alveolosphere differentiation can be observed in those cultured with LCM. The morphological

phenotype of LCO was influenced by the culture media of election. Mesenchymal cell overgrowth was observed when LCM was used. **Conclusion:** This work highlights the importance of considering the research objectives when selecting the most suitable culture medium for growing patient-derived lung organoids.

© 2024 The Author(s).
Published by S. Karger AG, Basel

Introduction

To date, lung cancer remains one of the most prevalent cancers worldwide and is the leading cause of cancer-related mortality, with approximately 1.8 million deaths per year [1]. This heterogeneous disease is classified into two main types: small cell lung cancer and non-small cell lung cancer (NSCLC). NSCLC is the most frequent type (80–85% of cases) and can be further classified into different histological subtypes where adenocarcinoma (ADK), squamous cell carcinoma (SCC), and large cell carcinoma are the most frequent ones. In early-stage NSCLC, surgical resection is considered the preferred and potentially curative therapeutic approach followed by adjuvant therapy in some patients (mainly stage II patients). Cisplatin-based adjuvant treatment is the most frequent option, but osimertinib can also be used in patients harboring EGFR mutations [2–4]. Recently, immunotherapy followed by surgical resection of the tumor has also begun to be considered a neoadjuvant treatment since good results have been obtained in clinical trials including early-stage patients [5]. However, with current treatment approaches, around 30% of resected patients will experience disease relapse, even after receiving adjuvant treatment [6]. After relapse, surgical patients can be treated with targeted therapy, depending on the mutational profile of the tumor, or even with immunotherapy. Therefore, the tumoral tissue obtained during the resection is used to generate in vitro models where test drug responses could permit the prediction of treatment outcomes or even help with personalized treatment decisions.

In recent decades, significant progress has been made in developing preclinical in vitro models for NSCLC, with cancer cell lines being the most widely used. However, this two-dimensional cell culture model does not faithfully replicate the complexity and heterogeneity of the original tumor and may lose key mutational features during long-term culture [7]. Patient-derived xenografts, on the other hand, exhibit a higher level of fidelity to patient tumors, but their establishment and utilization are time-consuming, expensive, and labor-intensive [8]. Recently, an in vitro model generated directly from adult stem cells,

known as patient-derived organoids, has gained popularity in precision medicine. Lung cancer organoids (LCOs) are three-dimensional (3D) structures that mimic each patient's tumor's genetic and molecular characteristics, even recapitulating the cellular diversity and tumor microenvironment [9]. Although LCOs generated from resected tumor tissue can be a valuable tool for personalized treatment, the methodology for its culture is still in a phase of ongoing development and continuous optimization without a unique solution for its establishment and culture. To ensure the optimal growth and development of LCOs, the presence of an extracellular matrix providing a 3D scaffold for organoids and facilitating crucial cell-ECM interactions is indispensable. This can be from different sources being Matrigel and collagen the most frequent ones [10]. Furthermore, for the stem cells responsible for generating LCOs to proliferate and differentiate into cell lineages that self-organize, providing an organoid culture medium with specific supplements is crucial [11], but each research group uses different media [12–20], which can affect the reproducibility of the organoid studies. Overall, the distinct culture media described in the literature can be categorized into two primary types: permissive culture medium (PCM) [13] and minimum basal medium (MBM) [14]. While PCM enhances the viability and long-term expansion of LCOs, it may lead to excessive proliferation of normal lung organoids (LNOs) [12, 13]. In contrast, MBM allows the obtention of a more enriched LCOs culture but considerably reduces the LCO expansion [14, 15]. Additionally, there are intermediate options, referred to by the own authors [15] as limited culture medium (LCM), which do not contain most of the growth factors necessary for the growth of LNOs such as FGF7, FGF10, R-spondin, and Noggin included in the PCM, but it contains other factors such as dexamethasone and forskolin not contained in MBM. Currently, there is no consensus on the optimal culture medium for growing patient-derived LCOs for personalized medicine applications [10].

In this study, we compared three of the most used LCO culture media [12, 14, 15] and evaluated the success rate of each one in establishing both LCO and LNO cultures, the viability of the organoids obtained, and described their main phenotypic characteristics in correlation with the clinical-pathological characteristics of the patient of origin. The medium described by Sachs et al. [12], a PCM, has been compared against the LCM reported by Hu et al. [15] and the MBM from Kim et al. [14]. The results of the present work confirm that important differences exist between organoid cultures obtained with each medium and aim to help in the decision of the best medium selection for each scientific purpose.

Methods

Patient Samples

Tumor and normal paired tissue were prospectively collected from 71 adult patients diagnosed with NSCLC who underwent complete surgical resection at the Hospital Clínic of Barcelona (Spain) from January 2021 to July 2023 and who consented to participate in the study. Samples were obtained within 6 h of surgery, submerged in phosphate-buffered saline, and transported on ice to the laboratory to establish organoid cultures (Fig. 1a). The main clinical and histological characteristics of the patients used for organoid culture establishment are presented in online supplementary Table 1 (for all online suppl. material, see <https://doi.org/10.1159/000541274>). The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Clínic of Barcelona (project approval number HCB/2021/0711).

Organoid Establishment, Culture, and Passage

Tissue biopsies were mechanically dissociated into smaller pieces with a sterile scalpel and then enzymatically dissociated by incubation with 1 mg/mL collagenase type II (Merck, Darmstadt, Germany) and 100 µg/mL DNase I (Merck) in DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with intermittent agitation on an orbital shaker at 37°C for 2 h. After enzymatic digestion, the suspensions were passed through a 100-µm cell strainer and centrifuged at 400 g for 5 min. If a red pellet was observed, 1 mL red blood cell lysis buffer (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) was added to lyse the erythrocytes for 5 min at room temperature. The resulting cell clusters were resuspended in cold Matrigel (Corning, NY, USA) and 30 µL drops were seeded into prewarmed 48-well culture plates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) at 37°C for 10–20 min. After solidification, 400 µL of organoid culture media was added to each well, and plates were placed into incubators in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. This was considered passage 0. The culture medium was changed every 3 days and at 2 weeks organoids were passaged as previously described [21]. Briefly, organoid cultures were resuspended in 10 mL cold DMEM/F12, enzymatically dissociated in 2 mL TrypLE Express (Gibco, Thermo Fisher) for 5 min at 37°C, and mechanically dissociated with flamed glass Pasteur pipettes. After centrifugation at 400 g for 5 min, the fragmented organoid suspension was mixed with cold Matrigel and reseeded at a 1:4 ratio, allowing new organoids to form. This was considered passage 1 and so on.

Organoid Culture Media

The three different self-renewing culture media (PCM, LCM, and MBM) used for LNOs and LCOs are described in Table 1. Briefly, PCM [12] contained Advanced DMEM/F12 supplemented with 100 µg/mL penicillin/streptomycin (Gibco), 2 mM GlutaMax 100X (Gibco), 10 mM HEPES (Gibco), 1:50 B-27 (Gibco), 5 mM nicotinamide (Sigma Aldrich), 1.25 mM N-acetylcysteine (Sigma Aldrich), 500 ng/mL R-spondin 1 (PeproTech), 25 ng/mL FGF-7 (StemCell), 100 ng/mL FGF-10 (StemCell), 100 ng/mL Noggin (PeproTech), 5 µM Y-27632 (StemCell), 500 nM A83-01 (Sigma Aldrich), and 500 nM SB202190 (Sigma Aldrich). LCM [15] included Advanced DMEM/F12 supplemented with 100 µg/mL penicillin/streptomycin (Gibco), 2 mM GlutaMax 100X (Gibco), 10 mM HEPES (Gibco), 1:50 B-27 (Gibco), 5 mM Nicotinamide (Sigma Aldrich), 1:100 N-2 supplement (Gibco), 1.25 mM N-Acetylcysteine (Sigma Aldrich), 50 ng/mL EGF (StemCell), 10 µM Y-27632 (StemCell), 5 µM A83-01 (Sigma Aldrich), 3 µM SB202190 (Sigma Aldrich), 10 µM Forskolin (Selleckchem), and 3 nM dexamethasone (Selleckchem). MBM [14] consisted of Advanced DMEM/F12 supplemented with 100 µg/mL penicillin/streptomycin (Gibco), 1:50 B-27 (Gibco), 1:100 N-2 supplement (Gibco), 50 ng/mL EGF (StemCell), 20 ng/mL bFGF (Gibco), and 10 µM Y-27632 (StemCell).

Organoid Visualization and Area Measurement

Images of the LNOs and LCOs were taken every 3–4 days with the Olympus IX53 inverted microscope. The area of each organoid was measured using the Fiji plugin of ImageJ version 2.14.0/1.54f.

Organoid Viability Analysis

After passage was performed as described above, 1×10^3 cells were resuspended in Matrigel, and 10 µL drops were seeded in a white, opaque-walled 96-well plate (Greiner Bio-One). Upon Matrigel solidification, 100 µL of culture medium was added. Viability measurements were performed on 0 h, 72 h, and 144 h using CellTiter-Glo 3D Viability Assay (Promega, Madison, WI, USA) as per manufacturer's instructions. Briefly, after 30 min of plate equilibration to room temperature, CellTiter-Glo 3D (Promega) reagent was added to each well in a volume of 1:1. The plate was shaken at 1,440 rpm for 5 min and incubated for 25 min at room temperature. The luminescence was measured in an Orion II Microplate Luminometer with an integration time of 1 s per well.

Immunofluorescence Analysis of Organoids

Prior to fixation, organoids were removed from Matrigel using Corning Cell Recovery Solution (Corning, 354253). The organoids were fixed in 4% paraformaldehyde,

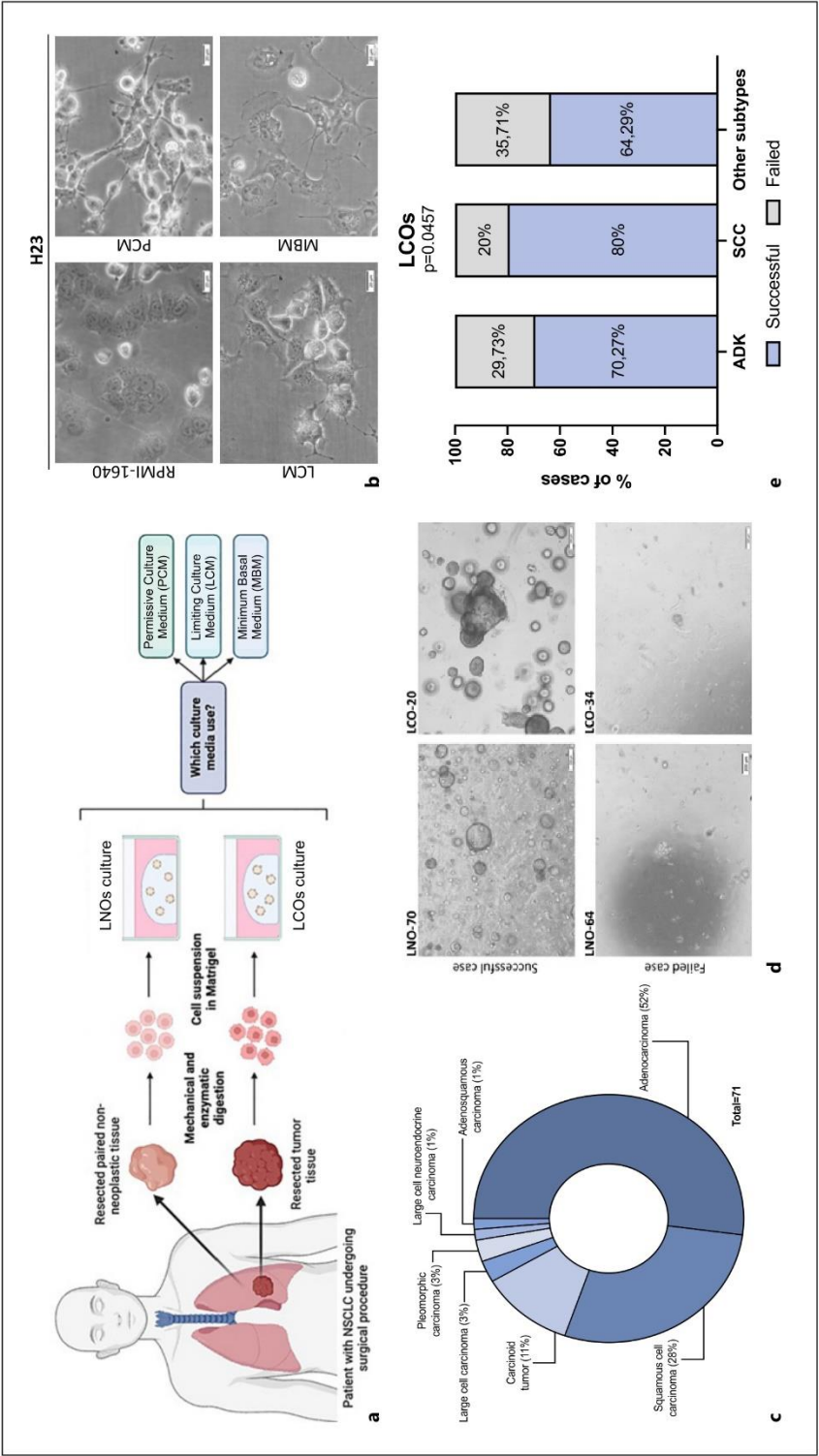


Fig. 1. LNOs were established from patients diagnosed with non-small cell lung cancer. **a** Illustration of the procedure used to culture LNOs and LCOs. Paired nonneoplastic and tumor tissues were obtained by surgery, digested, and resuspended in Matrigel to generate LNOs and LCOs, respectively. **b** H23 cell line was cultured using RPMI-1640 medium, PCM, LCM, and MBM. Scale bar: 20 μ m. **c** Pie chart showing the subtypes of the tumor tissues used to generate the 71 LCOs included in this work. **d** Bright-field microscopy images of successful and failed cases of LNOs and LCOs. Scale bar, 200 μ m. **e** Bar graph comparing the percentage success rate of LCOs derived from ADK (n = 37 cases), SCC (n = 20 cases), and other tumor tissues (n = 14 cases).

Table 1. The three different self-renewing culture media for patient-derived LNOs

Reagents	Functions	Source	Final concentration		
			permissive culture medium	limiting culture medium	minimum basal medium
			Sachs et al. [12] (2019)	Hu et al. [15] (2021)	Kim et al. [14] (2019)
Advanced DMEM/F12	Base medium	Thermo Fisher Scientific	1x	1x	1x
Penicillin/streptomycin	Antibiotics	Gibco	100 µg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL
GlutaMax 100x	Nutrient	Gibco	2 mM	2 mM	
HEPES	Buffer	Gibco	10 mM	10 mM	
B-27	Cell proliferation and tumor spheres formation	Gibco	1:50	1:50	1:50
Nicotinamide	Cell death prevention	Sigma Aldrich	5 mM	5 mM	
N-2 supplement	Co-enzyme precursor	Gibco		1:100	1:100
N-Acetylcysteine	Oxidative stress protection	Sigma Aldrich	1.25 mM	1.25 mM	
R-spondin 1	Stem cell proliferation and self-renewal	PeproTech	500 ng/mL		
FGF-7	Epithelial stem cell maintenance	StemCell	25 ng/mL		
FGF-10	Lung stem cell differentiation and organoid branching	StemCell	100 ng/mL		
EGF	Epithelial cell growth and differentiation	StemCell		50 ng/mL	50 ng/mL
bFGF	Stem cell capacity and survival	StemCell			20 ng/mL
Noggin	Epithelial stem cell maintenance	PeproTech	100 ng/mL		
Y-27632	Cell death prevention	StemCell	5 µM	10 µM	10 µM
A83-01	Cell growth and proliferation	Sigma Aldrich	500 nM	5 µM	
SB202190	Cell death prevention	Sigma Aldrich	500 nM	3 µM	
Forskolin	LNO survival	Selleckchem		10 µM	
Dexamethasone	Alveolar maturation	Selleckchem		3 nM	

Entries in bold denote the reagents present in the medium.

included in Histogel (Fisher Scientific, 12006679), and subsequently embedded in paraffin. Immunofluorescence procedures were performed as previously described [22]. For immunostaining, the following primary antibodies were utilized: rabbit anti-p63 (Proteintech, 12143-1-AP), mouse anti-CC10 (Santa Cruz, sc-365992), mouse anti-AQP5 (Santa Cruz, sc-514022), and rabbit anti-SFTPC (Proteintech, 10774-1-AP). Secondary antibodies in-

cluded Alexa 488-anti-mouse donkey IgG antibody (Thermo Fisher Scientific, A28175) and Alexa 568 anti-rabbit donkey IgG antibody (Thermo Fisher Scientific, A10042).

Cell Lines

Cryopreserved samples of the lung cancer cell line H23 (CRL-5800, ATTC, Manassas, VA, USA) were received in our laboratory and passed for less than 6

months. H23 was cultured in RPMI 1640 (catalog number 21875091, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% FBS (catalog number 16000044, 1:10, Thermo Fisher Scientific) or with organoid culture media used in the study. The cell line was grown at 37°C in 5% CO₂ and 95% relative humidity.

Statistical Analysis

T-tests or U-Mann Whitney test, when appropriate, were used for comparisons between two groups of samples, and ANOVA or Kruskal-Wallis test was used for comparisons between more than two groups. Fisher's exact probability test or χ^2 test when appropriate was used to compare differences in frequency distributions between groups. At least three technical and three biological replicates have been performed in each in vitro experiment. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism v. 10.1.1 (La Jolla, CA, USA).

Results

Effect of Organoid Culture Media Selection on an Established Lung Cancer Cell Line

After tissue obtention and processing from surgical patients for organoid culture preparation (illustrated in Fig. 1a), we must choose the appropriate culture medium to establish them. This election is significant because the different culture media used have a different effect not only on organoids' growth but also on their intrinsic characteristics. To highlight this, we cultured the H23, a well-characterized lung cancer cell line, with its regular medium or with the 3 organoid culture media used in the present study (Fig. 1b). Different morphologies can be appreciated in the 2D culture of the H23 cell line when cultured with its regular medium (RPMI-1640) or with the different organoid culture media analyzed in the present study. When cultured in RPMI-1640 medium, the H23 cells exhibited robust growth and maintained high viability across multiple passages. Morphologically, these cells predominantly exhibited a rectangular shape, with only a minority showing branching or extensions. In contrast, when cultured with the PCM, LCM, and MBM, the H23 cells failed to establish successfully across consecutive passages. The remaining cells underwent significant morphological changes, with some adopting a rounded morphology and the majority showing an elongated shape with several ramifications and slight differences between the three media. Clear phenotypic differences can be observed depending on the culture media used (Fig. 1b).

Establishment of Patient-Derived LNOs and LCOs from Patient Samples

We cultured with the aim to establish new organoid cell lines 142 tissue samples, 71 from resected tumor tissue and 71 from the paired nonneoplastic tissue (online suppl. Table 1). Most of the tissues were obtained from ADK patients in 52% of cases and from SCC patients in 28% of cases. Less frequent histological types of the tumor of origin included large cell carcinoma (3%), pleomorphic carcinoma (3%), large cell neuroendocrine carcinoma (1%), or adenosquamous carcinoma (1%) (Fig. 1c). To assess the effectiveness of organoid generation from resected lung tissues, we considered a successful case when organoid formation was observed from passage 1 to passage 2. Figure 1d shows images of successful and failed cases of LNOs and LCOs. Independently of the media used, we observed significant differences in the LCO establishment ratio depending on the histology of the tumor of origin ($p = 0.0457$, Fig. 1e). LCOs derived from SCC samples showed an 80% success rate, followed by those derived from ADK with 70% and from other lung cancer subtypes with 64.29%.

Effectiveness of Each Culture Medium for Patient-Derived LNOs and LCOs Establishment

When LNOs and LCOs were cultured, variations in success rates were noted between passages 1 and 2 among the three different self-renewing culture media (Fig. 2, $p < 0.001$). The highest success rate in patient-derived LNO establishment was achieved with the PCM. Using PCM, culture success rates were notably higher in both types of LNOs compared to other media, reaching 73% for LNOs and 81% for LCOs. The LCM yielded a slightly higher success rate for LCOs at 63%, while it was 50% for LNOs. The medium associated with the highest failure rates was the MBM, with a success rate of only 29% for LNOs and 35% for LCOs (Fig. 2a). This is evidenced by the bright-field images of cases LNO-69 and LCO-69, illustrating a decrease in organoid establishment between passages 1 and 2 when cultured with the LCM or MBM instead of PCM (Fig. 2b).

Growth Rate and Cell Viability of Patient-Derived Organoids with Each Culture Medium

Organoid size and growth were also affected by the culture media, and notable differences were identified mainly between the PCM and MBM (144 h, $p = 0.0004$). LCM occupied an intermediate position (Fig. 3a, b). The mean organoid area (mm²) after 144 h of culture with PCM was 19.5×10^{-3} , representing 178.5% of growth from 0 h. In comparison, organoids cultured with LCM

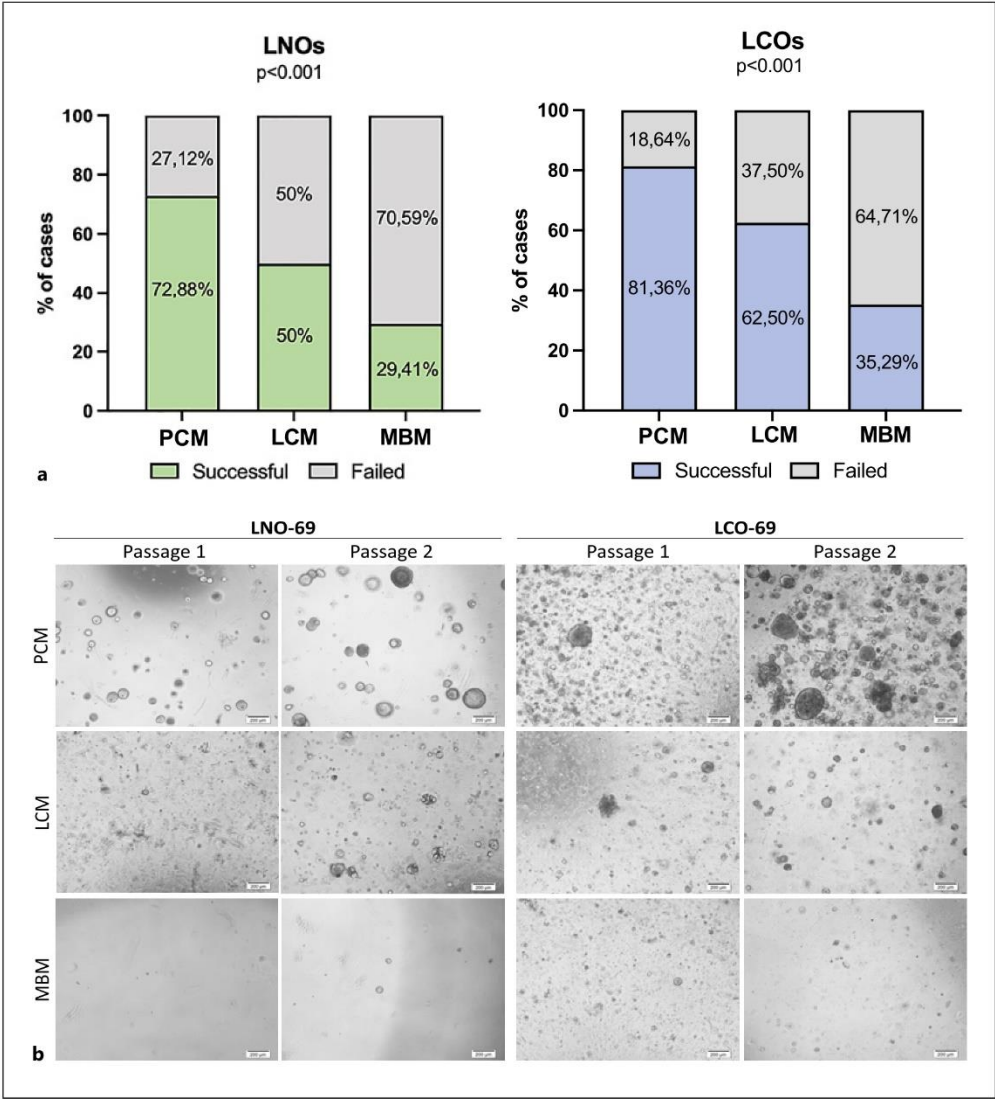


Fig. 2. Culture success rates of LNOs and LCOs using the three-culture media. **a** Bar graph illustrating the percentage success rates of LNOs and LCOs cultured in PCM ($n = 118$ cases), LCM ($n = 16$ cases), and MBM ($n = 34$ cases). **b** Bright-field microscopy images of LNO-69 (originated from the paired nonneoplastic tissue of a lung SCC patient) and LCO-69 (originated from a cancerous tissue of a lung SCC patient) lines cultured using PCM, LCM, and MBM across passages 1 and 2. Scale bar, 200 μm .

exhibited an area of $9.4 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ (143% growth), while those cultured with MBM showed an area of $4.1 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ (103% growth). Moreover, we assessed whether the choice of the culture media influenced the number of metabolically active cells by measuring ATP levels (as an indirect measure of the number of viable cells). This analysis (Fig. 3c) showed significant differences at

144 h between PCM and either LCM ($p = 0.0004$) or MBM ($p = 0.0005$). In the bright-field images, it becomes apparent that, generally, there is a higher quantity of LNOs cultured in the PCM, and they had a major increase in size over the days in comparison to LCM and MBM. It is important to highlight that the density of LNOs was highly compromised when grown with MBM (Fig. 3b).

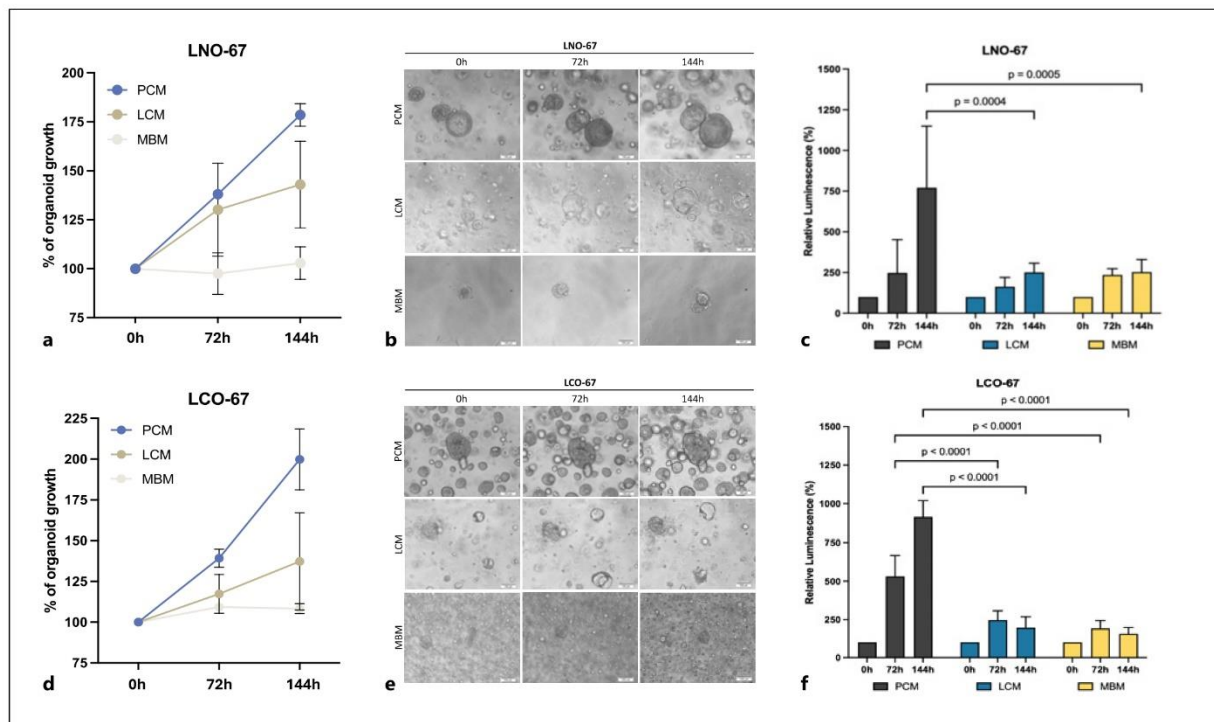


Fig. 3. Representation of growth rate and quantification of metabolically active cells (ATP levels) among patient-derived organoids when cultured with each culture media. **a** The area of organoids from the LNO-67 case (originated from the paired nonneoplastic tissue of a lung ADK patient) cultured in PCM ($n = 7$ individual organoids), LCM ($n = 5$ individual organoids), and MBM ($n = 3$ individual organoids) was measured, and their growth rates over 144 h days were plotted. The growth rate was calculated by tracking each organoid and dividing the area on the final time by that on 0 h (day 3 of passage 3). **b** Representative images of LNO-67 case organoids cultured in PCM, LCM, and MBM, illustrating their changes on 0 h, 72 h, and 144 h. Scale bar, 100 µm. **c** Quantification of metabolically active cells by measuring ATP levels in the culture of LNO-67 line

cultured with PCM, LCM, and MBM media for 144 h days. The graph shows % of 0 h (day 0 after passage 3) of relative luminescence. **d** Growth rates during 144 h of LCO-67 case (originated from cancerous tissue of a lung ADK patient) cultured with PCM ($n = 7$ individual organoids), LCM ($n = 5$ individual organoids), and MBM ($n = 3$ individual organoids). **e** Bright-field microscopy images capturing the growth progression of LCO-67 case organoids cultured in PCM, LCM, and MBM on 0 h (day 3 of passage 3), 72 h, and 144 h. Scale bar, 100 µm. **f** Bar graph comparing the use of PCM, LCM, and MBM in relation to the quantity of metabolically active cells by measuring ATP levels in the culture of LCO-67 case over 144 h. The graph shows % of 0 h (day 0 after passage 3) of relative luminescence. Data are represented as mean $\pm$ SEM.

In the case of LCOs (Fig. 3e, f), those cultured with PCM also exhibited the highest growth during the 144 h. Significant differences in growth in PCM versus LCM ($p = 0.003$) and PCM versus MBM ($p < 0.0001$) were observed (Fig. 3d). LCOs cultured with PCM exhibited an area of $15.2 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ (200% growth), while organoids cultured with LCM showed an area of $7 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ (136% growth), and those cultured with MBM showed an area of $3.9 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ (108% growth). Moreover, the quantification of the metabolically active cells (Fig. 3f) showed significant differences at 72 h and 144 h between PCM and either LCM ($p < 0.0001$) or MBM ($p < 0.0001$).

Bright-field images substantiate these findings, clearly illustrating a higher number of LCOs and enhanced growth when cultured with PCM compared to the other media (Fig. 3e).

Lung Organoid Cultures Exhibit Evident Differences in Their Morphological Characteristics when Grown with Each Culture Medium

We observed that the selection of the culture medium impacted the phenotypic features of patient-derived LNO cultures, from their generation and establishment to the subsequent passages. It has been reported before that

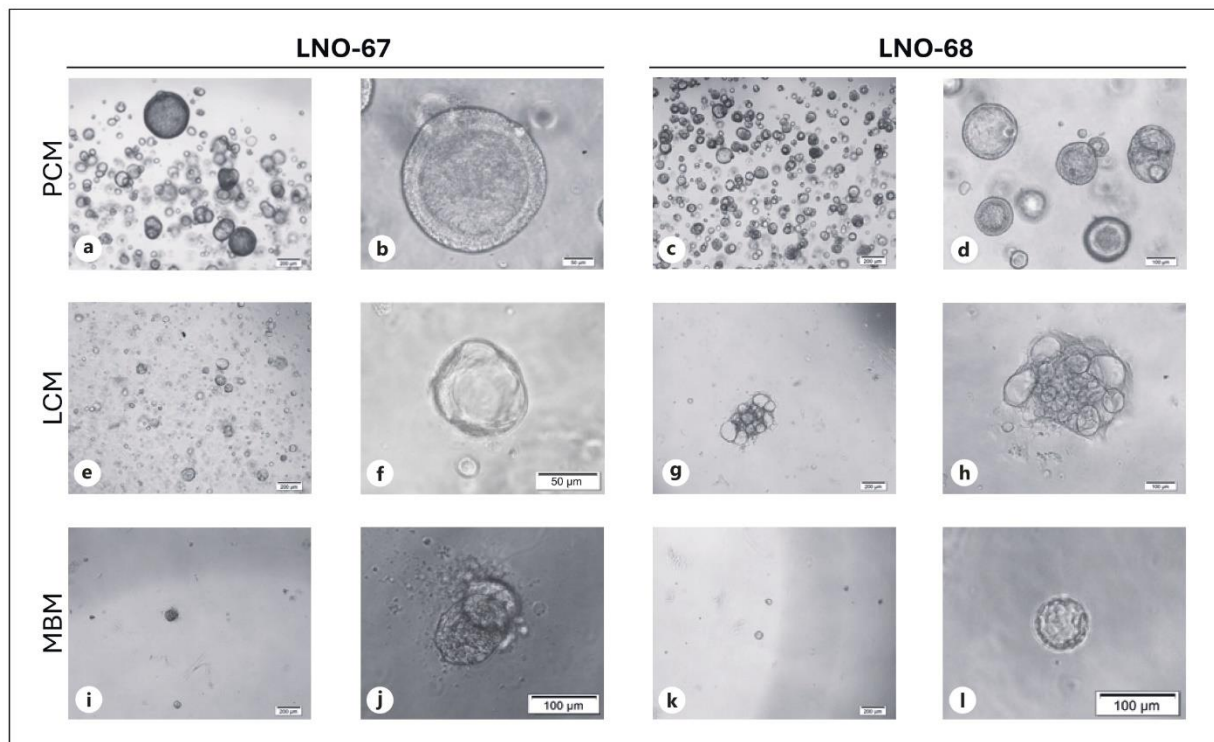


Fig. 4. Phenotypic characteristics of LNOs when cultured with the three-culture media. Comparative of LNOs derived from the paired nonneoplastic tissue of a lung ADK patient (LNO-67) and a lung SCC patient (LNO-68) when cultured in PCM, LCM, and MBM. LNO-67 (a, b) and LNO-68 (c, d) organoids cultured with PCM exhibit lumens and larger sizes, morphological character-

istics of bronchospheres. LNO-67 (e, f) and LNO-68 (g, h) organoids growth with LCM resulted in organoids with lumens, but these were smaller and resembled alveolosphere-like structures. LNO-67 (i, j) and LNO-68 (k, l) organoids cultured with MBM appeared as undifferentiated structures. Scale bar: 200, 100, and 50 μm.

LNOs can become differentiated in bronchospheres [23, 24] and alveolospheres [25] resembling bronchial histology or alveolar histology, respectively. We observed that the frequency of emergence of the different types of differentiated structures varies depending on the culture media used. When LNOs were cultured with PCM, more bronchosphere-like structures could be observed independently of the histological subtype of origin. As observed in the case of LNO-67 (paired nonneoplastic tissue from an ADK patient; Fig. 4a), the culture was characterized by large-sized organoids with a multicellular peripheral layer surrounding a central lumen (Fig. 4b). The same can be observed for LNO-68 (paired nonneoplastic tissue from an SCC patient; Fig. 4c, d). To validate that the morphologies observed by brightfield correspond to bronchospheres-like structures, we embedded the LNOs cultured in PCM in paraffin and performed hematoxylin staining (Fig. 5a) and immu-

nofluorescence analysis (Fig. 5b, c). Immunofluorescence showed that the LNOs cultured with PCM were positive for P63, a basal marker, and CC10, a club cell marker. The presence of basal and club cells is a characteristic of bronchospheres.

In contrast, most of the organoids cultured with LCM (Fig. 4e, g) appeared smaller and exhibited a single-layered external membrane of flattened cells around the central lumen, resembling alveolospheres (Fig. 4f, h). To validate that the morphologies observed by brightfield correspond to alveolosphere-like structures, we embedded the LNOs cultured in LCM in paraffin and performed hematoxylin staining (Fig. 5d) and immunofluorescence analysis (Fig. 5e, f). Immunofluorescence showed that the LNOs cultured with LCM were positive for AQP5, an AT1 cell marker, and SFTPC, an AT2 cell marker. The presence of AT2 and AT1 cells is a characteristic of alveolospheres.

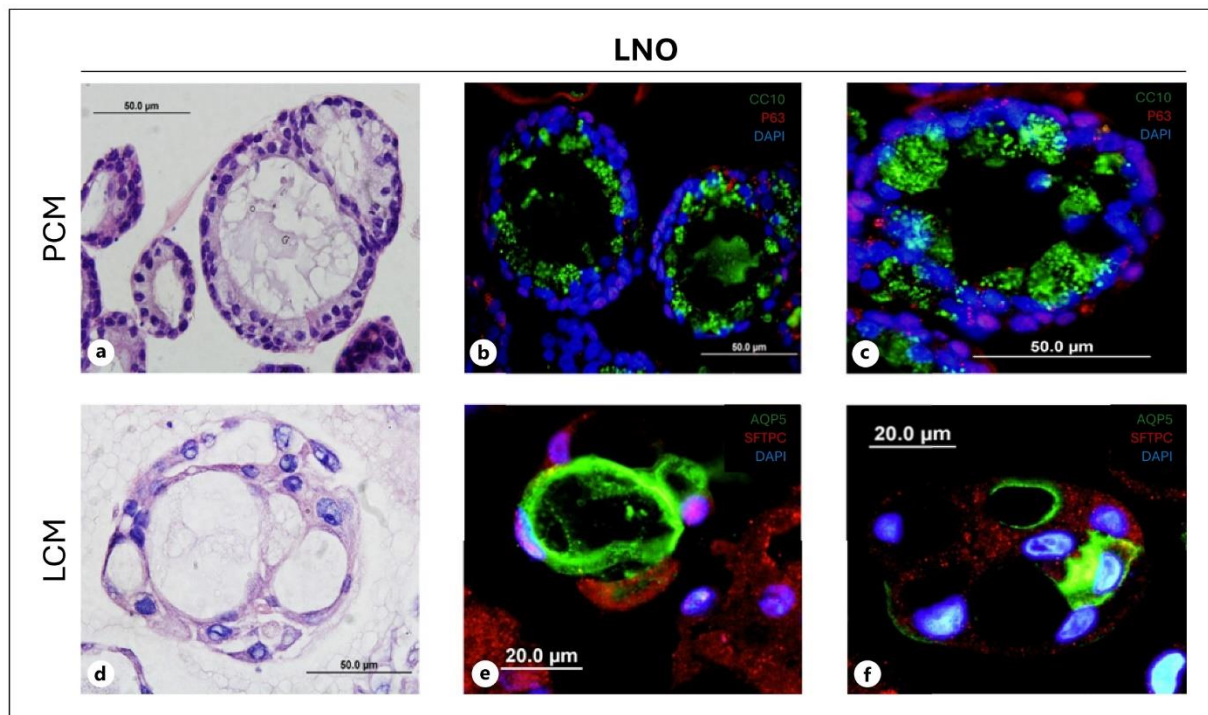


Fig. 5. Immunofluorescence analysis of LNOs. **a** Hematoxylin-eosin staining of LNOs cultured with PCM. **b, c** Immunofluorescence analysis of LNOs cultured with PCM. CC10 (green) was used to detect club cells, P63 (red) for basal cells, and DAPI (blue) stains all nucleus. **d** Hematoxylin-eosin staining of LNOs cultured with LCM. **e, f** Immunofluorescence analysis of LNOs cultured with LCM. AQP5 (green) was used to detect AT1 cells, SFTPC (red) for AT2 cells, and DAPI (blue) stains all nuclei. Scale bar: 50 and 20 µm.

While LNOs' growth was highly compromised with MBM (Fig. 4i, k), a different phenotype was observed compared to other media. LNOs cultured in MBM resembled spheroids without differentiation to either bronchosphere or alveolosphere (Fig. 4j, l).

In the case of LCOs cultured in PCM, they typically displayed disorganized growth, and an irregular architecture compared to normal organoids, with an absence of a visible lumen in most of them, as noted in the images of LCO-67 (Fig. 6a, b). However, some organoids exhibited cystic structures resembling bronchospheres, regardless of their tissue origin from ADK or SCC tissue, as observed in the case of LCO-68 (Fig. 6c, d). This could be attributed to certain reagents present in PCM, which may promote the contamination of normal organoids alongside tumor-derived ones. It should be required, when possible, to verify that the organoids reproduce the mutational status from the tumor of origin to be sure that the observed morphology corresponds to LCOs. In the

case of LCO-67, there was no available information about the mutational status of the tissue of origin, and in LCO-68, the tumor of origin did not harbor point mutations that allowed this verification. In contrast, when these organoids were cultured in LCM, a variety of morphologies were observed, including lumen-less structures (Fig. 6e, f). Interestingly, numerous organoids appeared to be alveolospheres, despite the reduction in LCM of factors that typically promote normal organoid growth (Fig. 6g, h). Organoids cultured with MBM exhibited a small size and displayed a compact, disorganized cellular structure. Additionally, contamination with bronchospheres or alveolospheres was not observed (Fig. 6i–l).

Notably, some organoid cultures with LCM (both normal and tumor-derived) showed mesenchymal cell overgrowth, leading to occasional organoid clustering, as observed in the bright-field microscopy image of LNO-68 (Fig. 4g, h, 6g, h). This phenomenon was not observed in organoids cultured with either PCM or MBM. Although

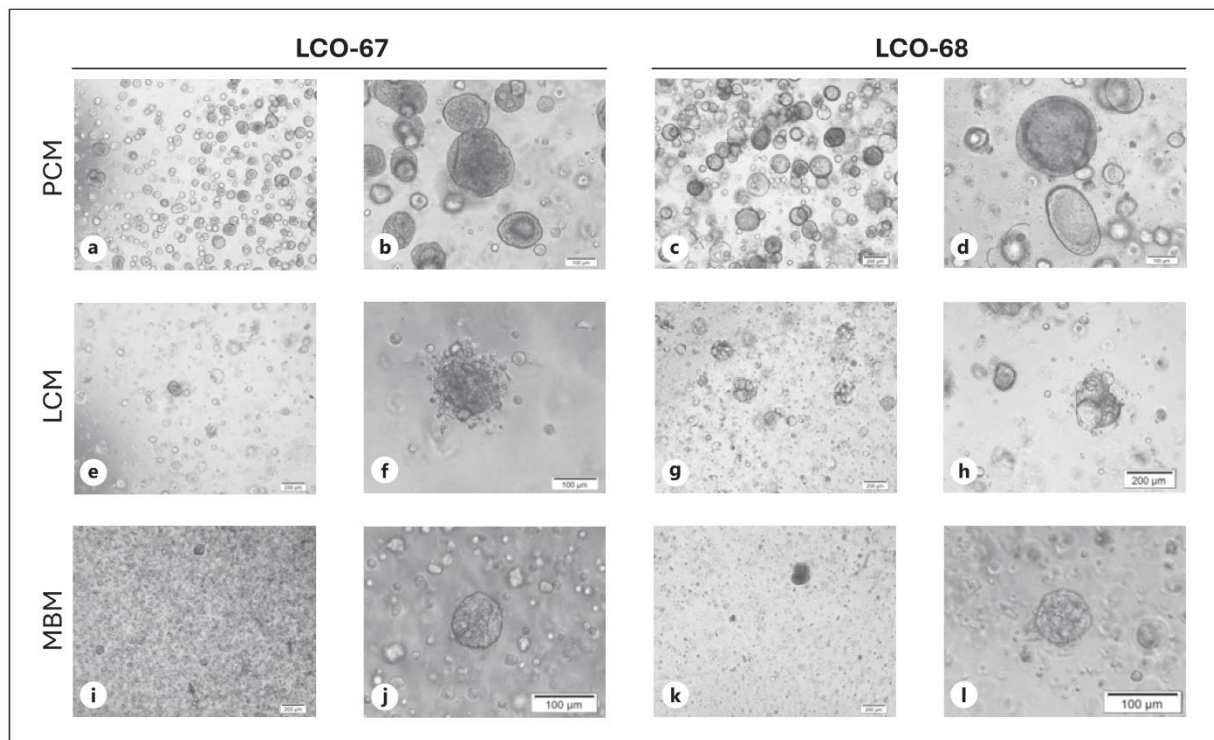


Fig. 6. Morphological features of LCOs when cultured with each culture media. Comparison of LCOs derived from lung ADK (LCO-67) and lung SCC (LCO-68) when cultured in PCM, LCM, and MBM. **a, b** LCO-67 organoids displayed a compact and disorganized structure, characteristic of typical tumor organoids when cultured with PCM. **c, d** Culture of LCO-68 in PCM showed some organoids with normal morphological

characteristics, with a lumen and resembling bronchospheres. **e, f** LCO-67 cultured with LCM maintained a tumor-organoid structure. **g, h** LCO-68 organoids grown with LCM displayed alveolosphere-like structures. LNO-67 (**i, j**) and LNO-68 (**k, l**) organoids cultured with MBM showed an irregular cell architecture and absence of a visible lumen. Scale bar: 200, 100, and 50 µm.

mesenchymal cells were initially present in PCM and MBM media, their numbers gradually decreased with successive passages.

Discussion

Patient-derived organoids have emerged as valuable tools in lung cancer research, recapitulating the histological and molecular characteristics of the tissues from which they are derived. However, there are still numerous challenges to face in the culture of LNOs, including the lack of an optimal culture medium adapted to the different LNO and LCO types. Moreover, the different available culture media are complex since they include a high proportion of growth factors that as we have shown in an established lung cancer cell line (H23) and have

different effects on proliferation and even in morphology of this cell line cultured in 2D. After the initial passages, we noted that growing the H23 cells with the PCM, LCM, or MBM resulted in reduced viability, with only a small percentage of cells able to establish. A subpopulation of cells had been selected, and changes in their morphology with the appearance of numerous extensions were observed. These changes could be due to certain reagents, such as FGF-7 and FGF-10, which promote differentiation toward distal progenitor lineages and, together with EGF, induce branching [26]. These results showed that the different culture media composition needs to be taken into consideration before beginning any molecular study. Therefore, a study comparing the formulations of the most used LNO culture media was necessary. This article sheds some light on the selection of the most appropriate medium, which, in our opinion, will depend on whether

we aim to work with LNOs or LCOs and on the specific experiments planned for the research, including, for instance, which pathways will be analyzed or if long-term expansion of organoids will be required. Moreover, in the case that we focus on LCOs, the presence of mutations in the tumor of origin can be useful to verify that we are growing LCOs to ensure the purity of the cancer cells present in the culture.

An LCO culture medium is considered optimal when it enables the successful establishment of organoids, long-term expansion, and maintenance of the purity of cancer cells in culture. However, none of the current media satisfy all requirements. PCM, such as the one described by Sachs et al. [12], allows viable organoids to be maintained over time but cannot prevent the overgrowth of normal organoids. Specially in this medium, it is important to verify the purity of LCOs, which can be done through verification that the mutational patterns of the tumor of origin are conserved in the generated organoid, which does not always happen [13]. In our study, only 2 of 6 (with available information) LCOs cultured with PCM (33%) retained the mutations detected in the tumor of origin. Therefore, we must consider completing the culture media with some reagents that improve the survival of mutated populations. For instance, in TP53-mutated cases we can add NUTLIN-3A in the medium, an MDM2 inhibitor that only allows the growth of TP53-mutated cells [12]. Another example is the use of the pan-ErbB inhibitor, which exploits the high prevalence of mutations in the ERBB pathway [20]. These methods are unsuitable for all cases since mutations found in the tumor of origin are diverse. Additionally, this can produce a loss of the heterogeneity found in the original tumor, where different cancer cell populations coexist even with different mutational patterns.

On the other hand, LCM or MBM media, such as those used by Hu et al. [15] and Kim et al. [14], only allow short-term viability of organoids, although they ensure reduction/inhibition of normal organoid growth. PCM had the highest success rate and was the most effective on long-term expansion of organoids since we considered that an organoid cell line was successfully established if retained viability after the second passage. In this line, PCM was the most effective in retaining viability from the second passage onward, followed by LCM and MBM. Hence, for researchers interested in long-term studies, choosing the PCM medium enables multiple passages to be conducted over an extended period. Regarding the organoids' size, growth, and viability, it was observed that the PCM medium produced significantly larger organoids

with greater viability compared to the LCM and MBM media.

When we evaluated the success of LCOs establishment according to their histology using the three described media, it was noted that organoids derived from SCC exhibited the highest rate of successful establishment. In PCM-cultured organoids, this can easily be explained because it contains factors such as FGF-7, FGF-10, Noggin, and SB202190, which have been demonstrated to promote the establishment of basal stem cells [27], which are considered the cell of origin for SCC upon acquiring a malignant phenotype [28].

LNOs showed important differences in the morphological characteristics when cultured with the three different types of culture media. LNOs cultured with PCM clearly become differentiated through the passages into bronchospheres, whereas LNOs cultured with LCM also allowed alveolar differentiation. These findings can be explained by the different composition of each culture medium. LCM contains dexamethasone, which induces alveolar maturation [29], and EGF, which increases the size of alveolar organoids [30]. Regarding LNOs cultured with MBM, these did not seem to induce differentiation, probably because they presented only the minimal reagents required to allow the cells to organize into organoids for a brief period of time. In conclusion, for studies focused on the proximal airways, PCM medium is recommended to facilitate the growth of bronchospheres. On the other hand, the use of LCM medium is proposed for the study of alveolar structures.

Referring to LCO morphology, all three media resulted in the generation of compact and disorganized spheroids, typical characteristics of cancerous organoids. Notably, both PCM and LCM revealed the emergence of bronchospheres and alveolospheres, which are suspected to be derived mostly from normal stem cells. MBM was the only medium that did not show the appearance of organoids with a normal appearance in LCO cultures. Therefore, in studies aimed at obtaining a representative and specific population of cancer stem cells from the tumor, such as drug efficacy studies, the MBM medium is the preferred choice. Conversely, for investigations seeking a broader representation of the tumor microenvironment, encompassing both tumor and normal cells, the use of PCM or LCM media is recommended.

Interestingly, our work also revealed that the choice of culture medium influenced the growth of mesenchymal cells surrounding organoid cultures. Growth of mesenchymal cells was predominantly observed in

organoids cultured with LCM, often resulting in close interactions with alveolospheres, clustering them and forming structures reminiscent of alveoli. This implies that PCM and MBM may contain compounds that inhibit mesenchymal growth, such as *RSPO1*, which activates the Wnt/ β -catenin pathway [31]. This singularity is relevant for research involving the coculture of tumor organoids with mesenchymal cells to study the tumor microenvironment.

In summary, our work underscores the importance of considering the research objectives when selecting an appropriate culture medium to grow patient-derived LNOs. PCM is associated with the highest success rates, increased growth, and better cell viability, making it ideal for long-term studies. However, this medium promotes contamination of bronchospheres in tumor cultures, comparable to LCM, but with the overgrowth of alveolospheres instead. The medium that best reproduces tumor cells is MBM, ideal for drug testing studies that do not need to maintain organoid growth over a long period of time. Future studies should continue to explore and optimize the components and reagents of organoid culture media to ensure the most faithful representation possible of patient tumors, ultimately leading to advances in lung cancer research.

Statement of Ethics

This study was approved by the Bioethics Commission of the University of Barcelona (Project approval no. HCB/2021/0711). All the subjects signed the informed consent. The study adhered to the ethical guidelines outlined in the Helsinki Declaration (2002).

References

- Sharma R. Mapping of global, regional and national incidence, mortality and mortality-to-incidence ratio of lung cancer in 2020 and 2050. *Int J Clin Oncol*. 2022;27(4):665–75. <https://doi.org/10.1007/s10147-021-02108-2>
- Remon J, Soria J-C, Peters S; ESMO Guidelines Committee. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer: an update of the ESMO Clinical Practice Guidelines focusing on diagnosis, staging, systemic and local therapy. *Ann Oncol*. 2021;32(12):1637–42. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.08.1994>
- Wu Y-L, Tsuboi M, He J, John T, Grohe C, Majem M, et al. Osimertinib in resected EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2020;383(18):1711–23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2027071>
- Herbst RS, Tsuboi M, John T, Grohé C, Majem M, Goldman JW, et al. Osimertinib as adjuvant therapy in patients (pts) with stage IB–IIIA EGFR mutation positive (EGFRm) NSCLC after complete tumor resection: adaura. *J Clin Oncol*. 2020;38(18_Suppl 1):LBA5. https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.18_suppl.lba5
- Forde PM, Spicer J, Lu S, Provencio M, Mitsudomi T, Awad MM, et al. Neo-adjuvant nivolumab plus chemotherapy in resectable lung cancer. *N Engl J Med*. 2022;386(21):1973–85. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2202170>
- Uramoto H, Tanaka F. Recurrence after surgery in patients with NSCLC. *Transl Lung Cancer Res*. 2014;3(4):242–9. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2013.12.05>
- Wilding JL, Bodmer WF. Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer Res*. 2014;74(9):2377–84. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2971>
- Yoshida GJ. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):4–16. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0829-z>
- Xu Y, Xin W, Yan C, Shi Y, Li Y, Hu Y, et al. Organoids in lung cancer: a teenager with infinite growth potential. *Lung Cancer*. 2022;172:100–7. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2022.08.006>
- Rossi R, De Angelis ML, Xhelili E, Sette G, Eramo A, De Maria R, et al. Lung cancer organoids: the rough path to personalized medicine. *Cancers*. 2022;14(15):3703. <https://doi.org/10.3390/cancers14153703>

Conflict of Interest Statement

All the authors have reviewed and approved this version of the manuscript and agree with the decision to submit it. None of the authors declare any conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Funding Sources

This work was supported by the Ministry of Economy and Competition (MINECO), co-financed with the European Union FEDER funds (SAF2017-88606-P, 2017); SEPAR-AstraZeneca Ayudas Investigación PII Oncología 2021; Becas SEPAR 2022 (no de Proyecto 1326); Becas SEPAR 2023 (no de Proyecto 1482); and Cátedra UB Hospital Clínico de Cáncer de Pulmón AstraZeneca. Melissa Acosta-Plasencia is an FI-SDUR fellow from AGAUR.

Author Contributions

M.A.-P. performed the research and the statistical analysis and wrote the manuscript. Y.H., D.M., J.P.O., A.C., A.A., T.Y., T.D., L.M., R.R., and R.M.M. collaborated on the research. A.N. designed the study, wrote the manuscript, and took responsibility for the integrity of the data. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Data Availability Statement

All the data generated or analyzed during this study are included in this published article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

- 11 Ma H-C, Zhu Y-J, Zhou R, Yu Y-Y, Xiao Z-Z, Zhang H-B. Lung cancer organoids, a promising model still with long way to go. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2022;171:103610. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103610>
- 12 Sachs N, Papaspyropoulos A, Zomer-van Ommen DD, Heo I, Böttiger L, Klay D, et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J*. 2019; 38(4):e100300. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100300>
- 13 Dijkstra KK, Monkhorst K, Schipper IJ, Hartemink KJ, Smit EF, Kaing S, et al. Challenges in establishing pure lung cancer organoids limit their utility for personalized medicine. *Cell Rep*. 2020;31(5):107588. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107588>
- 14 Kim M, Mun H, Sung CO, Cho EJ, Jeon H-J, Chun S-M, et al. Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. *Nat Commun*. 2019; 10(1):3991. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11867-6>
- 15 Hu Y, Sui X, Song F, Li Y, Li K, Chen Z, et al. Lung cancer organoids analyzed on microwell arrays predict drug responses of patients within a week. *Nat Commun*. 2021;12(1):2581. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22676-1>
- 16 Shi R, Radulovich N, Ng C, Liu N, Notsuda H, Cabanero M, et al. Organoid cultures as preclinical models of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2020;26(5):1162–74. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1376>
- 17 Li Z, Qian Y, Li W, Liu L, Yu L, Liu X, et al. Human lung adenocarcinoma-derived organoid models for drug screening. *iScience*. 2020;23(8):101411. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101411>
- 18 Li Y, Gao Y, Liang B, Cao X, Sun Z, Yu J, et al. Patient-derived organoids of non-small cells lung cancer and their application for drug screening. *Neoplasma*. 2020; 67(2):430–7. https://doi.org/10.4149/neo_2020_190417N346
- 19 Kim S-Y, Kim S-M, Lim S, Lee JY, Choi S-J, Yang S-D, et al. Modeling clinical responses to targeted therapies by patient-derived organoids of advanced lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2021;27(15):4397–409. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-5026>
- 20 Ebisudani T, Hamamoto J, Togasaki K, Mitsuiishi A, Sugihara K, Shinozaki T, et al. Genotype-phenotype mapping of a patient-derived lung cancer organoid biobank identifies NKX2-1-defined Wnt dependency in lung adenocarcinoma. *Cell Rep*. 2023;42(3):112212. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112212>
- 21 Acosta-Plasencia M, Castellano JJ, Taylor AM, He Y, Martinez D, Monzo M, et al. Patient-derived organoids as a stem cell model to study lung cancer. Cham: Springer International Publishing; p. 1–28.
- 22 Canals J, Navarro A, Vila C, Canals JM, Díaz T, Acosta-Plasencia M, et al. Human embryonic mesenchymal lung-conditioned medium promotes differentiation to myofibroblast and loss of stemness phenotype in lung adenocarcinoma cell lines. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022;41(1):37. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02206-z>
- 23 Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(31):12771–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906850106>
- 24 Rock JR, Gao X, Xue Y, Randell SH, Kong Y-Y, Hogan BL. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011;8(6):639–48. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.04.003>
- 25 Barkauskas CE, Cbron MJ, Rackley CR, Bowie EJ, Keene DR, Stripp BR, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest*. 2013;123(7):3025–36. <https://doi.org/10.1172/JCI68782>
- 26 Rabata A, Fedr R, Soucek K, Hampl A, Kolesova Z. 3D cell culture models demonstrate a role for FGF and WNT signaling in regulation of lung epithelial cell fate and morphogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:574. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00574>
- 27 Yang W, Li Y, Shi F, Liu H. Human lung organoid: models for respiratory biology and diseases. *Dev Biol*. 2023;494:26–34. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2022.12.001>
- 28 Sutherland KD, Berns A. Cell of origin of lung cancer. *Mol Oncol*. 2010;4(5):397–403. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.05.002>
- 29 Magro-Lopez E, Palmer C, Manso J, Liste I, Zambrano A. Effects of lung and airway epithelial maturation cocktail on the structure of lung bud organoids. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9:186–6. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0943-9>
- 30 Hoffmann K, Obermayer B, Hönzke K, Fattykhova D, Demir Z, Löwa A, et al. Human alveolar progenitors generate dual lineage bronchioalveolar organoids. *Commun Biol*. 2022;5(1):875. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03828-5>
- 31 Shi C, Lv T, Xiang Z, Sun Z, Qian W, Han X. Role of wnt/ β -catenin signaling in epithelial differentiation of lung resident mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2015;116(8):1532–9. <https://doi.org/10.1002/jcb.25069>

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Durante la etapa pseudoglandular del desarrollo pulmonar humano, el pulmón está conformado por túbulos epiteliales en constante ramificación y rodeados por mesénquima. La interacción bidireccional entre el epitelio y el mesénquima es fundamental para la formación del árbol bronquial y la diferenciación celular, ya que define el patrón básico del sistema respiratorio (23). Este proceso se regula a través de una red de factores de crecimiento, vías de señalización y reguladores transcripcionales. Dada la importancia de estos mecanismos y la limitada información disponible en muestras humanas, la presente tesis se enfocó en analizar el perfil génico y de miARNs durante la etapa pseudoglandular del pulmón humano, con el objetivo de identificar reguladores moleculares involucrados en la ramificación y diferenciación celular.

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de la expresión génica en muestras de pulmón humano, que incluyeron tejidos embrionarios de 8-9 y 12 pcw, así como tejidos adultos. El análisis jerárquico de agrupamiento reveló una clara separación entre los tejidos adultos y los embrionarios. Además, dentro de las muestras embrionarias, se identificaron dos grupos bien definidos: uno correspondiente a las etapas tempranas de la fase pseudoglandular (8-9 pcw) y otro a las etapas más tardías (12 pcw). Estas diferencias significativas en los perfiles transcripcionales fueron validadas mediante un análisis de componentes principales (PCA, del inglés *principal component analysis*), confirmando la presencia de cambios moleculares clave entre estos puntos del desarrollo pulmonar. Como resultado, se identificó una firma de ARNm compuesta por 88 DEG, de los cuales 52 mostraron interacciones conocidas entre sí. Esto permitió agruparlos en dos redes principales conectadas a través de MYC, un factor de transcripción central. Los genes de la familia MYC, incluyendo *C-MYC*, *N-MYC* y *L-MYC*, son conocidos por su expresión en diversos tejidos durante el desarrollo embrionario y por regular la expresión de genes involucrados este proceso, como la proliferación, el crecimiento celular y el metabolismo (251). En estudios con ratones, se ha demostrado que *N-MYC* es fundamental para mantener las poblaciones de células progenitoras no diferenciadas en el pulmón en desarrollo. Este gen actúa como un regulador clave que interactúa con otros genes y permite la formación correcta de las estructuras ramificadas del árbol respiratorio durante la etapa pseudoglandular (252, 253).

Para obtener más información sobre las vías reguladas por estos genes y las funciones que desempeñan en la etapa pseudoglandular, se realizó un análisis de ontología génica (GO, del inglés *gene ontology*) que permitió agruparlos en diversas categorías. Los clústeres más enriquecidos y, por tanto, los de mayor relevancia biológica en este estadio del desarrollo pulmonar, fueron los relacionados con el transporte de iones y aniones (GO:0006811 y GO:0006820). Entre estos genes destacan aquellos que codifican proteínas de membrana celular, como *ATP11A* (del inglés, *ATPase phospholipid transporting 11A*), *MLC1* (del inglés, *megalencephalic Leukoencephalopathy with Subcortical Cysts 1*) y *ABCA10* (del inglés, *ATP Binding Cassette Subfamily A Member 10*). El transporte de iones y aniones es especialmente importante durante la etapa pseudoglandular, ya que en esta fase el epitelio de los bronquiolos terminales adopta una forma cúbica compuesta por células progenitoras distales. Estas células, que posteriormente darán lugar a los AT2, secretan el líquido pulmonar fetal, esencial para el desarrollo adecuado de las estructuras pulmonares y la preparación para la respiración postnatal (34). Para producir este líquido, es necesario mantener un control preciso de la presión osmótica y el volumen de líquidos, procesos en los que el transporte de iones y aniones juega un papel fundamental. Además, el transporte de iones y aniones también es crucial para la interacción epitelio-mesénquima, ya que regula las vías de señalización dependientes de iones, como las de calcio, que son esenciales para la correcta comunicación entre ambos tejidos durante el desarrollo pulmonar (254). Otra categoría importante, y directamente vinculada con esta tesis, es la del desarrollo celular (GO:0048468). Este término incluye genes clave para el crecimiento y diferenciación de las células que conforman el tejido pulmonar durante la etapa pseudoglandular. Entre ellos, destaca *ETV5* (del inglés *ETS variant transcription factor 5*), que en colaboración con *SOX9*, regula la diferenciación de las células progenitoras distales hacia los futuros AT2 (255),

A continuación, se decidió analizar si existían grupos de genes con patrones de expresión común durante la transición de la semana 8 a la 12 y se consideró también la expresión en el adulto. El análisis bioinformático agrupó a los genes diferencialmente expresados en 4 patrones de expresión: 1) genes cuya expresión incrementaba de la semana 8 a la 12 pero descendía en el adulto (cluster 1); 2) genes cuya expresión se reducía de la semana 8 a la 12 y aún más en el adulto (cluster 2); 3) genes cuya expresión incrementaba de la semana 8 a la 12 y aún más en el adulto (cluster 3); y finalmente aquellos cuya expresión se reducía de la semana 8 a la 12, pero que en el adulto se

incrementaba de nuevo (cluster 4). De esta manera, se obtuvieron cuatro clústeres de genes con patrones distintivos de expresión, lo que reflejaba cambios clave en la regulación genética durante la transición de la etapa pseudoglandular del desarrollo embrionario a la maduración del pulmón. En cada clúster, se seleccionaron uno o dos genes en base en su relevancia biológica y su interacción potencial con la firma de miARNs identificados, que se discutirá más adelante. Entre estos genes, se encontraban *ETV5* en el clúster 1, *HAND2* (del inglés, *heart and neural crest derivatives expressed 2*) en el clúster 2, *PRDM1* (de inglés, PR domain zinc finger protein 1) y *CD44* (del inglés, *cluster of differentiation 56*) en el clúster 3, y *R-SPONDIN 3* e *IGFBP3* en el clúster 4. Para confirmar las tendencias de expresión observadas, se evaluaron los niveles de mRNA de estos genes en un conjunto ampliado de muestras embrionarias, que incluyeron etapas desde las 7-8 pcw hasta las 12 pcw, abarcando puntos intermedios en las semanas 9, 10, 11. Se observó un aumento de la expresión de *ETV5* a lo largo de estas etapas del desarrollo, lo que coincide con su función previamente descrita como promotor de la diferenciación en la población de células de las áreas distales del pulmón (255). Por otra parte, la expresión de *HAND2* disminuía durante la etapa pseudoglandular, lo que podría explicarse por su papel en la proliferación de las células mesenquimales. En el estadio pseudoglandular, el mesénquima está predominantemente en una fase proliferativa, en lugar de diferenciación, contribuyendo con células a la expansión del tejido (256). En cuanto a los genes *PRDM1* y *CD44*, se observa el incremento de la expresión de ambos genes, lo cual podría deberse a que ambos tendrían un papel en la diferenciación de la población de células progenitoras distales. Se sabe que *PRDM1* suprime la expresión de *SOX2* en ESCs, promoviendo así la diferenciación hacia la línea germinal (257). En la etapa pseudoglandular del desarrollo pulmonar, donde *SOX2* se pierde en las regiones distales del árbol bronquial, *PRDM1* podría estar inhibiendo a *SOX2* para favorecer la diferenciación celular en estas áreas. Por otro lado, *CD44*, que también se ha asociado con células epiteliales en las *tips* del árbol bronquial (258), podría desempeñar un papel en la regulación de la diferenciación de estas células epiteliales, contribuyendo al desarrollo adecuado del pulmón en esta fase. Por otro lado, la expresión de *R-SPONDIN 3* se redujo a lo largo de las semanas, lo que podría explicarse por su papel en la angiogénesis. Este proceso es crucial al inicio de la etapa pseudoglandular para la formación inicial del endotelio y la vasculatura pulmonar. A medida que estas estructuras se establecen, la necesidad de *RSPO3* podría reducirse, permitiendo que otros factores tomen el control en la regulación del desarrollo vascular en fases posteriores (259).

Finalmente, se decidió enfocar la tesis en explorar la función de *IGFBP3* en la etapa pseudoglandular, ya que este gen codifica una proteína soluble que se ha detectado en el líquido amniótico en estudios previos (260). Partiendo de esta información, se hipotetizó inicialmente que la proteína IGFBP-3 podría ser secretada por el epitelio al lumen, desempeñando una función aún no descrita en la comunicación entre las regiones distales y proximales del árbol bronquial en desarrollo.

Inicialmente, al observar que la expresión génica de *IGFBP3* disminuía a medida que avanzaba la etapa pseudoglandular, se decidió analizar su expresión proteica mediante inmunofluorescencia en cortes histológicos de pulmón correspondientes a diferentes puntos de este estadio. Los resultados mostraron que la expresión proteica de IGFBP-3 se localizaba en el epitelio pulmonar, pero, por el contrario, al analizar los niveles de ARNm en el epitelio y el mesénquima, se observó que su ARNm era igual de abundante en ambos compartimentos celulares, lo que indicaba que el ARNm no se traducía a proteína en el mesénquima. Esto podría deberse a la presencia de un mecanismo de regulación postranscripcional que regularía negativamente la traducción a proteína en el mesénquima de IGFBP-3. Simultáneamente con el análisis de ARNm, se realizó un perfil de miARNs que permitió identificar 10 miARNs diferencialmente expresados entre las etapas temprana y tardía de la fase pseudoglandular. Con estos datos, se analizaron los posibles miARNs reguladores de *IGFBP3*, identificando a miR-34a como un candidato relevante. Una vez identificado, se evaluó la expresión de miR-34a en las muestras de pulmones embrionarios de las distintas semanas de la etapa pseudoglandular. Los resultados mostraron un incremento progresivo en su expresión a lo largo de esta etapa, acompañado de una correlación negativa con la expresión de *IGFBP3*, la cual disminuía en el mismo periodo. Asimismo, se observó que miR-34a tenía una expresión significativamente mayor en células mesenquimales en comparación con las células epiteliales, y al silenciar miR-34a en células mesenquimales embrionarias, resultó en un aumento de la expresión de la proteína IGFBP-3. Todos estos datos indican que miR-34a estaría no solo regulando negativamente la expresión de *IGFBP3* en el mesénquima, sino que también contribuye al control general de sus niveles a lo largo de la etapa pseudoglandular.

Al analizar las vías KEGG (del inglés, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) enriquecidas en la firma de miARNs, se identificó una relación directa entre la interacción de miR-34a con *IGFBP3* y la “vía de señalización de p53”. Esta vía desempeña un papel

central en la regulación del ciclo celular, la reparación del ADN y la inducción de apoptosis, procesos esenciales para preservar la homeostasis celular y prevenir anomalías durante el desarrollo. En la introducción de la presente tesis, se describió que miR-34a es regulado directamente por p53 a nivel transcripcional, colaborando en la inducción de la apoptosis y senescencia celular. Estudios previos han señalado que niveles elevados de *IGFBP3* favorecen la entrada de las células en un estado de senescencia, deteniendo el ciclo celular y contribuyendo a la morfogénesis durante el desarrollo embrionario (261). En el contexto del estadio pseudoglandular del pulmón, la disminución de miR-34a y el incremento de IGFBP-3 en el epitelio podría reflejar un mecanismo por el cual IGFBP-3 promueve el mantenimiento de las células madre en un estado no diferenciado. Esto resultaría crucial para asegurar una proliferación controlada y evitar la diferenciación prematura, permitiendo así una expansión ordenada de las poblaciones celulares necesarias para la formación del tejido pulmonar. En base a esta reflexión, se decidió evaluar los niveles de expresión de *IGFBP3* en las *tips* del árbol bronquial en desarrollo, las cuales, como se explicó en la introducción, están enriquecidas en células progenitoras multipotentes. Tal como se había hipotetizado, las *tips* mostraron una mayor expresión de *IGFBP3* en comparación con las estructuras proximales. Por tanto, se decidió emplear un modelo *in vitro* caracterizado por generarse a partir de estas células progenitoras multipotentes, los organoides embrionarios derivados de *tips* pulmonares. En los organoides en un estado indiferenciado, los niveles proteicos de IGFBP-3 eran elevados; sin embargo, al inducir su diferenciación hacia estructuras bronquiales, IGFBP-3 disminuía drásticamente. Estos datos explican por qué la expresión de *IGFBP3* se reduce a lo largo de la etapa pseudoglandular, ya que al inicio del estadio existe una población de células progenitoras multipotentes que progresivamente se diferenciarán hacia células epiteliales especializadas, e *IGFBP3* parecería estar asociado principalmente con las células indiferenciadas. Analizando datos de sc-RNAseq *in silico* de organoides derivados de *tips* pulmonares diferenciados hacia organoides alveolares (258), pudimos corroborar esta pérdida de expresión al producirse el proceso de diferenciación alveolar. En los organoides no diferenciados, la expresión de *IGFBP3* era alta y localizada en las poblaciones celulares de las *tips*, pero después de la diferenciación hacia el linaje alveolar, los niveles de *IGFBP3* disminuían considerablemente y solo quedaban restringidos en una pequeña población de células no diferenciadas.

El siguiente paso, por tanto, fue averiguar cuál es el papel que desempeña el IGFBP-3 en las células progenitoras. Para ello, se inhibió la expresión de IGFBP-3 con un siARN en los organoides embrionarios derivados de *tips* pulmonares, provocando la diferenciación en 48 horas de estructuras organoideas parecidas a las alveolosferas. Este silenciamiento de *IGFBP3* provocó la disminución significativa en la expresión de genes característicos de células madre, *SOX2*, *OCT4*, *KLF4* (del inglés, *kruppel-like factor 4*), *NANOG* y *ALDH1A3* (del inglés, *aldehyde dehydrogenase 1 family member A3*). Se ha descrito que IGFBP-3 está involucrado en la regulación de diversos procesos biológicos. De forma dependiente de IGFs, se ha establecido que IGFBP-3 soluble regula la proliferación de células progenitoras neurales y de células madre de colon a través de su interacción con IGF-I. Sin embargo, cuando IGFBP-3 actúa de forma independiente de IGFs, su expresión influye en la diferenciación de estas células, en el caso del colon mediante su receptor TMEM 219 (262, 263). En esta tesis, mediante un modelo de explante pulmonar embrionario cultivado con péptido IGFBP-3, se confirmó el papel soluble de esta proteína en el mantenimiento de un fenotipo menos diferenciado. Los explantes pulmonares tratados con altas concentraciones de IGFBP-3 exhibieron un epitelio pseudoestratificado, característico de las etapas iniciales de la fase pseudoglandular. En contraste, los explantes control desarrollaron un epitelio cúbico, propio de una etapa más avanzada de este estadio (28). Aunque estos hallazgos respaldan que IGFBP-3 soluble desempeña un papel crucial en la preservación de la potencialidad de las células progenitoras pulmonares, deben ser considerados con cautela ya que por la dificultad en la obtención de muestras embrionarias humanas solo pudimos realizar una réplica de este experimento.

Es importante destacar que las funciones de *IGFBP3* pueden variar según el contexto celular en el que actúe. Por ejemplo, en el osteosarcoma, se ha observado que su localización intracelular es crucial para determinar su efecto funcional. Cuando IGFBP-3 se encuentra en el núcleo celular, está asociado con un fenotipo más diferenciado, lo que implica que las células adquieren características especializadas. En contraste, su presencia en el citoplasma se relaciona con la desdiferenciación, un proceso por el cual las células pierden sus propiedades especializadas y adoptan un estado más multipotente o menos diferenciado (264). De manera consistente con estas investigaciones, en los experimentos realizados en la presente tesis, se observó que las células epiteliales pulmonares de embriones y los organoides embrionarios derivados de las *tips*, la

expresión proteica de IGFBP-3 se localizaba predominantemente en el citoplasma. Esto sugiere que su localización citoplasmática en estas células pulmonares podría estar asociada con un estado menos especializado y más multipotente.

Al identificar indicios de pérdida de multipotencia, evidenciados por la disminución de marcadores característicos de células madre en los organoides transfectados con siARN *IGFBP3*, y también al observar que estos organoides presentaban características fenotípicas similares a las alveolosferas (organoides compuestos por células AT2 y AT1), se decidió analizar la expresión de genes específicos asociados a estos tipos de células. Los resultados mostraron un aumento en los niveles de expresión de todos los genes analizados, destacando un incremento significativo de *SFTPC* y *LAMP3*. Por un lado, *SFTPC* es un marcador exclusivo de las células AT2, mientras que *LAMP3* está estrechamente relacionado con la formación y transporte de cuerpos lamelares, una función clave de las AT2. Estos hallazgos confirman que el silenciamiento de *IGFBP3* induce una diferenciación hacia organoides formados por células con un perfil génico característico de AT2.

En estudios sobre otros contextos como la adipogénesis, se ha demostrado que IGFBP-3 endógeno inhibe la diferenciación de células pre-adipocíticas, mediante la activación señalización SMAD2/3 de TGF- β (218). En el pulmón embrionario humano, se ha observado que una interacción dinámica pero opuesta de la vía del TGF- β y del BMP induce la diferenciación alveolar (265). Por tanto, con el objetivo de investigar qué vías son las implicadas en la diferenciación mediada por *IGFBP3*, se decidió analizar los niveles de fosforilación de proteínas clave en las rutas de señalización de TGF- β y BMP. Tras el silenciamiento de *IGFBP3*, se observó una reducción en los niveles de p-SMAD2, lo que sugiere una disminución en la señalización de TGF- β , junto con un aumento en p-SMAD1, asociado a una activación positiva en la señalización de BMP. Por un lado, p-SMAD2 se ha descrito como un modulador clave de la expresión de genes relacionados con la autorrenovación de las células madre, como *SOX2*, *OCT4* y *NANOG*, lo que explicaría la disminución en los niveles de ARNm en los organoides con *IGFBP3* silenciado (266, 267). Por otro lado, p-SMAD1 está implicado en la promoción de activadores transcripcionales esenciales para la producción de *SFTPB*, *SFTPC* y *SFTPA* en modelos murinos, lo que justificaría su aumento en los organoides tras el silenciamiento de *IGFBP3* (268). Se confirmó entonces que la pérdida de *IGFBP3*

modula la comunicación entre las señales de TGF- β y BMP, reduciendo la vía de TGF- β y aumentando la de BMP, lo que culmina en la diferenciación alveolar.

Para evaluar la relevancia funcional de *IGFBP3* en el desarrollo pulmonar humano, la presente tesis se centró en el uso de organoides embrionarios derivados de *tips* pulmonares como modelo, obtenidos de pulmones de embriones de 12 pcw de gestación. Estas *tips* se caracterizan por contener progenitores multipotentes SOX9⁺, ID2⁺. En contrapartida a las *tips*, se ha observado una población de células progenitoras también en la parte más proximal del árbol bronquial, en las denominadas *stalks*. Estos progenitores proximales son SOX2⁺, SOX9⁻, y se localizan en el epitelio de las vías aéreas en desarrollo, y pueden diferenciarse en diversos tipos de células de las vías aéreas superiores (71). Por ello, sería relevante cultivar organoides derivados de estas estructuras proximales, de las *stalks*, para analizar los niveles de expresión de *IGFBP3* y, además, silenciar su expresión, observando si la diferenciación, este caso, ocurre hacia estructuras bronquiales. En esta línea, estudios de otros grupos han identificado en pulmones embrionarios humanos de 19 pcw una población de células basales TP63⁺, F3⁺ que expresaba IGFBP-3 (82). Este hallazgo sugiere que, aunque la expresión de IGFBP-3 disminuye con la ramificación del árbol bronquial, quedan células también en las áreas proximales con baja expresión de esta proteína. Estas células basales, como se ha descrito, son progenitoras ya que poseen la capacidad de auto-renovación y diferenciación, lo que concuerdan con su expresión de IGFBP-3.

Un enfoque interesante sería investigar si la expresión de miR-34a, que inhibe al ARNm de *IGFBP3* durante la etapa pseudoglandular, está relacionada con la diferenciación alveolar. Para ello, se podrían realizar experimentos funcionales sobreexpresando miR-34a en organoides de pulmón embrionario, analizando si esta manipulación induce la diferenciación hacia estructuras alveolares. Esto permitiría determinar si los efectos observados al inhibir directamente *IGFBP3* mediante siARN pueden replicarse a través de la regulación mediada por miR-34a. Asimismo, aunque aún se requieren estudios adicionales antes de considerar aplicaciones clínicas, la identificación de las dinámicas del IGFBP-3/miR-34a en el desarrollo del pulmón humano podrían abrir nuevas estrategias terapéuticas para tratar enfermedades pulmonares en neonatos. Por ejemplo, la hipoplasia pulmonar es una anomalía congénita del desarrollo pulmonar en la que los pulmones del feto no se desarrollan completamente, lo que provoca una reducción en el número y tamaño de los alveolos (269). La

comprensión de cómo el miR-34a regula la expresión de *IGFBP3* podría facilitar el desarrollo de terapias dirigidas que promuevan el crecimiento alveolar adecuado y mejoren la función pulmonar en neonatos con esta condición.

IGFBP3, por tanto, es un gen que juega un importante papel en el control de la pluripotencia de las células madre. Su expresión disminuye progresivamente a medida que las células epiteliales pulmonares se diferencian, facilitando así la especialización alveolar. Como se ha destacado a lo largo de esta tesis, *IGFBP3* puede expresarse en diversos contextos celulares, lo que indica su participación en múltiples procesos biológicos más allá del desarrollo embrionario. En el contexto del cáncer, la reactivación de programas genéticos embrionarios permite que las células tumorales adquieran propiedades típicas de células embrionarias que potencien su proliferación, invasión y plasticidad (270). En este sentido, se podría asociar a *IGFBP3* con otro tipo de células madre: las CSCs. En un estudio en el que se utilizó la línea celular A549 de cáncer de pulmón, que exhibe una expresión elevada de ALDH1 (del inglés, *Aldehyde dehydrogenase 1*) y CD133 (del inglés, *cluster of differentiation 133*), marcadores característicos de CSCs, se demostró que la neutralización de IGFBP-3 reducía el potencial de pluripotencia de estas células. Esta inhibición de IGFBP-3 condujo a una disminución de los niveles de ALDH1A1 (del inglés, *aldehyde dehydrogenase 1 family member A1*), ALDH1A3 y BIRC5 (del inglés *baculoviral IAP repeat-containing 5*). BIRC5, también conocido como survivina, es una proteína clave en la supervivencia y proliferación de las CSCs, ya que inhibe la activación de caspasas y promueve la resistencia celular. En el contexto del cáncer de pulmón, por tanto, BIRC5 regula la secreción de IGFBP-3, y su pérdida correlaciona con una disminución en los niveles de BIRC5, sugiriendo que IGFBP-3 juega un rol crucial en la regulación de la supervivencia y la pluripotencia de las CSCs (271).

Diversos estudios han mostrado que niveles bajos de IGFBP-3 en pacientes con CPCNP están asociados con un peor pronóstico y mayor agresividad tumoral (272). Sin embargo, el IGFBP-3 analizado ha sido el circulante en el plasma, el cual se une a los IGFs para regular su disponibilidad y actividad biológica. Una disminución en los niveles de IGFBP-3 puede resultar en un aumento de la actividad de los IGFs, lo cual fomenta la proliferación celular y la supervivencia, contribuyendo al crecimiento y la progresión del cáncer. Sin embargo, el comportamiento de IGFBP-3 en el citoplasma, y en concreto en las CSCs tendría efectos contrarios. En este contexto, una elevada expresión de *IGFBP3*

preservaría la capacidad de las CSCs de autorrenovarse, iniciar y mantener el tumor. Este fenómeno se ha observado en modelos de PDX de carcinoma de célula escamosa de esófago, donde IGFBP-3 favorece la progresión tumoral mediante la expresión elevada de CD44, que en el contexto del cáncer se asocia con la invasión, metástasis y resistencia a tratamientos. Además, la regulación elevada de IGFBP-3 era potenciada por la hipoxia del microambiente tumoral (273). Por ello, resulta crucial investigar cómo la inhibición de IGFBP-3 podría influir en la diferenciación de las CSCs, limitando su capacidad de migración, invasión y formación de metástasis. Para avanzar en esta línea de investigación, el uso de modelos preclínicos avanzados, como los organoides derivados de pacientes con cáncer de pulmón, se presenta como una herramienta clave para evaluar el impacto de la regulación de *IGFBP3* sobre el comportamiento de las CSCs. Por esta razón, en la presente tesis se planteó como uno de los objetivos generar y caracterizar este modelo, con el propósito de facilitar la translación de los resultados obtenidos en el estudio de la embriogénesis al cáncer de pulmón, ya que podría ser de utilidad clínica y terapéutica.

Los organoides derivados de células madre adultas están ganando popularidad frente a los cultivos celulares en 2D y los modelos PDX en ratones, debido a su capacidad para reproducir con fidelidad las características histológicas y moleculares del tejido del paciente (170). Esto los convierte en un modelo más representativo del entorno celular nativo, permitiendo el estudio detallado de procesos como el desarrollo y la progresión de enfermedades, incluido el cáncer, así como los mecanismos fundamentales de la biología celular en condiciones no patológicas. En el caso de los organoides pulmonares, aunque existen diversos protocolos para su establecimiento y cultivo, aún no hay un consenso sobre cuál es el medio de cultivo más adecuado para los LNOs, ni tampoco para los LCOs. Por esta razón, en la presente tesis se planteó inicialmente determinar las condiciones de cultivo más apropiadas, incluyendo los componentes del medio, para el crecimiento de organoides adultos normales y tumorales, con el fin de facilitar una mejor translación de los resultados embriológicos al estudio del cáncer. Para ello, se evaluaron tres de los medios más utilizados en la literatura para el cultivo de organoides pulmonares, específicamente para los LCO, identificados como PCM (179), LCM (189) y MBM (190). Estos medios difieren en la composición y concentración de factores de crecimiento y otras moléculas, los cuales activan o inhiben diferentes vías de señalización que regulan procesos celulares claves. A partir de esto, se hipotetizó que el uso de uno u

otro medio tendría repercusiones tanto en la morfología de los organoides obtenidos y en sus características moleculares, como en su capacidad de diferenciación. En esta línea, una primera prueba de concepto mostró que, dependiendo del medio empleado, se observaban diferencias morfológicas y estructurales en el cultivo en 2D de una línea celular de cáncer de pulmón bien caracterizada, la línea celular H23. Esta línea, vio afectada su viabilidad a lo largo de los pases con estos tres medios, quedando una subpoblación de células con cambios fenotípicos, incluyendo la aparición de prolongaciones celulares. Este fenómeno podría atribuirse a la acción de factores como FGF7, FGF10 y EGF, conocidos por su capacidad para inducir procesos como la ramificación celular (274), lo que resalta la influencia específica de los componentes del medio en el comportamiento de las células.

Al cultivar tanto los LNOs con los LCOs, se observó que el medio que ofrecía el mayor éxito en el establecimiento inicial de los organoides, además de generar organoides de mayor tamaño y viabilidad, era el PCM. Esto se debe a su composición enriquecida con factores como R-SPONDIN 1, que activa la vía de la señalización WNT/ β -catenina, y NOGGIN, un inhibidor de la vía BMP, ambos fundamentales para mantener el estado indiferenciado de las células madre y potenciar su capacidad de autorrenovación (275). En contraste, los medios menos enriquecidos, LCM y MBM, presentaron un éxito menor en términos de establecimiento inicial, además de un tamaño y viabilidad de los organoides significativamente inferior. Esto se debe a que estos medios fueron diseñados con una composición mínima de reactivos destinada a facilitar el cultivo de organoides sin comprometer la pureza del cultivo de los LCOs, entendiendo pureza como la baja presencia de LNOs en los cultivos de LCOs. A pesar de los beneficios observados con PCM, el cultivo de los LCOs sigue enfrentando limitaciones importantes. Aunque este medio mejora el rendimiento general, su coctel de factores de crecimiento es similar al empleado para cultivar organoides de cáncer de colon (276), lo que conlleva el mismo problema que presentan estos: el sobrecrecimiento de LNOs en cultivos derivados de tejido tumoral. Esto genera un desplazamiento de las diferentes poblaciones de LCOs, comprometiendo la pureza del cultivo y dificultando su uso en investigaciones preclínicas que requieran que los cultivos estén enriquecidos en LCOs.

El establecimiento de LCOs puros con PCM ha sido reportado en aproximadamente un 17% (186), por lo que es indispensable caracterizarlos antes de realizar cualquier estudio. Para ello, se han implementado diversos enfoques, como la evaluación de su

histomorfología, la detección marcadores proteicos tumorales y, el método más extendido, el análisis de los patrones mutacionales del tumor de origen para confirmar su conservación en los organoides generados. En la presente tesis, se observó que solo 2 de 6 LCOs (que eran de los que se disponían los datos) cultivados con PCM retuvieron las mutaciones detectadas en el tumor de origen, representando apenas un 33% del total. Para abordar esta limitación, se han propuesto estrategias que incluyen la incorporación de reactivos que favorezcan la supervivencia de las subpoblaciones mutadas. Por ejemplo, NUTLIN-3A, un conocido inhibidor de MDM2 (del inglés, *mouse double minute 2*), puede añadirse al medio para promover el crecimiento de células con mutaciones en TP53 (277). De manera similar, el inhibidor pan-ErbB es útil para contrarrestar mutaciones frecuentes en la vía ERBB (278). Sin embargo, la adición de reactivos dirigidos a vías mutadas plantea un desafío significativo: se tiende a excluir otras subpoblaciones tumorales. Dado que el tumor original se caracteriza por una heterogeneidad intrínseca, con células que presentan patrones mutacionales diversos (279), este enfoque podría limitar su representatividad. Si el objetivo es investigar fármacos dirigidos para ciertas mutaciones, la adición de estos reactivos sería relevante, pero no resultaría adecuada para estudios más amplios que requieran un entorno que refleje la diversidad del tumor original. En futuras investigaciones, será fundamental estudiar cómo las modificaciones en las concentraciones de los factores de crecimiento afectan los cultivos sin comprometer su viabilidad. También sería importante evaluar la incorporación de nuevos componentes que puedan inhibir de manera selectiva el crecimiento de los LNOs, sin impactar la población de LCOs.

En la presente tesis también se analizaron y compararon las características morfológicas de los organoides pulmonares generados al utilizar diferentes medios de cultivo, dado que no existían estudios previos que abordaran esta comparación conjunta. En el caso de los LNOs, se observó que el uso de PCM promovía, a lo largo de los pases, la diferenciación hacia broncosferas, ya que los organoides eran positivos en P63, marcador de células basales, y CC10, característico de células Club. En contraste, el medio LCM favoreció a aparición de alveolosferas, puesto que expresaban AQP5 y SFTP-C, marcadores de AT1 y AT2 respectivamente. Esto podría deberse a su composición, pues el LCM contiene dexametasona, que estimula la maduración alveolar (280), y EGF, que contribuye al incremento del tamaño de los organoides alveolares (281). Por otro lado, los LNOs cultivados con MBM no evidenciaron ningún tipo de

diferenciación, probablemente debido a que este medio solo incluye los componentes mínimos necesarios para permitir una organización celular en forma de organoides. Con estos hallazgos, es recomendable emplear PCM para estudios enfocados en las vías respiratorias proximales, ya que facilita el crecimiento de broncoesferas. Por el contrario, para investigaciones centradas en estructuras alveolares, el medio LCM resulta más adecuado por su capacidad de promover el desarrollo de alveolosferas. Tomando esto en consideración, para la translación de los resultados obtenidos en esta tesis sobre papel de *IGFBP3* en la diferenciación alveolar embrionaria, se considera que probablemente sea más adecuado utilizar el medio LCM, el cual favorece la diferenciación alveolar, en lugar del PCM, que promueve la diferenciación bronquial.

En cuanto a la morfología de los LCOs, se observó que los tres medios de cultivo evaluados dieron lugar a la formación de organoides con una estructura compacta y desorganizada, característica distintiva de los organoides derivados de tumores. Sin embargo, tanto PCM como LCM promovieron además la aparición de broncosferas y alveolosferas, lo que sugiere la posible presencia de células madre normales en los cultivos. En contraste, MBM fue el único medio que en LCOs no generó organoides con rasgos típicos de LNOs. Por ello, para estudios enfocados en obtener poblaciones enriquecidas y específicas de CSCs, como aquellos dirigidos a evaluar la eficacia a fármacos, es preferible utilizar MBM. Por otro lado, los medios PCM y LCM son más adecuados para investigaciones que busquen reflejar de manera más completa el microambiente tumoral, integrando tanto células tumorales como normales.

También, cabe destacar que durante la presente tesis se evidenció que la elección de medio de cultivo de organoides pulmonares también afecta significativamente el crecimiento de células mesenquimales. En investigaciones en las que se quiera realizar un co-cultivo de LNOs o LCOs con células mesenquimales, es recomendable utilizar el medio LCM, ya que se observó que estas células proliferaban en gran medida en el cultivo. Sin embargo, PCM al contener compuestos como R-SPONDIN 1 que activa la vía WNT/ β -catenina, inhibe este crecimiento (282), mientras que MBM no presenta los suficientes compuestos para favorecer el desarrollo de las células mesenquimales. Nuevamente, para la translación de los resultados relacionados con *IGFBP3*, en los que se observaron diferencias significativas entre el mesénquima y el epitelio, el cultivo con LCM podría permitir la incorporación del elemento mesenquimal al estudio, dado que este parece tener una relevancia particular en el contexto del gen de interés.

En conjunto, en la presente tesis se ha identificado una firma distintiva de ARNm y miARN que marca la transición en el desarrollo pulmonar humano entre las etapas pseudoglandulares temprana y tardía, destacando especialmente la interacción entre *IGFBP3* y miR-34a. Además, se demostró que *IGFBP3* es esencial para la multipotencialidad de las células madre embrionarias, siendo su pérdida un evento que facilita la diferenciación alveolar. El siguiente paso será estudiar su papel en el mantenimiento de las CSCs en el cáncer de pulmón, considerando la posibilidad de que su inhibición pudiera inducir la diferenciación de estas células y frenar el crecimiento tumoral, o incluso sensibilizarlas a terapias existentes. Para ello, se emplearán los organoides pulmonares derivados de pacientes como modelo *in vitro*.

En cuanto al cultivo de estos organoides, se recomienda el uso de PCM cuando se requiera una mayor heterogeneidad tumoral y una tasa de éxito más alta en el establecimiento de nuevas líneas de organoides. Por otra parte, se aconseja el uso de MBM para pruebas farmacológicas que requieran una elevada pureza de los LCOs. Para la traslación de los resultados obtenidos en el estudio embrionario al contexto de la carcinogénesis, el medio más adecuado sería el LCM, pues facilitará el análisis del papel de *IGFBP3* en la diferenciación alveolar, e incluso permitirá la incorporación del mesénquima para explorar su función en el control de este proceso.

La integración de los enfoques transcriptómicos y modelos de organoides en esta tesis mejora la comprensión del desarrollo pulmonar humano y sienta las bases para futuros estudios en el cáncer de pulmón, con el potencial de identificar nuevas dianas terapéuticas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Existen patrones de expresión génicos y de microARNs claramente diferenciados entre la etapa pseudoglandular temprana y tardía del desarrollo embrionario pulmonar humano, los cuales modulan los cambios morfológicos que se producen tanto en el epitelio como en el mesénquima durante esta etapa.
2. El gen *MYC* aparece como un elemento central en las redes de interacción génica identificadas, evidenciando su importancia durante el desarrollo pulmonar.
3. Los genes relacionados con el transporte de iones y aniones tienen un papel destacado durante este periodo, debido a su participación en la secreción del líquido pulmonar fetal, así como en la regulación de las interacciones epitelio-mesénquima.
4. *IGFBP3* desempeña un papel crucial en la etapa pseudoglandular del desarrollo pulmonar humano, siendo esencial para mantener la pluripotencialidad de las células madre embrionarias de pulmón y evitar la diferenciación prematura.
5. La regulación de *IGFBP3* por miR-34a es un mecanismo clave para controlar su expresión proteica en células epiteliales y mesenquimales, así como para regular sus niveles durante la transición entre las etapas pseudoglandulares temprana y tardía del desarrollo pulmonar.
6. Los organoides derivados de *tips* de pulmones embrionarios son modelos efectivos para estudiar los mecanismos molecular del desarrollo pulmonar humano y nos permiten modular *in vitro* diferentes vías de señalización para valorar sus consecuencias funcionales.
7. La disminución de *IGFBP3* favorece la diferenciación alveolar mediante la modulación de las vías de señalización TGF- β y BMP, destacando la importancia de estos procesos en el desarrollo pulmonar y la formación de estructuras alveolares.

CONCLUSIONES

8. La generación de organoides a partir de tejido tumoral y normal de pacientes quirúrgicos de cáncer de pulmón es viable y reproduce *in vitro* las características histológicas del tumor de origen.
9. La selección del medio de cultivo, y sobre todo de los factores de crecimiento utilizados, influye significativamente en el crecimiento y la diferenciación celular de los organoides derivados de pacientes con cáncer de pulmón, por lo que es crucial ajustarlo según los objetivos de la investigación y los tipos celulares de interés para el estudio
10. El medio de cultivo permisivo es el más adecuado para priorizar la eficiencia en la obtención de organoides e incrementar su viabilidad, siendo particularmente eficaz en investigaciones centradas en la heterogeneidad celular, mientras que por el contrario, el medio basal mínimo es el más efectivo para obtener poblaciones puras de organoides tumorales, sacrificando el crecimiento de organoides normales y reduciendo significativamente la eficiencia en el establecimiento de nuevos cultivos de organoides.
11. El medio de cultivo limitante favorece la diferenciación hacia alveolosferas, lo que lo convierte en una opción ideal para estudios centrados en las estructuras distales del árbol bronquial y, además, facilita el co-cultivo con células mesenquimales, siendo el medio más adecuado para la translación de los resultados obtenidos en la presente tesis al estudio de la carcinogénesis pulmonar.
12. El uso de organoides pulmonares humanos junto con modelos transcriptómicos permite una caracterización detallada tanto del desarrollo como de las patologías pulmonares. Estas herramientas resultan relevantes para futuras investigaciones en la medicina personalizada, abarcando desde afecciones neonatales hasta procesos de carcinogénesis.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Morrissey EE, Hogan BL. Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Developmental cell*. 2010;18(1):8-23.
2. Copland I, Post M. Lung development and fetal lung growth. *Paediatric respiratory reviews*. 2004;5:S259-S64.
3. Weibel ER. What makes a good lung? *Swiss medical weekly*. 2009;139(2728):375-86.
4. Fujii S, Muranaka T, Matsubayashi J, Yamada S, Yoneyama A, Takakuwa T. The bronchial tree of the human embryo: an analysis of variations in the bronchial segments. *Journal of Anatomy*. 2020;237(2):311-22.
5. Hochegger B, Langer FW, Irion K, Souza A, Moreira J, Baldisserotto M, et al. Pulmonary acinus: understanding the computed tomography findings from an acinar perspective. *Lung*. 2019;197:259-65.
6. Knudsen L, Ochs M. The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochemistry and cell biology*. 2018;150:661-76.
7. DiMaio M, Gil J, Ciurea D, Kattan M. Structural maturation of the human fetal lung: A morphometric study of the development of air-blood barriers. *Pediatric research*. 1989;26(2):88-93.
8. demello DE, Reid LM. Embryonic and early fetal development of human lung vasculature and its functional implications. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2000;3:439-49.
9. Frerking I, Günther A, Seeger W, Pison U. Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options. *Intensive care medicine*. 2001;27:1699-717.
10. Mullasery D, Smith NP, editors. Lung development. *Seminars in pediatric surgery*. 2015;24(4):152-5.
11. Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. The molecular basis of lung morphogenesis. *Mechanisms of development*. 2000;92(1):55-81.
12. Kaminsky DA. The Netter Collection of Medical Illustrations: Respiratory System, Volume 3: The Netter Collection of Medical Illustrations: Respiratory System, Volume 3-E-Book: Elsevier Health Sciences; 2024.

13. Nikolić MZ, Sun D, Rawlins EL. Human lung development: recent progress and new challenges. *Development*. 2018;145(16):dev163485.
14. Bush A. Lung development and aging. *Annals of the American Thoracic Society*. 2016;13(Supplement 5):S438-S46.
15. Schittny JC. Development of the lung. *Cell and tissue research*. 2017;367:427-44.
16. Burri PH. Fetal and postnatal development of the lung. *Annual review of physiology*. 1984;46:617-28.
17. Sahasrabudhe N, Gosney JR, Hasleton P. The normal lung: histology, embryology, development, aging and function. *Spencer's Pathology of the Lung*. 2013:1-10.
18. Pohunek P. Development, structure and function of the upper airways. *Paediatric respiratory reviews*. 2004;5(1):2-8.
19. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *Embriología clínica*: Elsevier; 2020.
20. Warburton D. Overview of lung development in the newborn human. *Neonatology*. 2017;111(4):398-401.
21. Joshi S, Kotecha S. Lung growth and development. *Early human development*. 2007;83(12):789-94.
22. Allen-Hyttinen J, Yung H, Nikolić MZ. Lung development. *Lung Stem Cells in Development, Health and Disease (ERS Monograph)* Sheffield, European Respiratory Society. 2021:1-16.
23. Masters JR. Epithelial-mesenchymal interaction during lung development: the effect of mesenchymal mass. *Developmental biology*. 1976;51(1):98-108.
24. Hislop AA. Airway and blood vessel interaction during lung development. *Journal of anatomy*. 2002;201(4):325-34.
25. Djonov V, Burri P. Vascular development: vasculogenesis and angiogenesis. *Microvascular research: biology and pathology* Elsevier, Philadelphia. 2006:91-6.
26. DeRuiter M, Gittenberger-de Groot A, Wenink A, Poelmann R, Mentink M. In normal development pulmonary veins are connected to the sinus venosus segment in the left atrium. *The Anatomical Record*. 1995;243(1):84-92.

27. Wu S, Savani RC. Molecular bases for lung development, injury, and repair. *The Newborn Lung*; Elsevier; 2019. p 3-29.
28. Ernst LM, Ruchelli ED, Carreon CK, Huff DS. *Color atlas of human fetal and neonatal histology*; Springer Nature; 2019.
29. Kitagawa M, Hislop A, Boyden E, Reid L. Lung hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia: a quantitative study of airway, artery, and alveolar development. *Journal of British Surgery*. 1971;58(5):342-6.
30. Nagajyothi D, Pandurangam G, Kshitija K, Saritha S. Histogenesis Research of Lung in Human Foetuses In Different Weeks of Gestation A Light Microscopic Study. *Int J Acad Med Pharm*. 2022;4(5):690-5.
31. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(31):12771-5.
32. Whitsett JA. Airway epithelial differentiation and mucociliary clearance. *Annals of the American thoracic society*. 2018;15(Supplement 3):S143-S8.
33. Bingle L, Bull TB, Fox B, Guz A, Richards RJ, Tetley TD. Type II pneumocytes in mixed cell culture of human lung: a light and electron microscopic study. *Environmental Health Perspectives*. 1990;85:71-80.
34. Strang L. Fetal lung liquid: secretion and reabsorption. *Physiological reviews*. 1991;71(4):991-1016.
35. Maeda S, Suzuki S, Suzuki T, Endo M, Moriya T, Chida M, et al. Analysis of intrapulmonary vessels and epithelial-endothelial interactions in the human developing lung. *Laboratory investigation*. 2002;82(3):293-301.
36. Schittny JC, Miserocchi G, Sparrow MP. Spontaneous peristaltic airway contractions propel lung liquid through the bronchial tree of intact and fetal lung explants. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2000;23(1):11-8.
37. Merkus P, Have-Opbroek At, Quanjer P. Human lung growth: a review. *Pediatric pulmonology*. 1996;21(6):383-97.
38. Bertrand P, Sánchez I. *Pediatric Respiratory Diseases*. Santiago de Chile: Springer. 2016.

39. Schittny JC, Burri PH. Morphogenesis of the mammalian lung: aspects of structure and extracellular matrix. *Lung development and regeneration*. 2004;275:316.
40. Vila Ellis L, Chen J. A cell-centric view of lung alveologenesis. *Developmental Dynamics*. 2021;250(4):482-96.
41. Matalon S. Mechanisms and regulation of ion transport in adult mammalian alveolar type II pneumocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1991;261(5):C727-C38.
42. Smith LJ, McKay KO, van Asperen PP, Selvadurai H, Fitzgerald DA. Normal development of the lung and premature birth. *Paediatric respiratory reviews*. 2010;11(3):135-42.
43. Woods JC, Schittny JC. Lung structure at preterm and term birth. *Fetal lung development-clinical correlates & future technologies* Cambridge University Press, New York. 2016:126-40.
44. Bucher U, Reid L. Development of the intrasegmental bronchial tree: the pattern of branching and development of cartilage at various stages of intra-uterine life. *Thorax*. 1961;16(3):207.
45. Bartels H. The air-blood barrier in the human lung: a freeze-fracture study. *Cell and tissue research*. 1979;198:269-85.
46. Allen MC, Donohue PK, Dusman AE. The limit of viability--neonatal outcome of infants born at 22 to 25 weeks' gestation. *New England Journal of Medicine*. 1993;329(22):1597-601.
47. Hislop A, Reid L. Development of the acinus in the human lung. *Thorax*. 1974;29(1):90-4.
48. Rippa AL, Alpeeva EV, Vasiliev AV, Vorotelyak EA. Alveologenesis: what governs secondary septa formation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(22):12107-39.
49. Scheuermann DW, Van Meir F, Adriaensen D, Timmermans J-P, De Groodt-Lasseel MH. Development of alveolar septa and formation of alveolar pores during the early postnatal period in the rat lung. *Cells Tissues Organs*. 1988;131(3):249-61.
50. Weaver TE, Na C-L, Stahlman M, editors. Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Seminars in cell & developmental biology*. 2002;13(4):263-70.
51. Liggins G. The role of cortisol in preparing the fetus for birth. *Reproduction, Fertility and Development*. 1994;6(2):141-50.

52. Jobe AH, Ikegami M. Lung development and function in preterm infants in the surfactant treatment era. *Annual review of physiology*. 2000;62(1):825-46.
53. Hall SM, Hislop AA, Pierce CM, Haworth SG. Prenatal origins of human intrapulmonary arteries: formation and smooth muscle maturation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2000;23(2):194-203.
54. Rößler G, Labode J, Schipke J, Tschanz SA, Mühlfeld C. Three-dimensional characteristics of the alveolar capillary network in infant and adult human lungs. *Pediatric Research*. 2024;1-9.
55. Hislop AA, Wigglesworth JS, Desai R. Alveolar development in the human fetus and infant. *Early human development*. 1986;13(1):1-11.
56. Hislop A, Reid L. Pulmonary arterial development during childhood: branching pattern and structure. *Thorax*. 1973;28(2):129-35.
57. Thurlbeck WM. Postnatal human lung growth. *Thorax*. 1982;37(8):564-71.
58. Narayanan M, Owers-Bradley J, Beardsmore CS, Mada M, Ball I, Garipov R, et al. Alveolarization continues during childhood and adolescence: new evidence from helium-3 magnetic resonance. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;185(2):186-91.
59. McCulley D, Wienhold M, Sun X. The pulmonary mesenchyme directs lung development. *Current opinion in genetics & development*. 2015;32:98-105.
60. Lazzaro D, Price M, Felice MD, Lauro RD. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development*. 1991;113(4):1093-104.
61. Li Y, Eggermont K, Vanslembrouck V, Verfaillie CM. NKX2-1 activation by SMAD2 signaling after definitive endoderm differentiation in human embryonic stem cell. *Stem Cells and Development*. 2013;22(9):1433-42.
62. Gontan C, de Munck A, Vermeij M, Grosveld F, Tibboel D, Rottier R. Sox2 is important for two crucial processes in lung development: branching morphogenesis and epithelial cell differentiation. *Developmental biology*. 2008;317(1):296-309.
63. Que J, Choi M, Ziel JW, Klingensmith J, Hogan BL. Morphogenesis of the trachea and esophagus: current players and new roles for noggin and Bmps. *Differentiation*. 2006;74(7):422-37.

64. Eenjes E, Tibboel D, Wijnen RM, Rottier RJ. Lung epithelium development and airway regeneration. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2022;10:1022457.
65. Danopoulos S, Thornton ME, Grubbs BH, Frey MR, Warburton D, Bellusci S, et al. Discordant roles for FGF ligands in lung branching morphogenesis between human and mouse. *The Journal of pathology*. 2019;247(2):254-65.
66. Walker DJ, Land SC. Regulation of vascular signalling by nuclear Sprouty2 in fetal lung epithelial cells: Implications for co-ordinated airway and vascular branching in lung development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2018;224:105-14.
67. Desai TJ, Malpel S, Flentke GR, Smith SM, Cardoso WV. Retinoic acid selectively regulates Fgf10 expression and maintains cell identity in the prospective lung field of the developing foregut. *Developmental biology*. 2004;273(2):402-15.
68. Rajagopal J, Carroll TJ, Guseh JS, Bores SA, Blank LJ, Anderson WJ, et al. Wnt7b stimulates embryonic lung growth by coordinately increasing the replication of epithelium and mesenchyme. 2008;135(9):1625-34.
69. Aros CJ, Pantoja CJ, Gomperts BN. Wnt signaling in lung development, regeneration, and disease progression. *Communications biology*. 2021;4(1):601-614.
70. Swarr DT, Wert SE, Whitsett JA. Molecular Determinants of Lung Morphogenesis. *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children*: Elsevier; 2019. p. 26-39. e4.
71. Nikolić MZ, Caritg O, Jeng Q, Johnson J-A, Sun D, Howell KJ, et al. Human embryonic lung epithelial tips are multipotent progenitors that can be expanded in vitro as long-term self-renewing organoids. *elife*. 2017;6:e26575-608.
72. Kosaki R, Gebbia M, Kosaki K, Lewin M, Bowers P, Towbin JA, et al. Left-right axis malformations associated with mutations in ACVR2B, the gene for human activin receptor type IIB. *American journal of medical genetics*. 1999;82(1):70-6.
73. Zhang M, Wang H, Teng H, Shi J, Zhang Y. Expression of SHH signaling pathway components in the developing human lung. *Histochemistry and cell biology*. 2010;134:327-35.
74. Groenman F, Unger S, Post M. The molecular basis for abnormal human lung development. *Neonatology*. 2005;87(3):164-77.

75. Meno C, Shimono A, Saijoh Y, Yashiro K, Mochida K, Ohishi S, et al. *lefty-1* is required for left-right determination as a regulator of *lefty-2* and *nodal*. *Cell*. 1998;94(3):287-97.
76. Brown KR, England KM, Goss KL, Snyder JM, Acarregui MJ. VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung in vitro. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2001;281(4):L1001-L10.
77. Syed MA, Choo-Wing R, Homer RJ, Bhandari V. Role of nitric oxide isoforms in vascular and alveolar development and lung injury in vascular endothelial growth factor overexpressing neonatal mice lungs. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147588-607.
78. Rajatapiti P, De Rooij JD, Beurskens LW, Keijzer R, Tibboel D, Rottier RJ, et al. Effect of oxygen on the expression of hypoxia-inducible factors in human fetal lung explants. *Neonatology*. 2010;97(4):346-54.
79. Herriges M, Morrissey EE. Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development*. 2014;141(3):502-13.
80. El Agha E, Bellusci S. Walking along the fibroblast growth factor 10 route: a key pathway to understand the control and regulation of epithelial and mesenchymal cell-lineage formation during lung development and repair after injury. *Scientifica*. 2014;2014(1):538379.
81. Dash B, Kim E, Sun X. Neuroendocrine cells in lung development and disease. *Lung Stem Cells in Development, Health and Disease (ERS Monograph)* Sheffield, European Respiratory Society. 2021:44-55.
82. He P, Lim K, Sun D, Pett JP, Jeng Q, Polanski K, et al. A human fetal lung cell atlas uncovers proximal-distal gradients of differentiation and key regulators of epithelial fates. *Cell*. 2022;185(25):4841-60. e25.
83. Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, et al. The role of *Scgb1a1*⁺ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell stem cell*. 2009;4(6):525-34.
84. Rawlins EL, Clark CP, Xue Y, Hogan BL. The *Id2*⁺ distal tip lung epithelium contains individual multipotent embryonic progenitor cells. *Development*. 2009;136(22):3741-5.
85. Orgeig S, Daniels CB, Sullivan LC. Development of the pulmonary surfactant system. *The Lung*: Elsevier; 2004. p. 149-67.

86. Serrano AG, Pérez-Gil J. Protein–lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system. *Chemistry and physics of lipids*. 2006;141(1-2):105-18.
87. Possmayer F, Yu S-H, Weber JM, Harding PG. Pulmonary surfactant. *Canadian journal of biochemistry and cell biology*. 1984;62(11):1121-33.
88. Giordano G, Campanini N, Varotti E. Immunohistochemical expression of Napsin A in normal human fetal lungs at different gestational ages and in acquired and congenital pathological pulmonary conditions. *Virchows Archiv*. 2020;477(4):557-63.
89. Jimenez FR, Lewis JB, Belgique ST, Wood TT, Reynolds PR. Developmental lung expression and transcriptional regulation of claudin-6 by TTF-1, Gata-6, and FoxA2. *Respiratory research*. 2014;15:1-10.
90. Mendelson CR. Role of transcription factors in fetal lung development and surfactant protein gene expression. *Annual review of physiology*. 2000;62(1):875-915.
91. Kim CFB, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*. 2005;121(6):823-35.
92. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(3):209-49.
93. Bade BC, Cruz CSD. Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine*. 2020;41(1):1-24.
94. Leiter A, Veluswamy RR, Wisnivesky JP. The global burden of lung cancer: current status and future trends. *Nature reviews Clinical oncology*. 2023;20(9):624-39.
95. Huang J, Deng Y, Tin MS, Lok V, Ngai CH, Zhang L, et al. Distribution, risk factors, and temporal trends for lung cancer incidence and mortality: a global analysis. *Chest*. 2022;161(4):1101-11.
96. Doll R, Ruparel M. Smoking and lung cancer. *Men's Health 4e*: CRC Press; 2021. p. 73-80.
97. Yousuf H, Hofstra M, Tijssen J, Leenen B, Lindemans JW, van Rossum A, et al. Estimated worldwide mortality attributed to secondhand tobacco smoke exposure, 1990-2016. *JAMA network open*. 2020;3(3):e201177-e201177.

98. Soleimani F, Dobaradaran S, De-la-Torre GE, Schmidt TC, Saeedi R. Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: A comprehensive systematic review. *Science of the Total Environment*. 2022;813:152667.
99. Zhai C, Hu D, Yu G, Hu W, Zong Q, Yan Z, et al. Global, regional, and national deaths, disability-adjusted life years, years lived with disability, and years of life lost for the global disease burden attributable to second-hand smoke, 1990–2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Science of The Total Environment*. 2023;862:160677.
100. Riudavets M, Garcia de Herreros M, Besse B, Mezquita L. Radon and lung cancer: current trends and future perspectives. *Cancers*. 2022;14(13):3142.
101. Thandra KC, Barsouk A, Saginala K, Aluru JS, Barsouk A. Epidemiology of lung cancer. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*. 2021;25(1):45-52.
102. Khajuria O, Sharma N. Epigenetic targeting for lung cancer treatment via CRISPR/Cas9 technology. *Advances in Cancer Biology-Metastasis*. 2021;3:100012.
103. Durham A, Adcock I. The relationship between COPD and lung cancer. *Lung cancer*. 2015;90(2):121-7.
104. Sigel K, Wisnivesky J, Gordon K, Dubrow R, Justice A, Brown ST, et al. HIV as an independent risk factor for incident lung cancer. *Aids*. 2012;26(8):1017-25.
105. Riaz SP, Lüchtenborg M, Coupland VH, Spicer J, Peake MD, Møller H. Trends in incidence of small cell lung cancer and all lung cancer. *Lung cancer*. 2012;75(3):280-4.
106. Tarver T. Cancer facts & figures 2012. American cancer society (ACS) Atlanta, GA: American Cancer Society; 2012. p. 366-367.
107. Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J. Small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*. 2021;7(1):3.
108. Hou J-M, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(5):525-32.
109. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *Journal of thoracic oncology*. 2015;10(9):1243-60.

110. Raso MG, Bota-Rabassedas N, Wistuba II. Pathology and classification of SCLC. *Cancers*. 2021;13(4):820.
111. Karam I, Jiang SY, Khaira M, Lee CW, Schellenberg D. Outcomes of small cell lung cancer patients treated with cisplatin-etoposide versus carboplatin-etoposide. *American journal of clinical oncology*. 2015;38(1):51-4.
112. Horn L, Mansfield AS, Szczesna A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ, et al. First-line atezolizumab plus chemotherapy in extensive-stage small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(23):2220-9.
113. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S, et al. Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *Journal of thoracic oncology*. 2019;14(3):377-407.
114. Zheng M. Classification and pathology of lung cancer. *Surgical Oncology Clinics*. 2016;25(3):447-68.
115. Sucony L, Rassl D, Barker A, McCaughan F, Rintoul R. Adenocarcinoma spectrum lesions of the lung: Detection, pathology and treatment strategies. *Cancer treatment reviews*. 2021;99:102237.
116. Barrionuevo Cornejo C, Dueñas Hanco D. Current classification of lung carcinoma. Histological, immunophenotypic, molecular and clinical considerations.
117. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. The 2021 WHO classification of lung tumors: impact of advances since 2015. *Journal of Thoracic Oncology*. 2022;17(3):362-87.
118. Fukui T, Taniguchi T, Kawaguchi K, Fukumoto K, Nakamura S, Sakao Y, et al. Comparisons of the clinicopathological features and survival outcomes between lung cancer patients with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *General thoracic and cardiovascular surgery*. 2015;63:507-13.
119. Jiang X, Wu J, Wang J, Huang R. Tobacco and oral squamous cell carcinoma: A review of carcinogenic pathways. *Tobacco induced diseases*. 2019;17;29.
120. Galindo I, Gómez-Morales M, Díaz-Cano I, Andrades Á, Caba-Molina M, Miranda-León MT, et al. The value of desmosomal plaque-related markers to distinguish squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2020;125(1):19-29.

121. Park HJ, Cha Y-J, Kim SH, Kim A, Kim EY, Chang YS. Keratinization of lung squamous cell carcinoma is associated with poor clinical outcome. *Tuberculosis and respiratory diseases*. 2017;80(2):179-86.
122. Moro-Sibilot D, Lantuejoul S, Diab S, Moulai N, Aubert A, Timsit JF, et al. Lung carcinomas with a basaloid pattern: a study of 90 cases focusing on their poor prognosis. *European Respiratory Journal*. 2008;31(4):854-9.
123. Fernandez FG, Battafarano RJ, editors. Large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung: an aggressive neuroendocrine lung cancer. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery*. 2006;18(3):206-210.
124. Naalsund A, Rostad H, Strøm EH, Lund MB, Strand T-E. Carcinoid lung tumors—incidence, treatment and outcomes: a population-based study. *European journal of cardio-thoracic surgery*. 2011;39(4):565-9.
125. Pelosi G, Rodriguez J, Viale G, Rosai J. Typical and atypical pulmonary carcinoid tumor overdiagnosed as small-cell carcinoma on biopsy specimens: a major pitfall in the management of lung cancer patients. *The American journal of surgical pathology*. 2005;29(2):179-87.
126. Guo R, Tian Y, Zhang N, Huang H, Huang Y, Yang J. Use of dual-marker staining to differentiate between lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Journal of International Medical Research*. 2020;48(4):0300060519893867.
127. Jagirdar J. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of primary and metastatic carcinoma to the lung. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2008;132(3):384-96.
128. Nooreldeen R, Bach H. Current and future development in lung cancer diagnosis. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(16):8661.
129. Sharma D, Jindal G, editors. Identifying lung cancer using image processing techniques. *International Conference on Computational Techniques and Artificial Intelligence (ICCTAI)*; 2011. p. 872-880.
130. Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clinics in chest medicine*. 2011;32(4):669-92.
131. Lababede O, Meziane MA. The eighth edition of TNM staging of lung cancer: reference chart and diagrams. *The oncologist*. 2018;23(7):844-8.

132. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The eighth edition lung cancer stage classification. *Chest*. 2017;151(1):193-203.
133. Cortés ÁA, Urquizu LC, Cubero JH. Adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer: state-of-the-art. *Translational lung cancer research*. 2015;4(2):191.
134. Wu Y-L, Tsuboi M, He J, John T, Grohe C, Majem M, et al. Osimertinib in resected EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(18):1711-23.
135. Videtic GM, Donington J, Giuliani M, Heinzerling J, Karas TZ, Kelsey CR, et al. Stereotactic body radiation therapy for early-stage non-small cell lung cancer: Executive Summary of an ASTRO Evidence-Based Guideline. *Practical radiation oncology*. 2017;7(5):295-301.
136. Remon J, Soria J-C, Peters S. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer: an update of the ESMO Clinical Practice Guidelines focusing on diagnosis, staging, systemic and local therapy. *Annals of Oncology*. 2021;32(12):1637-42.
137. Postmus P, Kerr K, Oudkerk M, Senan S, Waller D, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*. 2017;28:iv1-iv21.
138. Spigel DR, Faivre-Finn C, Gray JE, Vicente D, Planchard D, Paz-Ares LG, et al. Five-year survival outcomes with durvalumab after chemoradiotherapy in unresectable stage III NSCLC: an update from the PACIFIC trial. *Wolters Kluwer Health*; 2021:8511-8511.
139. Majeed U, Manochakian R, Zhao Y, Lou Y. Targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer: current advances and future trends. *Journal of hematology & oncology*. 2021;14:1-20.
140. Hendriks L, Kerr K, Menis J, Mok T, Nestle U, Passaro A, et al. Non-oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up☆. *Annals of Oncology*. 2023;34(4):358-76.
141. Acosta-Plasencia M, Menauer P, Marrades RM, Navarro A. Potential of Patient-Derived Organoids and Other 3D Culture Models to Assess Immunotherapy Response in Cancer. *Handbook of Cancer and Immunology*: Springer; 2024. p. 1-29.
142. Forde PM, Spicer J, Lu S, Provencio M, Mitsudomi T, Awad MM, et al. Neoadjuvant nivolumab plus chemotherapy in resectable lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2022;386(21):1973-85.

143. Acosta-Plasencia M, Castellano JJ, Taylor AM, He Y, Martínez D, Monzo M, et al. Patient-derived organoids as a stem cell model to study lung cancer; 2022. p. 319-346.
144. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012;44(12):2144-51.
145. Sanchez-Danes A, Blanpain C. Deciphering the cells of origin of squamous cell carcinomas. *Nature Reviews Cancer*. 2018;18(9):549-61.
146. Park K-S, Liang M-C, Raiser DM, Zamponi R, Roach RR, Curtis SJ, et al. Characterization of the cell of origin for small cell lung cancer. *Cell cycle*. 2011;10(16):2806-15.
147. Sainz de Aja J, Dost A, Kim C. Alveolar progenitor cells and the origin of lung cancer. *Journal of internal medicine*. 2021;289(5):629-35.
148. Seguin L, Durandy M, Feral CC. Lung adenocarcinoma tumor origin: a guide for personalized medicine. *Cancers*. 2022;14(7):1759.
149. Wood SL, Pernemalm M, Crosbie PA, Whetton AD. Molecular histology of lung cancer: from targets to treatments. *Cancer treatment reviews*. 2015;41(4):361-75.
150. Klein G, Klein E. Oncogene activation and tumor progression. *Carcinogenesis*. 1984;5(4):429-35.
151. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(7):517-31.
152. Karachaliou N, Mayo C, Costa C, Magrí I, Gimenez-Capitan A, Molina-Vila MA, et al. KRAS mutations in lung cancer. *Clinical lung cancer*. 2013;14(3):205-14.
153. Skoulidis F, Li BT, Dy GK, Price TJ, Falchook GS, Wolf J, et al. Sotorasib for lung cancers with KRAS p. G12C mutation. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(25):2371-81.
154. da Cunha Santos G, Shepherd FA, Tsao MS. EGFR mutations and lung cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011;6(1):49-69.
155. Nan X, Xie C, Yu X, Liu J. EGFR TKI as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017;8(43):75712.
156. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell*. 2004;116(2):235-46.
157. Mogi A, Kuwano H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *BioMed Research International*. 2011;2011(1):583929.

158. Wistuba II, Berry J, Behrens C, Maitra A, Shivapurkar N, Milchgrub S, et al. Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer. *Clinical cancer research*. 2000;6(7):2604-10.
159. Gkoutakos A, Sartori G, Falcone I, Piro G, Ciuffreda L, Carbone C, et al. PTEN in lung cancer: dealing with the problem, building on new knowledge and turning the game around. *Cancers*. 2019;11(8):1141.
160. Jin G, Kim MJ, Jeon H-S, Choi JE, Kim DS, Lee EB, et al. PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung cancer*. 2010;69(3):279-83.
161. Harunaga JS, Doyle AD, Yamada KM. Local and global dynamics of the basement membrane during branching morphogenesis require protease activity and actomyosin contractility. *Developmental biology*. 2014;394(2):197-205.
162. Epaud R, Aubey F, Xu J, Chaker Z, Clemessy M, Dautin A, et al. Knockout of insulin-like growth factor-1 receptor impairs distal lung morphogenesis. *PloS one*. 2012;7(11):e48071.
163. Liu W, Cui Y, Zheng X, Yu K, Sun G. Application status and future prospects of the PDX model in lung cancer. *Frontiers in Oncology*. 2023;13:1098581.
164. Mak IW, Evaniew N, Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *American journal of translational research*. 2014;6(2):114.
165. Longmire TA, Ikonomidou L, Hawkins F, Christodoulou C, Cao Y, Jean JC, et al. Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells. *Cell stem cell*. 2012;10(4):398-411.
166. Gazdar AF, Girard L, Lockwood WW, Lam WL, Minna JD. Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010;102(17):1310-21.
167. Burkhanova U, Harris A, Leir S-H. Enhancement of airway epithelial cell differentiation by pulmonary endothelial cell co-culture. *Stem cell research*. 2022;65:102967.
168. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of medical science*. 2018;14(4):910-9.

169. Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(17):6225.
170. Kretzschmar K, Clevers H. Organoids: modeling development and the stem cell niche in a dish. *Developmental cell*. 2016;38(6):590-600.
171. Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadi S, et al. Multipotent stem cell and current application. *Acta Medica Iranica*. 2017:6-23.
172. Goldenberg D, McLaughlin C, Koduru SV, Ravnice DJ. Regenerative engineering: current applications and future perspectives. *Frontiers in surgery*. 2021;8:731031.
173. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):1-22.
174. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *nature*. 2001;414(6859):105-11.
175. Urbischek M, Rannikmae H, Foets T, Ravn K, Hyvönen M, de la Roche M. Organoid culture media formulated with growth factors of defined cellular activity. *Scientific reports*. 2019;9(1):6193.
176. Capeling M, Huang S, Mulero-Russe A, Cieza R, Tsai Y-H, Garcia A, et al. Generation of small intestinal organoids for experimental intestinal physiology. *Methods in cell biology*. 159: Elsevier; 2020. p. 143-74.
177. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, Van De Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009;459(7244):262-5.
178. Dye BR, Hill DR, Ferguson MA, Tsai Y-H, Nagy MS, Dyal R, et al. In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *elife*. 2015;4:e05098.
179. Sachs N, Papaspyropoulos A, Zomer-van Ommen DD, Heo I, Böttinger L, Klay D, et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *The EMBO journal*. 2019;38(4):e100300.
180. Miller AJ, Hill DR, Nagy MS, Aoki Y, Dye BR, Chin AM, et al. In vitro induction and in vivo engraftment of lung bud tip progenitor cells derived from human pluripotent stem cells. *Stem cell reports*. 2018;10(1):101-19.

181. Lim K, Rawlins EL. Protocol for the derivation and alveolar type 2 differentiation of late-stage lung tip progenitors from the developing human lungs. *STAR protocols*. 2024;5(3):103201.
182. Chamorro-Herrero I, Zambrano A. Modeling of Respiratory Diseases Evolving with Fibrosis from Organoids Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(5):4413.
183. Peng L, Gao L, Wu X, Fan Y, Liu M, Chen J, et al. Lung organoids as model to study SARS-CoV-2 infection. *Cells*. 2022;11(17):2758.
184. Lee D, Kim Y, Chung C. Scientific validation and clinical application of lung cancer organoids. *Cells*. 2021;10(11):3012.
185. Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, van den Brink S, Geurts V, Beumer J, Clevers H. Establishment and culture of human intestinal organoids derived from adult stem cells. *Current protocols in immunology*. 2020;130(1):e106.
186. Dijkstra KK, Monkhurst K, Schipper LJ, Hartemink KJ, Smit EF, Kaing S, et al. Challenges in establishing pure lung cancer organoids limit their utility for personalized medicine. *Cell reports*. 2020;31(5):107588-91.
187. Shi R, Radulovich N, Ng C, Liu N, Notsuda H, Cabanero M, et al. Organoid cultures as preclinical models of non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2020;26(5):1162-74.
188. Li Y, Gao Y, Liang B, Cao X, Sun Z, Yu J, et al. Patient-derived organoids of non-small cells lung cancer and their application for drug screening. *Neoplasma*. 2020;67(2):430-437.
189. Hu Y, Sui X, Song F, Li Y, Li K, Chen Z, et al. Lung cancer organoids analyzed on microwell arrays predict drug responses of patients within a week. *Nature communications*. 2021;12(1):2581-95.
190. Kim M, Mun H, Sung CO, Cho EJ, Jeon H-J, Chun S-M, et al. Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. *Nature communications*. 2019;10(1):3991-4016.
191. Barkauskas CE, Chung M-I, Fioret B, Gao X, Katsura H, Hogan BL. Lung organoids: current uses and future promise. *Development*. 2017;144(6):986-97.
192. Chiu MC, Li C, Yu Y, Liu X, Huang J, Wan Z, et al. Establishing Bipotential Human Lung Organoid Culture System and Differentiation to Generate Mature Alveolar and Airway Organoids. *Bio-protocol*. 2023;13(8):e4657-71.

193. Evans KV, Lee J-H. Alveolar wars: the rise of in vitro models to understand human lung alveolar maintenance, regeneration, and disease. *Stem Cells Translational Medicine*. 2020;9(8):867-81.
194. Kathiriya JJ, Wang C, Brumwell A, Cassandras M, Le Saux C, Wolters P, et al. Human alveolar Type 2 epithelium transdifferentiates into metaplastic KRT5+ basal cells during alveolar repair. *BioRxiv*. 2020.
195. Tindle C, Fuller M, Fonseca A, Taheri S, Ibeawuchi S-R, Beutler N, et al. Adult stem cell-derived complete lung organoid models emulate lung disease in COVID-19. *Elife*. 2021;10:e66417.
196. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Current Biology*. 2020;30(16):R921-R5.
197. Dijkstra KK, Cattaneo CM, Weeber F, Chalabi M, van de Haar J, Fanchi LF, et al. Generation of tumor-reactive T cells by co-culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids. *Cell*. 2018;174(6):1586-98. e12.
198. Jogie-Brahim S, Feldman D, Oh Y. Unraveling insulin-like growth factor binding protein-3 actions in human disease. *Endocrine reviews*. 2009;30(5):417-37.
199. Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiological reviews*. 1996;76(4):1005-26.
200. Boisclair Y, Rhoads R, Ueki I, Wang J, Ooi G. The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system. *The Journal of endocrinology*. 2001;170(1):63-70.
201. El-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, Leroith D, Roberts Jr C, Yen S. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products in the human ovary. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1993;77(5):1411-8.
202. Siddle K, Ursø B, Niesler C, Cope D, Molina L, Surinya K, et al. Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors. *Biochemical Society Transactions*. 2001;29(4):513-25.
203. Bralke T. Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein. *Hormone and metabolic research*. 1999;31(02/03):242-6.

204. Baxter RC. Signaling pathways of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrine Reviews*. 2023;44(5):753-78.
205. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld R. Insulin-like growth factor binding proteins: a proposed superfamily. *Acta paediatrica*. 1999;88:37-45.
206. Allard JB, Duan C. IGF-binding proteins: why do they exist and why are there so many? *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:117.
207. Valentinis B, Bhala A, DeAngelis T, Baserga R, Cohen P. The human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the growth of fibroblasts with a targeted disruption of the IGF-I receptor gene. *Molecular endocrinology*. 1995;9(3):361-7.
208. Wang Y, Zhang H, Zhang X, Mu P, Zhao L, Qi R, et al. The role of IGFBP-3 in tumor development and progression: enlightenment for diagnosis and treatment. *Medical Oncology*. 2024;41(6):141.
209. Kang D, Waldvogel HJ, Wang A, Fan D, Faull RL, Curtis MA, et al. The autocrine regulation of insulin-like growth factor-1 in human brain of Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology*. 2021;127:105191.
210. Varma Shrivastav S, Bhardwaj A, Pathak KA, Shrivastav A. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3): unraveling the role in mediating IGF-independent effects within the cell. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2020;8:286.
211. Zhong Y, Lu L, Zhou J, Li Y, Liu Y, Clemmons DR, et al. IGF binding protein 3 exerts its ligand-independent action by antagonizing BMP in zebrafish embryos. *Journal of cell science*. 2011;124(11):1925-35.
212. Luo J, Zhu H, Chang HM, Lin YM, Yang J, Leung PC. The regulation of IGFBP3 by BMP2 has a role in human endometrial remodeling. *The FASEB Journal*. 2020;34(11):15462-79.
213. Nonoshita L, Wathen N, Dsupin B, Chard T, Giudice L. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and proteolyzed IGFBP-3 in embryonic cavities in early human pregnancy: their potential relevance to maternal-embryonic and fetal interactions. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1994;79(5):1249-55.
214. Wang T-H, Chang C-L, Wu H-M, Chiu Y-M, Chen C-K, Wang H-S. Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. *Fertility and sterility*. 2006;86(5):1392-401.

215. Chun S, Chen F, Washburn J, MacDonald J, Innes K, Zhao R, et al. CDX2 promotes anchorage-independent growth by transcriptional repression of IGFBP-3. *Oncogene*. 2007;26(32):4725-9.
216. Irwin JC, Suen L-F, Cheng B-H, Martin R, Cannon P, Deal CL, et al. Human placental trophoblasts secrete a disintegrin metalloproteinase very similar to the insulin-like growth factor binding protein-3 protease in human pregnancy serum. *Endocrinology*. 2000;141(2):666-74.
217. Xi G, Hathaway M, White M, Dayton W. Localization of insulin-like growth factor (IGFBP)-3 in cultured porcine embryonic myogenic cells before and after TGF- β 1 treatment. *Domestic animal endocrinology*. 2007;33(4):422-9.
218. de Silva HC, Firth SM, Twigg SM, Baxter RC. Interaction between IGF binding protein-3 and TGF β in the regulation of adipocyte differentiation. *Endocrinology*. 2012;153(10):4799-807.
219. Nguyen DV, Calzi SL, Shaw LC, Kielczewski JL, Korah HE, Grant MB. An ocular view of the IGF-IGFBP system. *Growth Hormone & IGF Research*. 2013;23(3):45-52.
220. Dang Y-M, Huang G, Chen Y-R, Dang Z-F, Chen C, Liu F-L, et al. Sulforaphane inhibits the proliferation of the BIU87 bladder cancer cell line via IGFBP-3 elevation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014;15(4):1517-20.
221. Ingermann AR, Yang Y-F, Han J, Mikami A, Garza AE, Mohanraj L, et al. Identification of a novel cell death receptor mediating IGFBP-3-induced anti-tumor effects in breast and prostate cancer. *Journal of biological chemistry*. 2010;285(39):30233-46.
222. Marimuthu A, Chavan S, Sathe G, Sahasrabuddhe NA, Srikanth SM, Renuse S, et al. Identification of head and neck squamous cell carcinoma biomarker candidates through proteomic analysis of cancer cell secretome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2013;1834(11):2308-16.
223. Zhang X, Wang G, Gong Y, Zhao L, Song P, Zhang H, et al. IGFBP3 induced by the TGF- β /EGFRvIII transactivation contributes to the malignant phenotype of glioblastoma. *IScience*. 2023;26(5).
224. Yang L, Li J, Fu S, Ren P, Tang J, Wang N, et al. Up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 is associated with brain metastasis in lung adenocarcinoma. *Molecules and cells*. 2019;42(4):321-32.

225. Thompson O, Edgley M, Strasbourger P, Flibotte S, Ewing B, Adair R, et al. The million mutation project: a new approach to genetics in *Caenorhabditis elegans*. *Genome research*. 2013;23(10):1749-62.
226. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*. 2003;300(5617):286-90.
227. Harrow J, Frankish A, Gonzalez JM, Tapanari E, Diekhans M, Kokocinski F, et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome research*. 2012;22(9):1760-74.
228. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews genetics*. 2011;12(12):861-74.
229. Amin N, McGrath A, Chen Y-PP. Evaluation of deep learning in non-coding RNA classification. *Nature Machine Intelligence*. 2019;1(5):246-56.
230. Brosnan CA, Voinnet O. The long and the short of noncoding RNAs. *Current opinion in cell biology*. 2009;21(3):416-25.
231. Ernst C, Morton CC. Identification and function of long non-coding RNA. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2013;7:168.
232. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2018;141(4):1202-7.
233. Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, et al. Molecular mechanisms and biological functions of siRNA. *International journal of biomedical science: IJBS*. 2017;13(2):48.
234. Ozata DM, Gainetdinov I, Zoch A, O'Carroll D, Zamore PD. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nature Reviews Genetics*. 2019;20(2):89-108.
235. Brar GA, Weissman JS. Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015;16(11):651-64.
236. Bachellerie J-P, Cavaillé J, Hüttenhofer A. The expanding snoRNA world. *Biochimie*. 2002;84(8):775-90.
237. Mallory AC, Vaucheret H. MicroRNAs: something important between the genes. *Current opinion in plant biology*. 2004;7(2):120-5.

238. Chan JJ, Tay Y. Noncoding RNA: RNA regulatory networks in cancer. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(5):1310.
239. Romano G, Veneziano D, Acunzo M, Croce CM. Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis*. 2017;38(5):485-91.
240. Cowland JB, Hother C, Grønbaek K. MicroRNAs and cancer. *Apmis*. 2007;115(10):1090-106.
241. Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of microRNA function. *Trends in biochemical sciences*. 2007;32(4):189-97.
242. Du T, Zamore PD. *microPrimer: the biogenesis and function of microRNA*. 2005.
243. Li S-C, Tsai K-W, Pan H-W, Jeng Y-M, Ho M-R, Li W-H, editors. MicroRNA 3'end nucleotide modification patterns and arm selection preference in liver tissues. *BMC systems biology*. 2012;6(S2):S14-26.
244. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*. 2009;11(3):228-34.
245. Boateng E, Krauss-Etschmann S. miRNAs in lung development and diseases. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(8):2765.
246. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology*. 2007;302(1):1-12.
247. MacFarlane L-A, R Murphy P. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Current genomics*. 2010;11(7):537-61.
248. Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Molecular cell*. 2007;26(5):731-43.
249. Gallardo E, Navarro A, Vinolas N, Marrades RM, Diaz T, Gel B, et al. miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis*. 2009;30(11):1903-9.
250. Shi Y, Liu C, Liu X, Tang DG, Wang J. The microRNA miR-34a inhibits non-small cell lung cancer (NSCLC) growth and the CD44^{hi} stem-like NSCLC cells. *PloS one*. 2014;9(3):e90022.

251. Zimmerman KA, Yancopoulos GD, Collum RG, Smith RK, Kohl NE, Denis KA, et al. Differential expression of myc family genes during murine development. *Nature*. 1986;319(6056):780-3.
252. Okubo T, Knoepfler PS, Eisenman RN, Hogan BL. Nmyc plays an essential role during lung development as a dosage-sensitive regulator of progenitor cell proliferation and differentiation. 2005.
253. Serra R, Pelton RW, Moses HL. TGF β 1 inhibits branching morphogenesis and N-myc expression in lung bud organ cultures. *Development*. 1994;120(8):2153-61.
254. Roman J. Effects of calcium channel blockade on mammalian lung branching morphogenesis. *Experimental lung research*. 1995;21(4):489-502.
255. Sun D, Llorca Batlle O, van den Ameele J, Thomas JC, He P, Lim K, et al. SOX9 maintains human foetal lung tip progenitor state by enhancing WNT and RTK signalling. *The EMBO Journal*. 2022;41(21):e111338.
256. Vazana-Netzarim R, Elmalem Y, Sofer S, Bruck H, Danino N, Sarig U. Distinct HAND2/HAND2-AS1 Expression Levels May Fine-Tune Mesenchymal and Epithelial Cell Plasticity of Human Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(22):16546.
257. Lin I-Y, Chiu F-L, Yeang C-H, Chen H-F, Chuang C-Y, Yang S-Y, et al. Suppression of the SOX2 neural effector gene by PRDM1 promotes human germ cell fate in embryonic stem cells. *Stem cell reports*. 2014;2(2):189-204.
258. Lim K, Donovan AP, Tang W, Sun D, He P, Pett JP, et al. Organoid modeling of human fetal lung alveolar development reveals mechanisms of cell fate patterning and neonatal respiratory disease. *Cell Stem Cell*. 2023;30(1):20-37. e9.
259. Kazanskaya O, Ohkawara B, Herault M, Wu W, Maltry N, Augustin HG, et al. The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development. 2008.
260. Murisier-Petetin G, Gremlich S, Damnon F, Reymondin D, Hohlfeld P, Gerber S. Amniotic fluid insulin-like growth factor binding protein 3 concentration as early indicator of fetal growth restriction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2009;144(1):15-20.
261. Hong S, Kim M-M. IGFBP-3 plays an important role in senescence as an aging marker. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018;59:138-45.

262. Kalluri HS, Dempsey RJ. IGFBP-3 inhibits the proliferation of neural progenitor cells. *Neurochemical research*. 2011;36:406-11.
263. D'Addio F, La Rosa S, Maestroni A, Jung P, Orsenigo E, Nasr MB, et al. Circulating IGF-I and IGFBP3 levels control human colonic stem cell function and are disrupted in diabetic enteropathy. *Cell stem cell*. 2015;17(4):486-98.
264. Ressler S, Radhi J, Aigner T, Loo C, Zwerschke W, Sergi C. Insulin-like growth factor-binding protein-3 in osteosarcomas and normal bone tissues. *Anticancer research*. 2009;29(7):2579-87.
265. Frum T, Hsu PP, Hein RF, Conchola AS, Zhang CJ, Utter OR, et al. Opposing roles for TGF β - and BMP-signaling during nascent alveolar differentiation in the developing human lung. *NPJ Regenerative Medicine*. 2023;8(1):48.
266. Miyazono K, Ehata S, Koinuma D. Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. *Upsala journal of medical sciences*. 2012;117(2):143-52.
267. Xu R-H, Sampsell-Barron TL, Gu F, Root S, Peck RM, Pan G, et al. NANOG is a direct target of TGF β /activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell stem cell*. 2008;3(2):196-206.
268. Chung M-I, Bujnis M, Barkauskas CE, Kobayashi Y, Hogan BL. Niche-mediated BMP/SMAD signaling regulates lung alveolar stem cell proliferation and differentiation. *Development*. 2018;145(9):dev163014.
269. Cotten CM, editor Pulmonary hypoplasia. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*; 2017: Elsevier.
270. Fazilaty H, Basler K. Reactivation of embryonic genetic programs in tissue regeneration and disease. *Nature Genetics*. 2023;55(11):1792-806.
271. Kahm Y-J, Jung U, Kim R-K. BIRC5 Regulates IGFBP-3-Induced Autocrine Loop in Cancer Stem Cells. *bioRxiv*. 2023.
272. Cao H, Wang G, Meng L, Shen H, Feng Z, Liu Q, et al. Association between circulating levels of IGF-1 and IGFBP-3 and lung cancer risk: a meta-analysis. *PloS one*. 2012;7(11):e49884.
273. Natsuizaka M, Kinugasa H, Kagawa S, Whelan KA, Naganuma S, Subramanian H, et al. IGFBP3 promotes esophageal cancer growth by suppressing oxidative stress in hypoxic tumor microenvironment. *American journal of cancer research*. 2014;4(1):29.

274. Rabata A, Fedr R, Soucek K, Hampl A, Koledova Z. 3D cell culture models demonstrate a role for FGF and WNT signaling in regulation of lung epithelial cell fate and morphogenesis. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2020;8:548946.
275. Lugli N, Kamileri I, Keogh A, Malinka T, Sarris ME, Talianidis I, et al. R-spondin 1 and noggin facilitate expansion of resident stem cells from non-damaged gallbladders. *EMBO reports*. 2016;17(5):769-79.
276. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van Den Brink S, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1762-72.
277. Luo H, Yount C, Lang H, Yang A, Riemer EC, Lyons K, et al. Activation of p53 with Nutlin-3a radiosensitizes lung cancer cells via enhancing radiation-induced premature senescence. *Lung cancer*. 2013;81(2):167-73.
278. Ebisudani T, Hamamoto J, Togasaki K, Mitsuishi A, Sugihara K, Shinozaki T, et al. Genotype-phenotype mapping of a patient-derived lung cancer organoid biobank identifies NKX2-1-defined Wnt dependency in lung adenocarcinoma. *Cell Reports*. 2023;42(3).
279. Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2010;1805(1):105-17.
280. Magro-Lopez E, Palmer C, Manso J, Liste I, Zambrano A. Effects of lung and airway epithelial maturation cocktail on the structure of lung bud organoids. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018;9:1-6.
281. Hoffmann K, Obermayer B, Hönzke K, Fatykhova D, Demir Z, Löwa A, et al. Human alveolar progenitors generate dual lineage bronchioalveolar organoids. *Communications biology*. 2022;5(1):875.
282. Shi C, Lv T, Xiang Z, Sun Z, Qian W, Han X. Role of Wnt/ β -Catenin Signaling in Epithelial Differentiation of Lung Resident Mesenchymal Stem Cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2015;116(8):1532-9.