



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR INGENIERÍA  
INDUSTRIAL VALENCIA

**TRABAJO FIN DE MASTER EN INGENIERÍA BIOMÉDICA**

# **ESTUDIO DEL EFECTO MODULADOR DE LOS AGONISTAS CANNABINOIDES EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL EN EL CÁNCER DE PULMÓN**

AUTOR: Inés Sanz González  
TUTORES: Manuel Mata Roig  
Guillermo Vilariño Feltre

**Curso Académico: 2019-20**



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero aprovechar la ocasión para agradecer la oportunidad que me brindaron Carmen Cardá y Manuel Mata al dejarme realizar mi trabajo fin de máster en su grupo de investigación, en especial a Manolo por ser mi tutor y haber confiado en mí. Ha sido un placer formar parte de este gran equipo y haberme sentido tan cómoda. También me gustaría agradecer el apoyo, pasión y tiempo que Guillermo Vilariño ha empleado en el seguimiento y correcciones del trabajo, además de haber sido un gran profesor durante el curso. Marieta y Rubén, estaré eternamente agradecida con vosotros por enseñarme tanto y tan bien, y por vuestra infinita paciencia conmigo. Con este trabajo y todo lo relacionado con él considero que he aprendido aspectos muy valiosos tanto para mi vida profesional como personal.

Asimismo, no me puedo olvidar en este momento de mis padres, familia y amigos, de su apoyo durante todos estos años de estudio que culminan con este buen trabajo del que me siento muy orgullosa. En especial me gustaría mencionar a mis amigos valencianos por haberme hecho sentir como en casa durante este tiempo, a Alba por ser mi compañía en esas largas noches escribiendo y, por último, a ti Lucas no existen palabras para expresar lo agradecida que estoy de haberte conocido y de tu apoyo más que incondicional.

## RESUMEN

El cáncer de pulmón es el resultado del crecimiento anormal de células, puesto que estas comienzan a multiplicarse sin control, del tracto respiratorio donde el tumor suele originarse a partir de células epiteliales, y puede derivar en metástasis e infiltración a otros tejidos del cuerpo. Estas células pueden experimentar una serie de cambios morfológicos y fenotípicos propios de los fibroblastos y células mesenquimales que les permiten abandonar el lecho tumoral en el tejido epitelial y migrar a otras partes del organismo en el que producirán nuevos focos tumorales. A este conjunto de cambios se le denomina transición epitelio-mesénquima (TEM).

La TEM es un conjunto de procesos de elevada complejidad donde intervienen células estromales (como los fibroblastos asociados al cáncer o CAFs, entre otras), macromoléculas (diferentes tipos de colágeno) y mediadores químicos como el *transforming growth factor beta* (TGF $\beta$ ). Todos estos elementos interactúan con el sistema inmunitario y conforman lo que se denomina microambiente tumoral. Las interacciones entre todos estos elementos determinan aspectos tan complejos como la diseminación tumoral o la resistencia a fármacos. Existe un interés claro en la búsqueda de nuevos fármacos antitumorales que completen las terapias actuales. Entre ellos se han propuesto recientemente los agonistas cannabinoides. Estos compuestos interactúan con los receptores de membrana CB1 y CB2. Aunque estos fármacos se han utilizado en el tratamiento paliativo en fases terminales de diversos cánceres, han demostrado su eficacia en modelos celulares *in vitro* como inhibidores del proceso de TEM en líneas celulares cancerígenas.

En este trabajo se evaluó el efecto modulador *in vitro* del THC, el CBD y su combinación en ausencia o presencia del TGF- $\beta$ 1 sobre los CAFs. También, se estudió el efecto que tienen los CAFs tratados con los anteriores cannabinoides sobre diferentes líneas celulares tumorales epiteliales (A549, H1792 y H460). Para ello se llevaron a cabo una serie de ensayos donde se evaluó este efecto sobre la proliferación celular y la expresión de marcadores moleculares y fenotípicos de TEM mediante real time RT-PCR y tinción fluorescente de faloidina, ASMA y FSP1. Los resultados obtenidos refuerzan el posible papel modulador de los agonistas cannabinoides sobre las interacciones de elementos del microambiente tumoral.

**Palabras Clave:** cáncer de pulmón, transición epitelio-mesénquima, fibroblasto asociado al cáncer, sistema endocannabinoide, agonistas de cannabinoides, ASMA, FSP-1.

## ABSTRACT

Lung cancer results from the abnormal growth of cells, as they begin to multiply uncontrollably, from the respiratory tract where the tumor usually originates from epithelial cells, and can lead to metastasis and infiltration into other tissues of the body. These cells can undergo a series of morphological and phenotypical changes characteristic of fibroblasts and mesenchymal cells that allow them to leave the tumor bed in the epithelial tissue and migrate to other parts of the body where they will produce new tumor sites. This set of changes is called the epithelial-mesenchymal transition (EMT).

The TEM is a set of highly complex processes involving stromal cells (such as cancer associated fibroblasts or CAFs, among others), macromolecules (different types of collagen) and chemical mediators such as transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ). All these elements interact with the immune system and form what is called the tumor microenvironment. The interactions between all these elements determine aspects as complex as tumor spread or drug resistance. There is a clear interest in the search for new anti-tumor drugs to complement current therapies. Among these have been proposed recently cannabinoid agonists. These compounds interact with the membrane receptors CB1 and CB2. Although these drugs have been used in the palliative treatment in terminal phases of diverse cancers, they have demonstrated their effectiveness in cellular models *in vitro* like inhibitors of the process of TEM in carcinogenic cell lines.

In this work, the *in vitro* modulating effect of THC, CBD and their combination in the absence or presence of TGF- $\beta$ 1 on CAFs was evaluated. Also, it was studied the effect that CAFs treated with the previous cannabinoids have on different epithelial tumor cell lines (A549, H460 and H1792). For this purpose, a series of experiments were carried out where this effect on cell proliferation and the expression of molecular and phenotypical markers of TEM were evaluated by means of real time RT-PCR and fluorescent staining of phalloidin, ASMA and FSP1. The results obtained support the possible modulating role of cannabinoid agonists on the interactions of elements of the tumor microenvironment.

**Keywords:** lung cancer, epithelial-mesenchymal transition, cancer-associated fibroblast, endocannabinoid system, cannabinoid agonists, ASMA, FSP-1.

## RESUM

El càncer de pulmó és el resultat del creixement anormal de cèl·lules, donat que aquestes comencen a multiplicar-se sense control, del tracte respiratori on el tumor sol originar-se a partir de cèl·lules epitelials, i pot derivar en metàstasi i infiltració a altres teixits del cos. Aquestes cèl·lules poden experimentar una sèrie de canvis morfològics i fenotípics propis dels fibroblasts i cèl·lules mesenquimals que els permeten abandonar el llit tumoral en el teixit epitelial i migrar a altres parts de l'organisme on produeixen nous focus tumorals. Aquest conjunt de canvis es denomina transició epiteli-mesènquima (TEM).

La TEM és un conjunt de processos d'elevada complexitat on intervien cèl·lules estromals (com els fibroblasts associats al càncer o CAFs, entre d'altres), macromolècules (diferents tipus de col·lagen) i mediadors químics com el transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ). Tots aquests elements interaccionen amb el sistema immunitari i conformen allò que es denomina microambient tumoral. Les interaccions entre aquests elements determinen aspectes tan complexos com la disseminació tumoral o la resistència a fàrmacs. Existeix un interès clar en la recerca de nous fàrmacs antitumorals que completen les teràpies actuals. Entre ells s'han proposat recentment els agonistes cannabinoides. Aquests compostos interactuen amb els receptors de membrana CB1 i CB2. Encara que aquests fàrmacs s'han utilitzat en el tractament pal·liatiu en fases terminals de diversos càncers, han demostrat la seua eficàcia en models cel·lulars *in vitro* com els inhibidors del procés de TEM en línies cel·lulars cancerígenes.

En aquest treball s'ha avaluat l'efecte modulador *in vitro* del THC, el CBD i la seua combinació en absència o presència del TGF- $\beta$ 1 sobre els CAFs. També, s'ha estudiat l'efecte que tenen els CAFs tractats amb els anteriors cannabinoides sobre diferents línies cel·lulars tumorals epitelials (A549, H1792 i H460). Per a això s'han portat a terme una sèrie d'assajos on s'avalua aquest efecte sobre la proliferació cel·lular i l'expressió de marcadors moleculars i fenotípics de TEM mitjançant real time RT-PCR i tinció fluorescent de faloidina, DAPI, ASMA i FSP-1. Els resultats obtinguts reforcen el possible paper modulador dels agonistes cannabinoides sobre les interaccions d'elements del microambient tumoral.

**Paraules clau:** càncer de pulmó, transició epiteli-mesènquima, fibroblast associat al càncer, sistema endocannabinoide, agonistes de cannabinoides, ASMA, FSP-1.

## Documentos contenidos en el TFM

- Documento 1: Memoria
- Documento 2: Presupuesto

## ÍNDICE DE LA MEMORIA

1. Introducción .....	1
2. Hipótesis y objetivos.....	19
3. Materiales y métodos.....	21
4. Resultados y discusión.....	33
5. Conclusiones.....	55
6. Bibliografía.....	56

## ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

1. Introducción del presupuesto .....	1
2. Cuadros de mano de obra, materiales y maquinaria .....	1
3. Cuadros de presupuestos parciales y precios descompuestos .....	4
4. Presupuesto ejecución material, por contrata y base de licitación .....	5



## **DOCUMENTO 1: MEMORIA**



# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. El cáncer de pulmón.</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Clasificación. ....	2
1.1.2. Sintomatología. ....	3
1.1.3. Tratamientos actuales. ....	3
1.1.4. Metástasis: malignidad y generación de resistencias.....	4
<b>1.2. La transición epitelio-mesénquima (TEM).</b> .....	<b>5</b>
1.2.1. TEM y su implicación en el cáncer: marcadores y eventos celulares. ....	5
1.2.2. Rutas de señalización. ....	7
1.2.3. TEM como diana de los tratamientos antitumorales. ....	8
<b>1.3. El microambiente tumoral.</b> .....	<b>8</b>
1.3.1. Matriz extracelular. ....	9
1.3.2. Fibroblastos asociados al cáncer. ....	9
1.3.3. Estrategias para reproducir el microambiente tumoral. ....	10
<b>1.4. El sistema endocannabinoide.</b> .....	<b>11</b>
1.4.1. Componentes del sistema endocannabinoide. ....	11
1.4.2. Mecanismo de acción. ....	14
1.4.3. Papel de los agonistas cannabinoideos en las terapias contra el cáncer de pulmón. 16	
<b>1.5. Necesidad de nuevas terapias.</b> .....	<b>17</b>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1. Justificación del trabajo.</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2. Hipótesis del estudio.</b> .....	<b>19</b>
<b>2.3. Objetivo.</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1. Fuentes celulares y medios de cultivo.</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2. Cultivo de fibroblastos y células epiteliales.</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3. Estudio de la variación de la viabilidad celular por los agonistas cannabinoideos.</b> ..	<b>24</b>
<b>3.4. Preparación de los tratamientos basados en agonistas cannabinoideos.</b> .....	<b>25</b>
<b>3.5. Análisis de la expresión relativa de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima mediante el uso de Real Time PCR.</b> .....	<b>26</b>
<b>3.6. Evaluación de los cambios morfológicos mediante tinción con Faloidina, y de la expresión de ASMA y FSP1 mediante inmunofluorescencia.</b> .....	<b>30</b>
<b>3.7. Análisis de los resultados.</b> .....	<b>32</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1. Efecto de los agonistas cannabinoideos sobre la viabilidad en fibroblastos aislados de tejido tumoral o sano de pacientes con cáncer de pulmón.</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2. Papel modulador de los sobrenadantes de los fibroblastos tumorales y sanos sobre la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de pulmón.</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3. Regulación de la expresión génica de los fibroblastos tumorales y sanos tratados con los agonistas cannabinoideos.</b> .....	<b>36</b>

<b>4.4. Análisis morfológico de los fibroblastos tratados con los agonistas cannabinoides.</b>	<b>38</b>
4.4.1. Organización del citoesqueleto.....	38
4.4.2. Estudio de la expresión de ASMA mediante inmunofluorescencia en fibroblastos.....	43
4.4.3. Estudio de la expresión de FSP1 mediante inmunofluorescencia en fibroblastos.	46
<b>4.5. Regulación de la expresión génica de la línea celular H460 tratada con los sobrenadantes de los fibroblastos. ....</b>	<b>49</b>
<b>4.6. Análisis morfológico de la línea celular H460 tratada con los sobrenadantes de los fibroblastos. ....</b>	<b>52</b>
<b>5. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>55</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> INCIDENCIA Y MORTALIDAD ESTANDARIZADAS POR EDAD DE LOS PRINCIPALES CÁNCERES DEL MUNDO EN 2018. (EDADES ENTRE 0 Y 79 AÑOS): EL EJE X MUESTRA RATIOS ESTANDARIZADOS POR EDAD CADA 100.000 HABITANTES. BARRAS AZULES: INCIDENCIA DEL CÁNCER. BARRAS ROJAS: MORTALIDAD DEL CÁNCER. (GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2018) .....	1
<b>FIGURA 2.</b> CORTE HISTOLÓGICO DE CÁNCER DE CÉLULAS PEQUEÑAS Y CÉLULAS NO PEQUEÑAS [MODIFICADA DE (ZIJLSTRA, 2008)]. .....	2
<b>FIGURA 3.</b> ETAPAS INVOLUCRADAS EN LA METÁSTASIS (MODIFICADA DE (THIERY, 2002)). .....	4
<b>FIGURA 4.</b> TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA: GENES INVOLUCRADOS EN LA TRANSICIÓN FENOTÍPICA (KALLURI ET AL., 2009) .....	6
<b>FIGURA 5.</b> LOS DIFERENTES ORÍGENES CELULARES DE LAS CAFs (BU ET AL., 2019). .....	10
<b>FIGURA 6.</b> REPRESENTACIÓN DE LOS RECEPTORES CB1 Y CB2 EN LA MEMBRANA CELULAR (SUÁREZ ET AL., 2014). .....	12
<b>FIGURA 7.</b> REPRESENTACIÓN DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA AEA Y 2-AG (SUÁREZ ET AL., 2014). .....	13
<b>FIGURA 8.</b> RUTA DE FORMACIÓN DEL AEA Y 2-AG (SUÁREZ ET AL., 2014). .....	13
<b>FIGURA 9.</b> REPRESENTACIÓN DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DEL THC Y CBD (HEMPMEDS, 2019). .....	14
<b>FIGURA 10.</b> MECANISMO DE ACCIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE (CANNABIS CONSCIENTE, N.D.).....	15
<b>FIGURA 11.</b> IMÁGENES DE FIBROBLASTOS SANOS (IZQUIERDA) Y TUMORALES (DERECHA) DEL PACIENTE 12 OBTENIDAS CON UN AUMENTO DE 10X. ....	21
<b>FIGURA 12.</b> IMÁGENES DE LAS CÉLULAS DE LA LÍNEA CELULAR H1792 SACADAS CON UN AUMENTO DE 10X EN DIFERENTES TIEMPOS DE CULTIVO. ....	22
<b>FIGURA 13.</b> IMÁGENES DE LAS CÉLULAS DE LA LÍNEA CELULAR A549 SACADAS CON UN AUMENTO DE 10X EN DIFERENTES TIEMPOS DE CULTIVO. ....	22
<b>FIGURA 14.</b> IMÁGENES DE LAS CÉLULAS DE LA LÍNEA CELULAR H460 SACADAS CON UN AUMENTO DE 10X EN DIFERENTES TIEMPOS DE CULTIVO. ....	22
<b>FIGURA 15.</b> DISEÑO DE LA PLACA DE 96 POCILLOS PARA EL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LOS FIBROBLASTOS TRATADOS CON LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE AGONISTAS CANNABINOIDES. ....	25

<b>FIGURA 16.</b> DISEÑO DE LA PLACA DE 96 POCILLOS PARA EL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LAS LÍNEAS CELULARES TUMORALES TRATADAS CON LOS TRATAMIENTOS. ....	26
<b>FIGURA 17.</b> DISEÑO DE LAS PLACAS DE 12 POCILLOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN NECESARIA PARA LA QPCR DE LA LÍNEA H460 TRATADA CON LOS SOBRENADANTES DE LOS FIBROBLASTOS SANOS (NORMALES). ....	27
<b>FIGURA 18.</b> REPRESENTACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) (LEÓN, I., 2017). ....	29
<b>FIGURA 19.</b> DISEÑO DE LAS CÁMARAS DE 8 POCILLOS, DE LOS FIBROBLASTOS Y LA LÍNEA CELULAR H460 TRATADA CON EL SOBRENADANTE DE LOS FIBROBLASTOS SANOS (NORMALES), PARA EL ENSAYO DE TINCIÓN E INMUNOFLUORESCENCIA.....	31
<b>FIGURA 20.</b> GRÁFICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LOS FIBROBLASTOS TRATADOS CON LOS CANNABINOIDES. SE RESUMEN LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA UNA N DE 3. * P<0.05 COMPARADO CON EL GRUPO CONTROL DE FIBROBLASTOS SANOS. # P<0.05 COMPARADO CON EL GRUPO CONTROL DE FIBROBLASTOS TUMORALES. ....	33
<b>FIGURA 21.</b> GRÁFICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LA LÍNEA CELULAR A549 TRATADA CON LOS SOBRENADANTES DE FIBROBLASTOS SANOS Y TUMORALES. SE PRESENTAN LOS DATOS OBTENIDOS PARA UNA N DE 2. * P<0.05 RESPECTO AL GRUPO CONTROL. EN EL EJE X SE SITUAN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DONDE “SIN ADIT” HACE REFERENCIA AL SOBRENADANTE SIN NINGÚN TRATAMIENTO Y EN EL EJE Y ESTÁ REPRESENTADA LA VIABILIDAD EN PORCENTAJE. ....	34
<b>FIGURA 22.</b> GRÁFICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LA LÍNEA H460 TRATADA CON LOS SOBRENADANTES DE FIBROBLASTOS SANOS Y TUMORALES. SE PRESENTAN LOS DATOS OBTENIDOS PARA UNA N DE 2. * P<0.05 RESPECTO AL GRUPO CONTROL. EN EL EJE X SE SITUAN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DONDE “SIN ADIT” HACE REFERENCIA AL SOBRENADANTE SIN NINGÚN TRATAMIENTO Y EN EL EJE Y ESTÁ REPRESENTADA LA VIABILIDAD EN PORCENTAJE. ....	35
<b>FIGURA 23.</b> GRÁFICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LA LÍNEA H1792 TRATADA CON LOS SOBRENADANTES. EL * INDICA QUE EXISTE UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA RESPECTO AL CONTROL DEL ENSAYO. EN EL EJE X SE SITUAN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DONDE “SIN ADIT” HACE REFERENCIA AL SOBRENADANTE SIN NINGÚN TRATAMIENTO Y EN EL EJE Y ESTÁ REPRESENTADA LA VIABILIDAD EN PORCENTAJE. ....	36
<b>FIGURA 24</b> EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES FAP Y FSP-1 DE LOS FIBROBLASTOS SANOS/NORMALES CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS. SE PRESENTAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA UNA N DE 3. * P<0.05 RESPECTO AL GRUPO CONTROL. EN EL EJE Y ESTÁ REPRESENTADA LA EXPRESIÓN COMO $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Y EN EL EJE X LAS DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	37
<b>FIGURA 25.</b> EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES FAP Y FSP-1 DE LOS FIBROBLASTOS TUMORALES CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS. SE PRESENTAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA UNA N DE 3. * P<0.05 RESPECTO AL GRUPO CONTROL. EN EL EJE Y ESTÁ REPRESENTADA LA EXPRESIÓN COMO $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Y EN EL EJE X LAS DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	37
<b>FIGURA 26.</b> IMÁGENES DE LOS FIBROBLASTOS TRATADOS CON LOS AGONISTAS CANNABINOIDES CON UN AUMENTO DE 20X. LOS PANELES A, C, E Y G SE CORRESPONDEN CON FIBROBLASTOS SANOS Y LOS B, D, F Y H CON FIBROBLASTOS TUMORALES. SE INCLUYEN LOS SIGUIENTES GRUPOS EXPERIMENTALES: CONTROL (A-B), THC 30 $\mu$ M (C-D), CBD 30 $\mu$ M (E-F) Y THC + CBD 10 $\mu$ M (G-H). LAS IMÁGENES PRESENTADAS SON REPRESENTATIVAS DE UNA N=3.....	39
<b>FIGURA 27.</b> IMÁGENES DE LOS FIBROBLASTOS TRATADOS CON LOS AGONISTAS CANNABINOIDES EN PRESENCIA DE TGF- $\beta$ 1 CON AUMENTO DE 20X. LOS PANELES A, C, E Y G SE CORRESPONDEN CON FIBROBLASTOS SANOS Y LOS B, D, F Y H CON FIBROBLASTOS TUMORALES. SE INCLUYEN LOS SIGUIENTES GRUPOS EXPERIMENTALES CONTROL (A-B), THC 30 $\mu$ M (C-D), CBD 30 $\mu$ M (E-F) Y THC + CBD 10 $\mu$ M (G-H). LAS IMÁGENES PRESENTADAS SON REPRESENTATIVAS DE UNA N=3. ....	40

- FIGURA 28.** IMÁGENES DE LOS FIBROBLASTOS TRATADOS CON LOS AGONISTAS CANNABINOIDES CON UN AUMENTO DE 20X. LOS PANELES A, C, E Y G SE CORRESPONDEN CON FIBROBLASTOS SANOS Y LOS B, D, F Y H CON FIBROBLASTOS TUMORALES. SE INCLUYEN LOS SIGUIENTES GRUPOS EXPERIMENTALES: CONTROL (A-B), THC 30  $\mu$ M (C-D), CBD 30  $\mu$ M (E-F) Y THC + CBD 10  $\mu$ M (G-H). LAS IMÁGENES PRESENTADAS SON REPRESENTATIVAS DE UNA N=3..... 41
- FIGURA 29.** IMÁGENES DE LOS FIBROBLASTOS TRATADOS CON LOS AGONISTAS CANNABINOIDES EN PRESENCIA DE TGF- $\beta$ 1 CON UN AUMENTO DE 20X. LOS PANELES A, C, E Y G SE CORRESPONDEN CON FIBROBLASTOS SANOS Y LOS B, D, F Y H CON FIBROBLASTOS TUMORALES. SE INCLUYEN LOS SIGUIENTES GRUPOS EXPERIMENTALES: CONTROL (A-B), THC 30  $\mu$ M (C-D), CBD 30  $\mu$ M (E-F) Y THC+ CBD 10  $\mu$ M (G-H). LAS IMÁGENES PRESENTADAS SON REPRESENTATIVAS DE UNA N=3. .... 42
- FIGURA 30.** IMÁGENES DE LA INMUNOFLUORESCENCIA CON ASMA DE LOS FIBROBLASTOS TRATADOS CON LOS AGONISTAS CANNABINOIDES CON UN AUMENTO DE 60X. LOS PANELES A, C, E Y G SE CORRESPONDEN CON FIBROBLASTOS SANOS Y LOS B, D, F Y H CON FIBROBLASTOS TUMORALES. SE INCLUYEN LOS SIGUIENTES GRUPOS EXPERIMENTALES: CONTROL (A-B), THC 30  $\mu$ M (C-D), CBD 30  $\mu$ M (E-F) Y THC + CBD 10  $\mu$ M (G-H). LAS IMÁGENES PRESENTADAS SON REPRESENTATIVAS DE UNA N=3..... 44
- FIGURA 31.** IMÁGENES DE LA INMUNOFLUORESCENCIA CON ASMA DE LOS FIBROBLASTOS TRATADOS CON LOS AGONISTAS CANNABINOIDES Y TGF- $\beta$ 1 CON UN AUMENTO DE 60X LOS PANELES A, C, E Y G SE CORRESPONDEN CON FIBROBLASTOS SANOS Y LOS B, D, F Y H CON FIBROBLASTOS TUMORALES. SE INCLUYEN LOS SIGUIENTES GRUPOS EXPERIMENTALES: CONTROL (A-B), THC 30  $\mu$ M (C-D), CBD 30  $\mu$ M (E-F) Y THC + CBD 10  $\mu$ M (G-H). LAS IMÁGENES PRESENTADAS SON REPRESENTATIVAS DE UNA N=3. 45
- FIGURA 32.** IMÁGENES DE LA INMUNOFLUORESCENCIA CON FSP-1 DE LOS FIBROBLASTOS TRATADOS CON LOS AGONISTAS CANNABINOIDES CON UN AUMENTO DE 60X LOS PANELES A, C, E Y G SE CORRESPONDEN CON FIBROBLASTOS SANOS Y LOS B, D, F Y H CON FIBROBLASTOS TUMORALES. SE INCLUYEN LOS SIGUIENTES GRUPOS EXPERIMENTALES: CONTROL (A-B), THC 30  $\mu$ M (C-D), CBD 30  $\mu$ M (E-F) Y THC + CBD 10  $\mu$ M (G-H). LAS IMÁGENES PRESENTADAS SON REPRESENTATIVAS DE UNA N=3..... 47
- FIGURA 33.** IMÁGENES DE LA INMUNOFLUORESCENCIA CON FSP-1 DE LOS FIBROBLASTOS TRATADOS CON LOS AGONISTAS CANNABINOIDES Y TGF- $\beta$ 1 CON UN AUMENTO DE 60X LOS PANELES A, C, E Y G SE CORRESPONDEN CON FIBROBLASTOS SANOS Y LOS B, D, F Y H CON FIBROBLASTOS TUMORALES. SE INCLUYEN LOS SIGUIENTES GRUPOS EXPERIMENTALES: CONTROL (A-B), THC 30  $\mu$ M (C-D), CBD 30  $\mu$ M (E-F) Y THC + CBD 10  $\mu$ M (G-H). LAS IMÁGENES PRESENTADAS SON REPRESENTATIVAS DE UNA N=3 . 48
- FIGURA 34.** EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES CDH1, CDH2 Y VIM EN LA LÍNEA CELULAR H460 TRATADA CON LOS SOBRENADANTES DE LOS FIBROBLASTOS TUMORALES. SE MUESTRAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA UNA N DE 3. \* P< 0.05 RESPECTO AL GRUPO CONTROL. EN EL EJE Y ESTÁ REPRESENTADA LA EXPRESIÓN COMO  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Y EN EL EJE X LAS DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES..... 50
- FIGURA 35.** EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES FAP Y FSP-1 EN LA LÍNEA CELULAR H460 TRATADA CON LOS SOBRENADANTES DE LOS FIBROBLASTOS TUMORALES. SE MUESTRAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA UNA N DE 3. \* P< 0.05 RESPECTO AL GRUPO CONTROL. EN EL EJE Y ESTÁ REPRESENTADA LA EXPRESIÓN COMO  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Y EN EL EJE X LAS DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES. .... 50
- FIGURA 36.** EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES CDH1, CDH2 Y VIM EN LA LÍNEA CELULAR H460 TRATADA CON LOS SOBRENADANTES DE LOS FIBROBLASTOS SANOS/NORMALES. SE MUESTRAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA UNA N DE 3. \* P< 0.05 RESPECTO AL GRUPO CONTROL. EN EL EJE Y ESTÁ REPRESENTADA LA EXPRESIÓN COMO  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Y EN EL EJE X LAS DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES..... 51
- FIGURA 37.** EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES FAP Y FSP-1 EN LA LÍNEA CELULAR H460 TRATADA CON LOS SOBRENADANTES DE LOS FIBROBLASTOS SANOS/NORMALES. SE MUESTRAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS

PARA UNA N DE 3. \*  $p < 0.05$  RESPECTO AL GRUPO CONTROL. EN EL EJE Y ESTÁ REPRESENTADA LA EXPRESIÓN COMO  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Y EN EL EJE X LAS DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES..... 51

**FIGURA 38.** IMÁGENES DE LÍNEA H460 TRATADOS CON LOS SOBRENADANTES DE FIBROBLASTOS. SE MUESTRAN LOS SIGUIENTES GRUPOS EXPERIMENTALES: CONTROL (A), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS SANOS (D), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS TUMORALES (G), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS NORMALES TRATADOS CON THC (B), CBD (E) Y THC+CBD (H), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS TUMORALES TRATADOS CON THC (C), CBD (F) Y THC + CBD (I). ..... 52

**FIGURA 39.** IMÁGENES DE LÍNEA H460 TRATADOS CON LOS SOBRENADANTES DE FIBROBLASTOS TRATADOS CON TGF- $\beta$ 1 5 NG/ML. SE MUESTRAN LOS SIGUIENTES GRUPOS EXPERIMENTALES: CONTROL (A), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS SANOS (D), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS TUMORALES (G), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS NORMALES TRATADOS CON THC (B), CBD (E) Y THC+CBD (H), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS TUMORALES TRATADOS CON THC (C), CBD (F) Y THC + CBD (I). ... 53

**FIGURA 40.** IMÁGENES DE LÍNEA H460 TRATADOS CON LOS SOBRENADANTES CON UN AUMENTO DE 60X. SE MUESTRAN LOS SIGUIENTES GRUPOS EXPERIMENTALES: CONTROL (A), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS SANOS (D), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS TUMORALES (G), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS NORMALES TRATADOS CON THC (B), CBD (E) Y THC+CBD (H), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS TUMORALES TRATADOS CON THC (C), CBD (F) Y THC + CBD (I)..... 54

**FIGURA 41.** IMÁGENES DE LÍNEA H460 TRATADOS CON LOS SOBRENADANTES Y TGF- $\beta$ 1 5 NG/ML CON UN AUMENTO DE 60X. SE MUESTRAN LOS SIGUIENTES GRUPOS EXPERIMENTALES: CONTROL (A), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS SANOS (D), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS TUMORALES (G), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS NORMALES TRATADOS CON THC (B), CBD (E) Y THC+CBD (H), SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS TUMORALES TRATADOS CON THC (C), CBD (F) Y THC + CBD (I). ... 54

## ABREVIATURAS

2-AG	2-Araquinoglicerol
AND	Ácido Desoxirribonucleico
AEA	Anandamida O Araquidoniletanolamida
AMPc	Adenosín Monofosfato Cíclico
ARN	Ácido Ribonucleico
ASMA	Alfa Actina De Músculo Liso
ATP	Adenosín Trifosfato
BSA	Albúmina De Suero Bovino
CAF	Fibroblasto Asociado Al Cáncer
CBD	Cannabidiol
CB1	Receptor Cannabinoide Tipo 1
CB2	Receptor Cannabinoide Tipo 2
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
CPCP	Cáncer De Pulmón De Células Pequeñas
CPCNP	Cáncer De Pulmón De Células No Pequeñas
C-terminal	Carboxilo-Terminal
DAPI	4',6-Diamino-2-Phenylindole (4',6-Diamino-2-Fenilindol)
DMEM	Medio Eagle Modificado Por Dubelco
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos Trifosfato
E-cadherina	Cadherina Epitelial
EGF	Factor De Crecimiento Epidérmico
EGFR	Receptor Del Factor De Crecimiento Epidérmico.
FEN-1	Endonucleasa Flap-1
FGF	Factor De Crecimiento Fibroblástico
FSP-1	Proteína Específica De Fibroblastos 1
GAPDH	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa
HEPES	Ácido N-(2-Hidroxietil)Piperazina-N'-2-Etanosulfónico
HGF	Factor De Crecimiento Hepático
MA	Massachusetts
MEC	Matriz Extracelular
MMPs	Metaloproteinasas
MO	Missouri
N-cadherina	Cadherina Neural
PBS	Solución Tampón Fosfato Salina
PCR	Reacción En Cadena De La Polimerasa
PGGF	Factor De Crecimiento Derivado De Plaquetas
qPCR	Pcr A Tiempo Real
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Retrotranscripción Inversa
RT-PCR	Reacción En Cadena De La Polimerasa Con Retrotranscripción
Smad	Homólogos De Las Proteínas Mad
Snail 1	Zinc Finger Protein Snail1
Snail 2	Zinc Finger Protein Snail2
TEM	Transición Epitelio-Mesénquima
TGF $\alpha$	Factor De Crecimiento Transformante Alfa

TGF- $\beta$ 1	Factor De Crecimiento Transformante Beta 1
THC	$\Delta$ 9-Tetrahidrocannabinol
TME	Transición Mesénquima-Epitelial
VEGF	Factor De Crecimiento Endotelial Vascular
VEGF-R	Receptor Del Factor De Crecimiento Endotelial Vascular
VIM	Vimentina
ZEB1	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
ZEB2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2

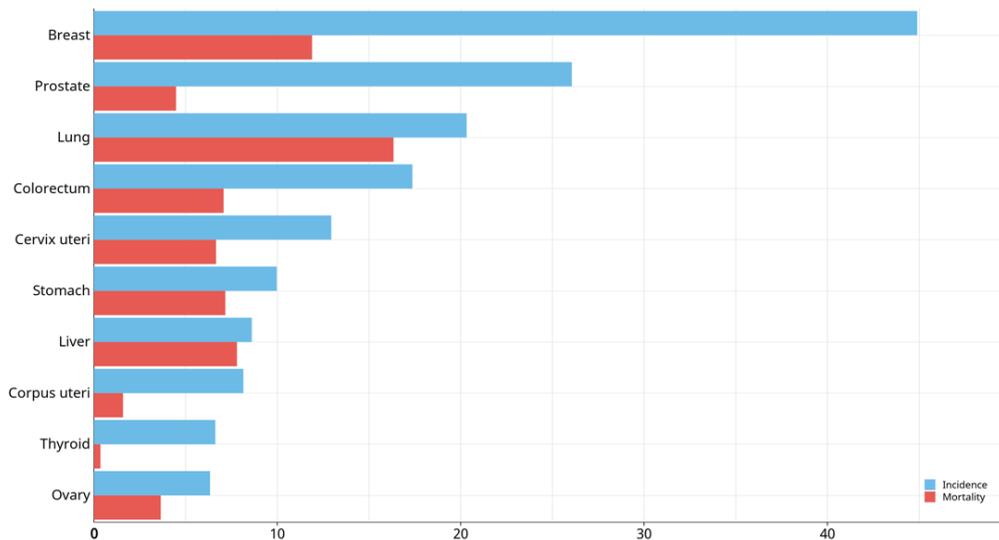


## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. El cáncer de pulmón.

El cáncer de pulmón continúa siendo la principal causa neoplásica de muerte en el mundo y una de las enfermedades de origen respiratorio que ocasionan mayor mortalidad (Figura 1), especialmente en los países desarrollados (National Cancer Institute, 2019). Buena parte de ello se debe a la falta de síntomas observables en estadios tempranos de la enfermedad, lo que conduce a un diagnóstico tardío y un cáncer en estado ya avanzado.

En la Figura 1 se puede observar la incidencia y mortalidad de los principales cánceres en el mundo en 2018. Es importante destacar que a pesar de que el cáncer de mama o de próstata tengan mayor incidencia su mortalidad es bastante menor en comparación a su misma incidencia y a la mortalidad del cáncer de pulmón (*Global Cancer Observatory, 2018*). Además, la mortalidad y la incidencia del cáncer de pulmón tienen valores similares lo que ratifica que sea la principal causa de muerte por enfermedad neoplásica.



**Figura 1.** Incidencia y mortalidad estandarizadas por edad de los principales cánceres del mundo en 2018. (Edades entre 0 y 79 años): el eje x muestra ratios estandarizados por edad cada 100.000 habitantes. Barras azules: incidencia del cáncer. Barras rojas: Mortalidad del cáncer. (*Global Cancer Observatory, 2018*)

En los últimos años se vienen registrando algunos cambios en ciertos rasgos epidemiológicos como la distribución por edad y sexo o las estirpes histológicas. Este cáncer viene siendo más común en hombres que en mujeres, teniendo una mayor incidencia en ellos. Estos últimos años esta diferencia se ha ido igualando debido a que uno de los mayores factores de riesgo, el tabaquismo, es similar en ambos sexos (Blandin Knight et al., 2017). En cuanto a la edad, es un cáncer que se detecta en personas mayores de 65 años siendo la edad media de detección de 70 años, aunque cada vez se detecta en personas más jóvenes (Centers for Disease Control and Prevention, 2020).

Un dato positivo es que el número de casos nuevos de cáncer de pulmón continúa bajando con los años debido a que cada vez el hábito de fumar es menor. Por consiguiente, el número de muertes también se reduce y, además, se detecta y trata antes.

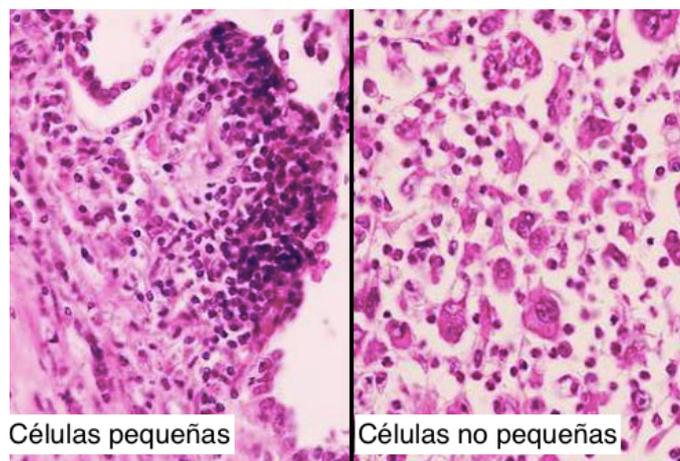
### 1.1.1. Clasificación.

Por lo general, los cánceres de pulmón se agrupan en dos tipos principales según su histopatología: de células pequeñas y de células no pequeñas, que principalmente hace referencia al tamaño de las células tumorales que los componen (Figura 2). Estos tipos de cáncer crecen de manera distinta y requieren distintos tratamientos. El cáncer de pulmón de células no pequeñas es más frecuente que el cáncer de células pequeñas.

Los casos de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) o no microcítico se pueden englobar en tres subtipos: adenocarcinomas (o no es escamosos), carcinomas escamosos (o epidermoides) y carcinomas de células grandes. Este último recoge a los cánceres de células no pequeñas que no se clasifican en ninguno de los dos anteriores. Estos cánceres se clasifican a su vez en cuatro estadios según su agresividad: los estadios I y II son tumores de diseminación local y que no afectan a ganglios fuera de los pulmones. El estadio III se da cuando el tumor se ha expandido a ganglios fuera del pulmón y en el estadio IV además se encuentra en expansión a otros lóbulos pulmonares u otras partes del cuerpo. En los estadios a su vez existen diferentes clases que dependen del tamaño del tumor, la afectación de los ganglios linfáticos y la metástasis en otros órganos. También existen otros subtipos de tumores que son mucho menos frecuentes como los carcinomas adenoescamosos y los carcinomas sarcomatoides. (AECC, 2020)

El cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) o microcítico es menos frecuente, pero resulta más agresivo y presenta una elevada y rápida capacidad de crecimiento. En este caso, únicamente existen dos estadios o fases: estadio limitado, cuando el cáncer no afecta a nódulos linfáticos y se encuentra en una única parte del tórax, y estadio diseminado, cuando se ha diseminado a otras partes del cuerpo. (AECC, 2020; Remon, J., 2019)

Además de los dos tipos mencionados anteriormente, existen otros tipos de cánceres de pulmón que no se recogen en los anteriores grupos. Los otros tipos de tumores como por ejemplo carcinoides y linfomas. (AECC, 2020)



**Figura 2.** Corte histológico de cáncer de células pequeñas y células no pequeñas [modificada de (Zijlstra, 2008)].

### 1.1.2. Sintomatología.

Los síntomas experimentados por las personas que padecen cáncer de pulmón pueden ser diferentes e incluyen tos, disnea, dolor en el pecho, cansancio o pérdida de peso entre otros. Es importante recalcar que estos síntomas no se suelen producir hasta que el cáncer está en un estado avanzado, ya que la mayoría de ellos crecen de manera lenta y tardan en provocar síntomas. Esto explica que dos de cada tres personas sean diagnosticadas cuando el cáncer está avanzado y se ha diseminado a otras partes del cuerpo.

Se debe tener en cuenta los casos en los que el cáncer ha producido metástasis en otras partes del cuerpo, puesto que los síntomas podrían ser otros según en donde se haya diseminado. Algunos de estos síntomas pueden ser: pérdida de apetito injustificado, fatiga, hinchamiento de cuello o cara, dolor en huesos o articulaciones, dolor de cabeza, pérdida de equilibrio o mareos, ictericia, coágulos sanguíneos y un largo etc. (Blandin Knight et al., 2017; Remon, J., 2019)

### 1.1.3. Tratamientos actuales.

Los tratamientos empleados para tratar el cáncer de pulmón dependen de cada paciente y del estadio del tumor en concreto. Los más utilizados son la cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia dirigida e inmunoterapia. Un comité multidisciplinar es quién decide qué estrategia seguir en cada paciente, para que esta se adapte lo mejor en cada situación.

A continuación, se exponen los tratamientos empleados según el tipo de cáncer, de células no pequeñas y de células pequeñas:

- **Células no pequeñas (CPCNP):** Para estos tipos de tumores las estrategias seguidas son todas las comentadas anteriormente y su posible combinación. Normalmente, la quimioterapia empleada en este tipo de cáncer incluye aquella que contiene: cisplatino o carboplatino combinados con etopósido, temozolomide y oxaliplatino. Según el estadio y los posibles lugares donde se haya diseminado la estrategia seguida es diferente. Con todo esto, los tumores se pueden clasificar como operables o no operables. En los operables se encuentran los tumores en estadios I, II y IIIa, en estos dos últimos se suele combinar con quimioterapia postoperatoria a base de cisplatino.

En estos estadios operables la quimioterapia también puede utilizarse de manera preoperatoria para reducir el tamaño del tumor. En el caso en el que el tumor en estadio III no pueda eliminarse con cirugía se recomiendan la administración concomitante de altas dosis de radioterapia y quimioterapia. En los no operables se encuentran los tumores en estadio IV, el principal tratamiento es la quimioterapia y la radioterapia se utiliza como tratamiento paliativo para los síntomas.

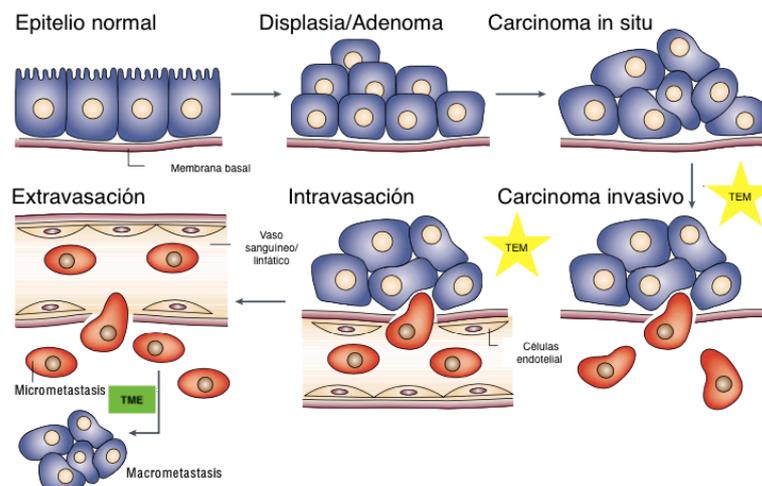
- **Células pequeñas (CPCP):** En el caso de los CPCP, la cirugía no suele ser una opción. Según la fase en la que se encuentre el tumor, el tratamiento es distinto. Por un lado, para aquellos tumores en fase limitada se opta por usar quimioterapia combinada con radioterapia, aunque si la detección es precoz la cirugía podría ser una opción. Por otro lado, en la fase expandida únicamente se trata con quimioterapia. En este caso, la quimioterapia se compone comúnmente de cisplatino y etopósido. Sin embargo, en muchos pacientes se produce la diseminación del tumor al cerebro, por lo que se aplica irradiación craneal profiláctica.

Es frecuente que la quimioterapia elegida sea aquella que contenga derivados del platino con los cuales quizás se alivien los síntomas y aumente la supervivencia cuando reciben docetaxel, pemetrexed o inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). (AECC, 2020; Blandin Knight et al., 2017; Centers for Disease Control and Prevention, 2020; Remon, J., 2019)

#### 1.1.4. Metástasis: malignidad y generación de resistencias.

Las células tumorales experimentan continuos cambios genéticos, lo que hace factible que migren. Para que estas al migrar puedan asentarse y crecer necesitan contar con un nicho premetastásico. Estos nichos son inducidos por factores producidos por el tumor primario. Dada la importancia de estos mecanismos se revisan las estrategias que desarrollan las células tumorales durante la progresión tumoral y la forma en que el microambiente tumoral influye en la formación de las metástasis, ya que estos determinan el grado de malignidad de los tumores.

La metástasis se define como “el proceso de diseminación de las células cancerosas desde su lugar de origen hasta un órgano distante”, siendo un proceso complejo, que comprende varias etapas como: la activación de la transición epitelio-mesénquima (TEM), la invasión local, la intravasación (las células tumorales atraviesan la pared de los vasos sanguíneos y entran en la circulación), la extravasación y el establecimiento de las células tumorales en los tejidos del órgano donde se va a formar la metástasis (Figura 3).



**Figura 3.** Etapas involucradas en la metástasis (modificada de (Thiery, 2002)).

En cuanto a la resistencia que desarrollan los tumores se han descubierto diversas vías por las cuales los tumores consiguen que los diferentes fármacos y tratamientos pierdan su efectividad. Aunque aún se desconocen los mecanismos exactos mediante los cuales las células tumorales desarrollan dicha resistencia permitiendo su supervivencia. Estas vías tienen en común la presencia de diversas mutaciones en los genes que se ha demostrado tener importancia en el desarrollo del cáncer. La quimioterapia es el tratamiento que más se utiliza en el cáncer de pulmón y, como se ha explicado en el apartado de los tratamientos, está compuesta la mayoría de las veces por cisplatino y el etopósido según el tipo de cáncer.

La endonucleasa flap-1 (FEN-1) tiene el papel de reparación del ADN y el mantenimiento de la estabilidad genómica. Se encuentra altamente expresado en células con un nivel de proliferación elevado, así como en ciertos cánceres, como el de pulmón. En las células cancerosas, sus niveles de expresión se correlacionan con la agresividad y estadio, y con la resistencia a cisplatino especialmente en el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

La ADN-polimerasa beta se encuentra implicada en la vía de reparación por escisión de base, BER, y su sobreexpresión condiciona resistencia al etopósido en el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

La vía de señalización Hedgehog tiene un papel clave en la proliferación celular, el crecimiento y la diferenciación de las células tumorales. También controla su capacidad migratoria y de formación de metástasis y, por tanto, la agresividad que las caracteriza. En la vía de señalización Hedgehog intervienen cuatro proteínas importantes: Patched, Smoothed (Smo), Hedgehog (Hh) y Gli. La sobreactivación de la vía de señalización Hedgehog condiciona un aumento de proliferación y resistencia al tratamiento con quimioterapia, radioterapia e inhibidores de EGFR.

La activación de la vía Shh (Sonic hedgehog), una de las vías de señalización Hedgehog, está estrechamente relacionada con la resistencia a cisplatino en el CPCNP. Además, la vía Shh se encuentra implicada en la TEM por lo cual las células que adquieren un fenotipo mesenquimal mediante la transición epitelio mesenquimal (TEM) obtienen también resistencia al cisplatino. (Almazán-Moga et al., 2017; Arvelo & Poupon, 2001; Valastyan & Weinberg, 2011; Yokota, 2000)

## **1.2. La transición epitelio-mesénquima (TEM).**

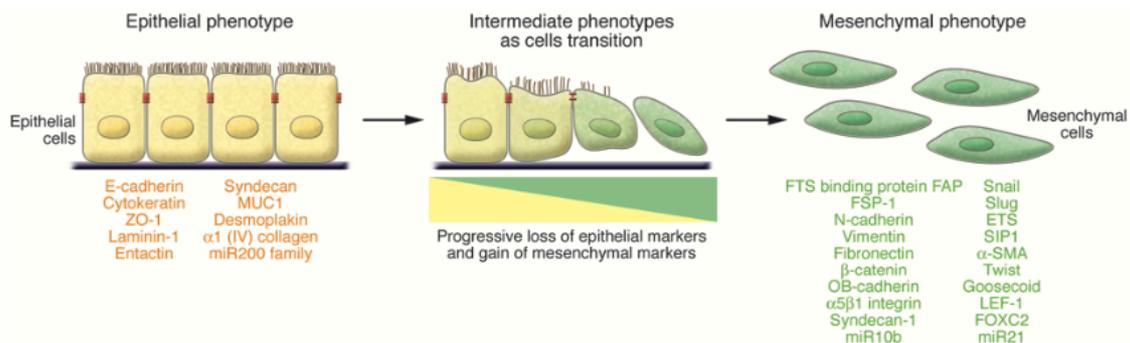
### **1.2.1. TEM y su implicación en el cáncer: marcadores y eventos celulares.**

Para que se produzca la diseminación del tumor a otro tejido sano se tienen que dar cambios profundos en la adhesión y en las propiedades proteolíticas y migratorias de las células tumorales, lo que favorece la disociación celular, la degradación de la matriz extracelular y la migración. La excesiva proliferación de las células epiteliales y la angiogénesis son los marcadores de la iniciación y crecimiento, lo cual se puede observar en un carcinoma primario.

Durante la progresión de un carcinoma, las células tumorales aún diferenciadas alteran su genoma, lo que le confiere a la célula una ventaja en el crecimiento. En etapas posteriores, las células continúan cambiando su genoma y exhiben un fenotipo no diferenciado acompañado frecuentemente de una baja expresión de marcadores epiteliales, lo que conlleva a una pérdida de uniones intercelulares y de polaridad epitelial. A menudo estos cambios van acompañados de un incremento de la expresión de marcadores mesenquimales, así como de la movilidad de las células, lo que le otorga mayor capacidad invasiva. Esta capacidad del tumor será determinante a la hora de clasificar el tumor según su agresividad y malignidad y, por tanto, influirá en la elección del tratamiento y su pronóstico.

El proceso mediante el cual las células cambian de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal es conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM). Este proceso se puede definir como un programa celular que permite la transición fenotípica de célula epitelial a mesenquimal (

Figura 4). En el cáncer de pulmón tiene un papel importante debido a su elevada tendencia a formar metástasis. (Almazán-Moga et al., 2017; Hay, 1995; Yokota, 2000)



**Figura 4.** Transición epitelio-mesénquima: genes involucrados en la transición fenotípica (Kalluri et al., 2009)

Un elevado número de vías y moléculas están involucradas en la iniciación y finalización de la TEM, destacando la activación de factores de transcripción, la expresión de proteínas específicas de superficie, la reorganización y expresión de proteínas del citoesqueleto, la producción de enzimas que degradan la matriz extracelular y los cambios en la expresión de microRNAs. Los *small non-coding RNA* o microRNAs actúan como reguladores de la TEM, inhibiendo la expresión génica a nivel post-transcripcional reduciendo la estabilidad de los mRNAs, que son su diana. Así pues, se da una pérdida de ciertas moléculas responsables del mantenimiento del fenotipo epitelial y la expresión de nuevas moléculas propias de las células mesenquimales.

Como se ha comentado anteriormente, un paso clave en la TEM es la reducción en la adhesión célula-célula, lo cual se consigue mediante la represión transcripcional de las cadherinas, componentes de las uniones adherentes, como de la ocludina y claudina componentes de las uniones estrechas a lo que se suman las desmoplaquinas componentes de los desmosomas. La inactivación de la transcripción de la E-cadherina en células mesenquimales indica la presencia de represores que silencian la expresión de esta proteína.

Los primeros represores identificados fueron los factores de transcripción con dominios zinc fingers, Snail 1 y Snail 2, y los factores de transcripción Zeb1 y Zeb2. Otros represores incluyen los factores de transcripción hélice-bucle-hélice básica E12/E47 (TCF3) y Twist. Estos represores inhiben la E-cadherina mediante el reclutamiento de algunos corepresores como, por ejemplo, en el caso de Twist, activando la expresión de otros represores de la E-cadherina. Por otra parte, la sobreexpresión de estos factores en las células epiteliales no solo produce la represión de la E-cadherina, sino también la reprogramación de la célula a un estado mesenquimal. La expresión de Snail 1 induce la expresión de fibronectina o de vitronectina. En el caso de Twist, induce la expresión de la quinasa Akt2, un efector de PI3K y un regulador importante en las vías de supervivencia durante la TEM.

La expresión de los filamentos intermedios cambia durante la TEM con la sustitución de la queratina por moléculas responsables de la remodelación del citoesqueleto propias del fenotipo mesenquimal: fibras de estrés de actina, vimentina, fibronectina, colágeno tipo 1, proteína específica de fibroblastos 1 (FSP-1) y alfa actina de músculo liso (ASMA). Las células experimentan cambios morfológicos por la síntesis de estas fibras que se organizan de diferentes modos para formar diferentes estructuras funcionales: filopodios, lamelipodios e invadopodios.

Los invadopodios son una red de actina con capacidad de síntesis de metaloproteinasas, estas aumentan durante la TEM participando en la pérdida de las uniones célula-célula y en la degradación de la membrana basal. En la red vascular influyen la migración de células tumorales, la liberación de citosinas y factores de crecimiento unidos a la membrana celular, como el factor de crecimiento transformante alfa ( $TGF\alpha$ ) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

Las MMP2 y MMP9 digieren el colágeno tipo IV directamente mientras que la MMP3 degrada los componentes de la membrana basal mediante la formación de especies reactivas de oxígeno. La degradación de la membrana basal activa el  $TGF-\beta$  almacenado de forma latente en la matriz extracelular. El  $TGF-\beta$  intensifica la TEM y estimula la expresión de nuevos componentes en la matriz extracelular, como colágeno tipo I y fibronectina. (Felibert et al., 2009; Stetler-Stevenson, 2008; Lim et al., 2013)

### **1.2.2. Rutas de señalización.**

Se han asociado un gran número de vías de señalización y factores de crecimiento con la TEM, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento hepático (HGF). La vía Wnt/ $\beta$ -catenina está relacionado con la TEM, siendo también el factor  $TGF-\beta$  otro inductor de la TEM, ya que las señales activadas por este factor inhiben algunas proteínas epiteliales, tales como la E-cadherina y queratina.

También activan la expresión de proteínas mesenquimales como la fibronectina y vimentina y en el caso de  $TGF-\beta$ , actúa en la activación de la TEM a través de las proteínas Smad. Aunque, la función de la  $TGF-\beta$  es mantener la homeostasis y la supresión de la actividad cancerígena modulando la invasión y crecimiento celular, las células cancerígenas poseen mutaciones que provocan alteraciones en su producción. La presencia de mutaciones o el cambio de las características de las células como consecuencia de la progresión del tumor, puede hacer que el  $TGF-\beta$  pierda su efecto y pase a actuar como un factor prooncogénico (Massagué, 2008).

Las proteínas Smad forman parte de la vía de señalización llevada a cabo por la familia de factores de crecimiento  $TGF-\beta$ . Los Smads forman una familia de factores de transcripción que activan e inhiben la transcripción de genes influyendo en aspectos clave como el desarrollo embrionario, crecimiento y división celular, la regeneración de tejidos y la respuesta inmunitaria. La proteína homeótica TGIF1 (TGIF1) es uno de los principales factores conocidos hasta ahora que inhibe a las proteínas Smad y, en caso de mutación, se relaciona con la progresión de tumores en varios tipos de cánceres.

Como se ha explicado en el apartado anterior las metaloproteinasas o MMPs participan en la TEM de diversas maneras. Las MMPs pertenecen a una familia de endopeptidasas zinc-dependientes que intervienen tanto en los procesos fisiológicos normales como en condiciones patológicas diversas, destacando el cáncer. Aunque la primera función bien estudiada de las metaloproteinasas es la degradación de la matriz extracelular (MEC), actualmente se considera que cumplen un papel importante en el procesamiento de moléculas bioactivas tales como factores de crecimiento, citosinas y quimosinas, así como en sus respectivos receptores. Las MMPs también actúan como moléculas de señalización y pueden modular a su vez otras moléculas de señalización celular.

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) produce aumento de la expresión de MMP-1, que actúa conjuntamente con TGF- $\beta$ , produciendo sobreexpresión de MMP-3 y TIMP-1. El EGF induce la expresión de MMP-1 y el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) más el FGF-2 son factores angiogénicos que pueden inducir la expresión de las proteasas MMPs, facilitando la diseminación metastásica.

Las MMPs pueden jugar distintos papeles durante la progresión del cáncer, dependiendo del estadio del tumor. En estadios tempranos, la proteólisis de las MMP-3 y 7, que unen factores de crecimiento, contribuyen a la proliferación celular, pero más adelante, la fragmentación de la E-cadherina y la CD44 activan la motilidad de las células tumorales facilitando la metástasis. (Felibert et al, 2009; Hua et al., 2011; Katsuno et al., 2013; Lindsey & Langhans, 2014; Parks et al., 2004; Rucci et al., 2011; Stetler-Stevenson, 2008; Yokota, 2000)

### **1.2.3. TEM como diana de los tratamientos antitumorales.**

Como se ha descrito, la TEM tiene un papel muy importante en la evolución del cáncer. Hoy en día hay un gran interés en los fármacos específicos contra nuevas dianas terapéuticas. El funcionamiento de estos fármacos se focaliza en proteínas de la membrana plasmática o del citoplasma que favorecen la progresión tumoral, a las que se unen o bloquean sin afectar al DNA nuclear. Estas moléculas han sido descritas en apartados anteriores junto a las vías de señalización implicadas en el TEM y el proceso de metástasis de las células tumorales. Sería interesante que estos fármacos específicos actuaran sobre ellos y así controlar tanto los compuestos como las vías que favorecen a la potenciación del poder cancerígeno.

La búsqueda de nuevas terapias se basa en que muchas células tumorales, cuando ocurre la TEM, muestran resistencia a tratamientos como la quimioterapia, el más utilizado para tratar el cáncer de pulmón. Es por ello, que la TEM se está considerando como una nueva diana terapéutica. (Nisticò, 2012; Thiery, 2002)

### **1.3. El microambiente tumoral.**

El microambiente tumoral es el entorno celular en el que se desarrolla el tumor en el organismo. Está compuesto por vasos sanguíneos, fibroblastos, células que contribuyen a la inmunidad, células inflamatorias derivadas de la médula ósea, linfocitos, compuestos involucrados en diversas rutas de señalización y la matriz extracelular. Todos estos elementos interactúan con el tumor y hacen que sea capaz de crecer o migrar a otras partes del cuerpo, lo que le hace ser dependiente del microambiente.

La comunicación entre las células normales y las tumorales forman el microambiente tumoral (Naranjo et al., 2009; Wang et al., 2018).

### **1.3.1. Matriz extracelular.**

La matriz extracelular (MEC) es un conjunto de diferentes macromoléculas y compuestos solubles que tiene diferentes funciones de protección, nutrición e inervación celular y el terreno para la respuesta inmune, angiogénesis, fibrosis y regeneración tisular.

La alteración de la MEC supone la pérdida de su función de filtro eficaz, nutrición, eliminación, denervación celular, pérdida de la capacidad de regeneración y cicatrización y alteración de la transmisión mecánica o mecanotransducción. También la pérdida del sustrato para una correcta respuesta inmune ante agentes infecciosos, tumorales y tóxicos.

Los tumores son tejidos funcionales conectados y dependientes del microambiente. El microambiente tumoral, constituido por la MEC, células del estroma y la propia respuesta inmune, son determinantes de la morfología y clasificación tumoral, agresividad clínica, pronóstico y respuesta al tratamiento del tumor. La capacidad oncogénica del estroma procede tanto de los fibroblastos asociados al tumor como de la respuesta inmune y la alteración de la tensesidad de la MEC (Bremnes et al., 2011).

El tumor existente interactúa con el entorno, lo que conduce a diferentes efectos. El tumor puede interactuar con el microambiente al liberar señales extracelulares, puede promover la angiogénesis tumoral e inducir tolerancia a la inmunidad periférica. Las células inmunes en el microambiente también pueden afectar el crecimiento y la evolución del cáncer. Los microambientes tumorales son reconocidos como factores clave que contribuyen al estudio de la progresión del cáncer y la resistencia a los medicamentos para el tratamiento del cáncer.

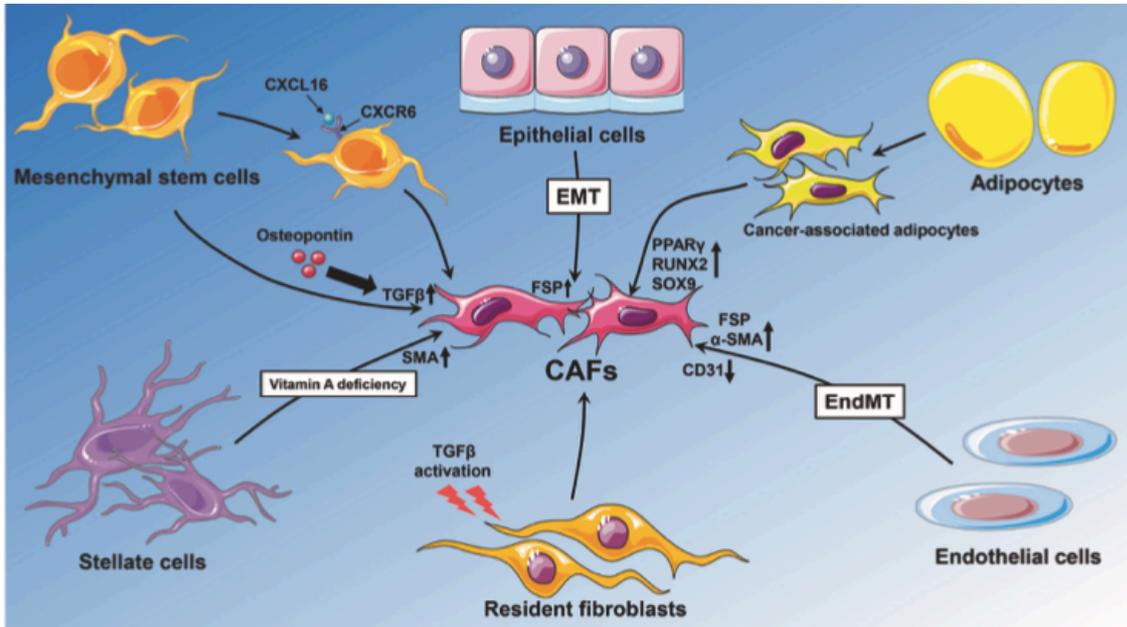
### **1.3.2. Fibroblastos asociados al cáncer.**

Los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) son un grupo de fibroblastos que se definen morfológicamente como células en forma de huso y con citoplasma elongado que se encuentran en el estroma del cáncer (Strutz, 1995) y hacen de soporte a las células cancerígenas. Estos fibroblastos son altamente numerosos en el microambiente tumoral, siendo muy distintos de los fibroblastos normales.

El origen de ambos tipos de fibroblastos es diferente. Los fibroblastos normales provienen del mesénquima primitivo, mientras que los CAFs se derivan de fibroblastos residentes, células precursoras mesenquimales derivadas de la médula ósea (Karnoub et al., 2007), células endoteliales y epiteliales (Cirri & Chiarugi, 2011) y de células del músculo liso, algunas de las cuales son estimuladas por citoquinas, como el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF $\beta$ ).

Estos dos tipos de fibroblastos (Figura 5) además de diferenciarse por su forma o su procedencia también se diferencian por sus marcadores. En el caso de los fibroblastos normales, algunos de los marcadores descritos hasta el momento son: ASMA o  $\alpha$ -SMA, isoforma de la actina que predomina en las células del músculo liso vascular y desempeña un papel importante en la fibrogénesis, la proteína de activación de los fibroblastos (FAP), que se expresa en la superficie de los fibroblastos (Ramirez-Montagut et al., 2004), FSP1, que se

considera una proteína asociada a los filamentos intermedios y la vimentina, una proteína asociada a filamentos intermedios, que es sintetizada por los fibroblastos y participa en numerosos procesos celulares con funciones relacionadas con la señalización, la migración y la invasión (Cheng et al., 2016). En el caso de los CAFs los marcadores son el  $\alpha$ -SMA, FSP-1 o la Tenascina-C (TNC), una proteína de la MEC que se ha descrito en tumores y modula la señalización celular (Bu et al., 2019).



*Figura 5. Los diferentes orígenes celulares de las CAFs (Bu et al., 2019).*

Los CAFs tienen un papel importante en la TEM como se ha descrito. Debido a esto en el microambiente tumoral existe una gran abundancia de marcadores mesenquimales, como FSP-1 y  $\alpha$ -SMA (Zeisberg et al., 2007).

Además, se ha demostrado que este tipo de células ayudan al crecimiento de las células tumorales, ya que secretan diversos factores y desarrollan diferentes funciones que apoyan al crecimiento de las mismas. Entre los factores conocidos secretados por los CAFs se encuentran: el VEGF, el FGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y junto a un conjunto de señales proangiogénicas inducen a que los CAFs secreten un factor de crecimiento transformante beta ( $TGF-\beta$ ) asociado con la TEM. Es por ello, que la interacción entre los CAFs y las células tumorales se han convertido en un objetivo de los estudios de nuevos tratamientos terapéuticos. Aunque aún queda conocer con más claridad cómo se dan estas interacciones (Liu et al., 2019).

### **1.3.3. Estrategias para reproducir el microambiente tumoral.**

Como se ha comentado anteriormente es de gran interés poder reproducir este microambiente para así ser capaces de estudiar los procesos involucrados en el cáncer. Existen diferentes estrategias con las que poder reproducirlo y que estas se adapten lo mejor posible a las necesidades de los estudios en concreto. Entre las estrategias que se emplean cabe

destacar las siguientes: cocultivos, *scaffolds* (andamiajes), hidrogeles y biorreactores. A continuación, se va a describir brevemente en que consiste cada uno de ellos.

- **Cocultivos:** mezcla de dos o más clases diferentes de células que se hacen crecer juntas. En este caso sería interesante el cocultivo de células tumorales junto a CAFs para estudiar la interacción entre ellas.
- **Scaffolds:** son estructuras formadas a partir de un biomaterial que busca reproducir la morfología de los tejidos o ambientes en donde crecen las células. La reproducción del microambiente utilizando el biomaterial adecuado haría que un estudio pudiera ser más realista, ya que las células crecerían en un entorno similar al suyo en el cuerpo.
- **Hidrogeles:** son compuestos a base de polímeros que poseen unas características particulares. Son hidrófilos, es decir afines al agua, así como blandos, elásticos y en presencia de agua se hinchan, aumentando considerablemente su volumen, pero manteniendo su forma hasta alcanzar un equilibrio fisicoquímico, mientras que en estado deshidratado (xerogel) son cristalinos (Medina, 2019).
- **Biorreactores:** son equipos formados por recipientes donde se mantiene un ambiente biológicamente activo. El biorreactor es un sistema empleado para hacer crecer células o tejidos en cultivos celulares, puesto que permiten su cultivo durante períodos de tiempo prolongados. Estos dispositivos se encuentran en desarrollo para su uso en ingeniería de tejidos. El uso de este tipo de equipos permitiría el estudio de diversos microambientes de interés durante largos periodos y así conocer mejor el comportamiento de los diferentes componentes que lo forman.

#### 1.4. El sistema endocannabinoide.

##### 1.4.1. Componentes del sistema endocannabinoide.

El sistema endocannabinoide lo forman los receptores CB y sus ligandos endógenos cannabinoides (endocannabinoides) derivados de los ácidos grasos, los principales son la anandamida (AEA) y el 2-araquinoglicerol (2-AG). Los receptores CB son sitios específicos de acople para los cannabinoides en la superficie de muchos tipos de células (

Figura 6). Principalmente existen dos tipos de receptores CB, receptores tipo uno (CB1) y receptores tipo dos (CB2), ambos pertenecen a la extensa familia de receptores acoplados a una proteína G (*G-protein-coupled receptors*, GPCR).

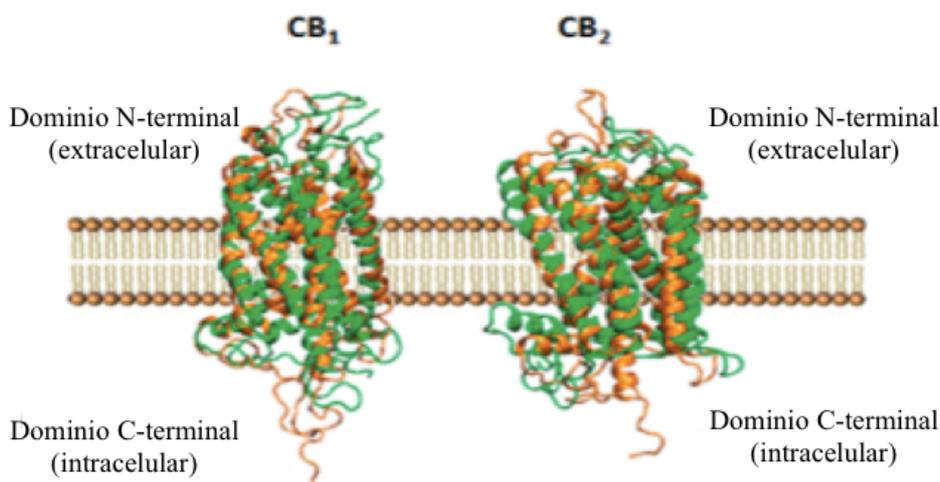
Los receptores cannabinoides, CB1 y CB2, se diferencian en el modo de transmitir la señal, sus mecanismos de transducción de la señal son diferentes, y también, difiere su distribución en los tejidos del cuerpo. La activación de los receptores cannabinoides da lugar a una inhibición de la adenilciclasa, lo que impide la conversión del ATP a AMP cíclico (AMPc). También se han observado otros, como por ejemplo la interacción con ciertos canales de iones.

Los receptores CB1, se encuentran principalmente en las neuronas del cerebro, la médula espinal y el sistema nervioso periférico, aunque también están presentes en ciertos órganos y tejidos periféricos, como glándulas endocrinas, glándulas salivales, leucocitos, bazo, corazón y en determinadas zonas de los aparatos reproductor, urinario y gastrointestinal. Hay muchos

receptores CB1 en las terminaciones de los nervios, tanto centrales como periféricos, e inhiben la liberación de otros neurotransmisores. Los receptores CB1 se hallan en abundancia en las regiones del cerebro responsables del movimiento (ganglios basales y cerebelo), del procesamiento de la memoria (hipocampo y corteza cerebral), del apetito y de la modulación del dolor (ciertas partes de la médula espinal).

Los receptores CB2 se encuentran principalmente en las células inmunitarias, entre ellas los leucocitos, el bazo y las amígdalas. Una de las funciones de los receptores CB en el sistema inmunitario es la modulación de la liberación de las citoquinas, responsables de la inflamación y la regulación del sistema inmunológico. También se encuentran en células hepáticas, endoteliales y en las fibras musculares lisas de los vasos sanguíneos. Puesto que los compuestos que activan selectivamente los receptores CB2 (los agonistas de los receptores CB2) no causan efectos psicológicos, se está convertido cada vez más en blanco de la investigación de las aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides, como por ejemplo como analgésico, antiinflamatorio y antineoplásico.

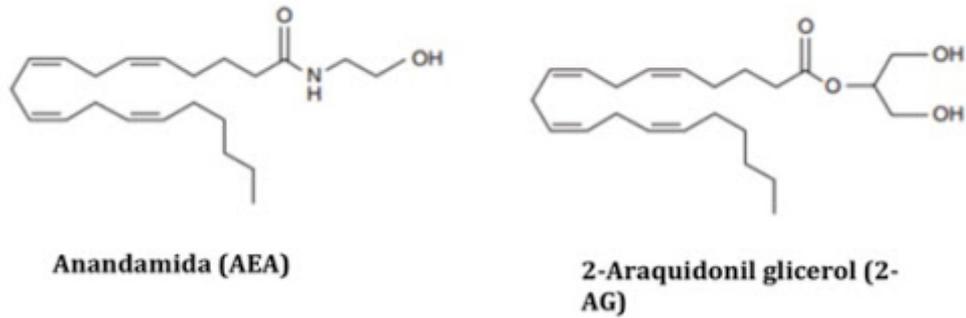
Estudios recientes han demostrado que existen otros tipos de receptores relacionados con el sistema endocannabinoide como son por ejemplo los receptores metabotrópicos GPR55, GPR119, GPR18 y los receptores vaniloides de potencial transitorio (TRPV).



**Figura 6.** Representación de los receptores CB1 y CB2 en la membrana celular (Suárez et al., 2014).

Los cannabinoides que se pueden acoplar a los receptores CB son de varios tipos según su naturaleza, pueden ser: endocannabinoides si son producidos por el cuerpo, fitocannabinoides si provienen de la planta de cannabis y cannabinoides sintéticos:

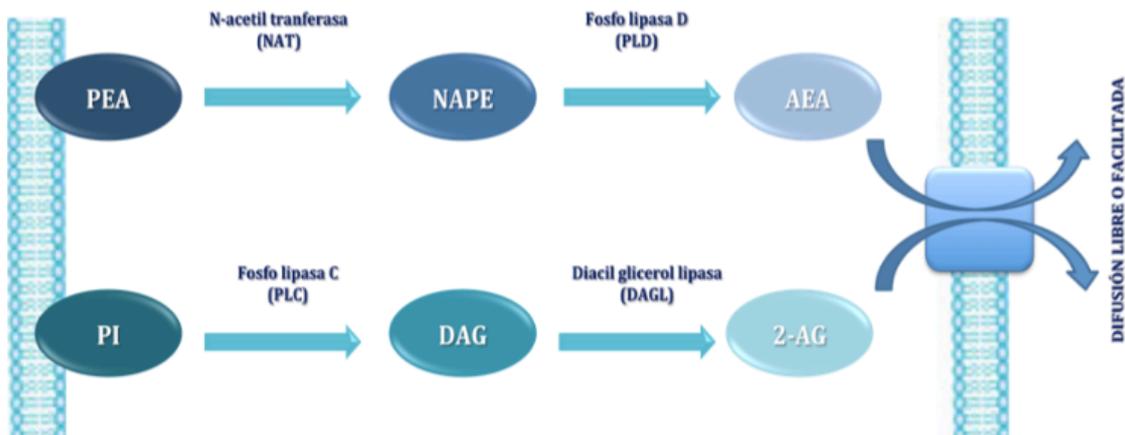
-Endocannabinoides: Como se ha dicho anteriormente, los endocannabinoides son unos compuestos endógenos, es decir, son producidos por el propio organismo que junto con los receptores CB forman el sistema endocannabinoide. Los cannabinoides endógenos más estudiados son la AEA y la 2-AG (Figura 7).



**Figura 7.** Representación de la estructura química de la AEA y 2-AG (Suárez et al., 2014).

De naturaleza lipídica, son derivados del ácido araquidónico. Se sintetizan bajo demanda a partir de precursores fosfolipídicos cuya actividad depende de la activación de fosfolipasas específicas. En la síntesis del AEA intervienen los enzimas la N-acetiltransferasa (NAT) y N-araquidoniletanolamina fosfolipasa D (PLD) y en su degradación la hidrolasa amida de ácidos grasos (FAAH), mientras que el 2-AG se sintetiza mediante fosfolipasa C (PLC) y la diacilglicerol lipasa (DAGL) y su degradación la lleva a cabo la monoacilglicerol lipasa (MAGL).

En la Figura 8 se muestran las rutas de síntesis de la AEA y 2-AG. La AEA se sintetiza a partir de la fostatidiletanolamina (PEA), fosfolípido residente en la membrana, que mediante la acción de la N-acetiltransferasa (NAT) da lugar a la N-acil-fostatidiletanolamina (NAPE). Finalmente, la fosfolipasa D hidroliza la NAPE dando lugar a la AEA. En el caso de la 2-AG, se sintetiza a partir de fosfatidil inositol (PI) que por la acción de la fosfolipasa C (PLC) da lugar al diacilglicerol (DAG), y este tras ser hidrolizado por la diacilglicerollipasa (DAGL) da lugar a la 2-AG.



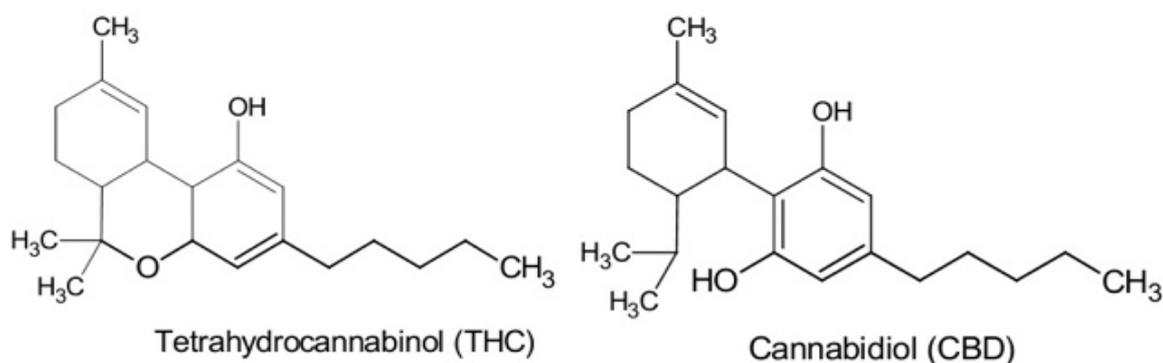
**Figura 8.** Ruta de formación del AEA y 2-AG (Suárez et al., 2014).

**-Fitocannabinoides:**

Los fitocannabinoides son sustancias exógenas procedentes de la planta del cannabis (*cannabis sativa*) que al igual que los endocannabinoides actúan sobre los receptores cannabinoides CB, aunque estos producen mayores efectos que los endocannabinoides. Se conocen más de 28 fitocannabinoides, siendo los más conocidos el tetrahidrocanabinol (THC), el canabidiol (CBD) o el canabigerol (CBG) (Figura 9).

El THC, es el cannabinoide farmacológicamente más activo de la planta de cannabis, se acopla a ambos tipos de receptores cannabinoide, CB1 y CB2. Dependiendo del tipo de célula, la dosis y la situación del cuerpo, la activación de los receptores CB da lugar a múltiples efectos entre los que se encuentra euforia, ansiedad, sequedad de boca, relajación muscular, hambre y reducción del dolor. La mayoría de los efectos del THC están mediados por sus acciones como agonista sobre los receptores cannabinoide del cuerpo, tanto en humanos como en animales. La acción agonista significa que los receptores se activan y, por lo contrario, la antagonista es cuando se produce el bloqueo de los efectos de estos.

Por otro lado, el CBD, es un fitocannabinoide no-psicoactivo tiene propiedades antiinflamatorias, analgésicas, ansiolíticas y antipsicóticas.



*Figura 9. Representación de la estructura química del THC y CBD (HempMeds, 2019).*

-Cannabinoide sintéticos:

Algunos cannabinoide exógenos son producidos de manera artificial en laboratorios, estos son los llamados cannabinoide sintéticos. Algunos de estos son el JWH133 o el SR171416. Entre ellos varía su composición y, por tanto, su afinidad por los receptores CB y sus efectos en el cuerpo. Se han desarrollado cannabinoide sintéticos que actúan como agonistas o antagonistas selectivos a uno u otro receptor.

El grado de afinidad por los receptores CB1 y CB2 es distinto en función del tipo del cannabinoide. El THC tiene aproximadamente igual afinidad tanto para el receptor CB1 como para el CB2, mientras que la anandamida tiene muy poca selectividad para los CB1. Sin embargo, la eficacia del THC y de la anandamida es menor en los receptores CB2 que en los CB1.

Además de la activación de los receptores CB, se investiga otras formas de manipulación del sistema cannabinoide con fines terapéuticos, como es el bloqueo de los receptores CB (o antagonismo) y la modulación de la concentración de endocannabinoide mediante la inhibición de su degradación. (Battista et al., 2012; Fundación CANNA, 2020; Grotenhermen, 2006; IACM, 2020; Katona & Freund, 2012; Marzo & Petrocellis, 2006).

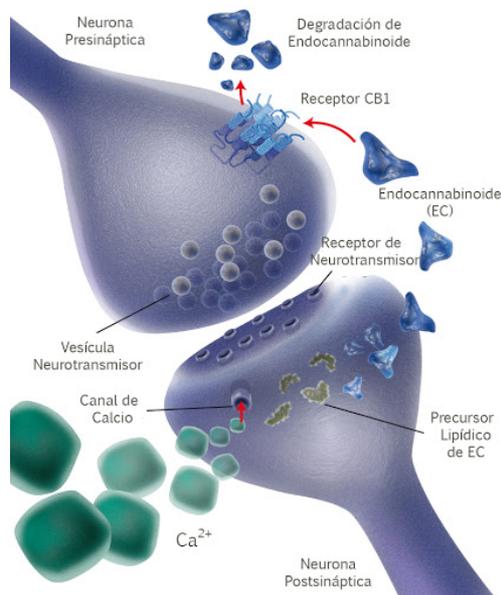
#### **1.4.2. Mecanismo de acción.**

A nivel sináptico, el efecto del sistema endocannabinoide es la neuromodulación. Los neurotransmisores (NTs) sintetizados por las neuronas presinápticas son liberados por las

mismas y estimulan los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de la neurona postsináptica produciendo un aumento en la concentración de calcio en su citoplasma. Este aumento de concentración activa el sistema enzimático endocannabinoide, que a partir del ácido araquidónico de la membrana celular sintetizará los endocannabinoides. Éstos serán liberados al espacio donde actuarán sobre sus receptores específicos, CB1 y CB2, en la neurona presináptica. Su activación produce el bloqueo de los canales de calcio y la estimulación de los canales de potasio, causando la repolarización de la membrana presináptica y el cese de la liberación de neurotransmisores (Figura 10).

Los fitocannabinoides y otros cannabinoides exógenos tienen la capacidad de activar estos receptores en un rango de condiciones de estrés, produciendo un efecto mayor, que trasciende la neuromodulación. Los efectos del sistema endocannabinoide dependen del receptor activado. Como se ha explicado en el apartado *1.4.1 Componentes del sistema endocannabinoide*, el THC es un agonista de ambos receptores y tiene efectos analgésicos, relajantes musculares, antieméticos y orexinérgicos. Sin embargo, sus efectos psicotrópicos limitan su uso en la clínica habitual. El CBD es un agonista que posee mayor afinidad por el receptor CB2 que por el CB1 con efectos antiinflamatorios, anticomiciales, neuroprotectores y antipsicóticos.

En combinación el THC y el CBD presentan sinergia, ya que el CBD potencia los efectos del THC mientras que inhibe sus efectos psicotrópicos, siendo esto una gran ventaja para su aplicación clínica. La función moduladora puede extenderse al sistema nervioso periférico y a las regiones extraneurales, controlando así el dolor periférico, el tono vascular, la presión intraocular y también la función inmunológica, de un modo que parece reducir la inflamación y ciertos tipos de dolor.



**Figura 10.** Mecanismo de acción del sistema endocannabinoide (*Cannabis Consciente, n.d.*).

Así, el sistema endocannabinoide se encuentra alterado en desórdenes o condiciones fisiopatológicas como la esclerosis múltiple y la lesión medular, la arterioesclerosis, la osteoporosis, el infarto de miocardio, la hipertensión arterial sistémica, la obesidad/los síndromes metabólicos y el cáncer. Por este motivo es tanto el interés que surge por la

búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas enfocadas a recobrar la funcionalidad normal del sistema endocannabinoide.

#### **1.4.3. Papel de los agonistas cannabinoides en las terapias contra el cáncer de pulmón.**

Los cambios en el metabolismo de los lípidos están íntimamente relacionados con el cáncer. Varias clases de lípidos bioactivos juegan un papel en la regulación de las vías de señalización implicadas en la transformación neoplásica y el crecimiento y progresión de los tumores. El sistema endocannabinoide, que como se ha comentado anteriormente son derivados de los lípidos, por su implicación en múltiples funciones fisiológicas básicas del organismo los convierte en prometedores candidatos para el tratamiento de numerosas patologías, destacando las enfermedades neurodegenerativas, trastornos metabólicos, diabetes y cáncer.

Los cannabinoides se están empleando satisfactoriamente en el tratamiento de los efectos adversos asociados al cáncer y a los tratamientos antitumorales tales como náuseas, vómitos, falta de apetito, pérdida de peso y dolor. El dronabinol (THC sintético) y la nabilona están comercializados para combatir y prevenir las náuseas y vómitos asociados a quimioterapia y radioterapia. Pero, con independencia de este uso paliativo en la terapia anticancerosa, algunos agonistas cannabinoides como el THC y el CBD han demostrado tener un efecto antitumoral al inhibir el crecimiento descontrolado de las células tumorales (por inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación celular) e impedir la angiogénesis y metástasis tumoral disminuyendo e inhibiendo la adhesión e invasión de las células tumorales. Estos efectos se han observado en muchos tipos de cáncer como pulmón, mama, próstata, colón, hígado, piel, glioblastomas, leucemias y linfomas. Además, estudios recientes confirman la capacidad antitumoral del THC y CBD en el CPCNP, ya que la TEM se ve afectada por los mismos y se expresan los receptores CB1 y CB2 en este tipo de células. Estos indicios abren las puertas al estudio de estos compuestos como tratamiento complementario a los que actualmente existen (Milián et al., 2020).

En cuanto a los mecanismos responsables de la acción antitumoral no están del todo esclarecidos, aunque parecen implicados tanto receptores específicos para cannabinoides (CB1 y CB2) como receptores independientes como el receptor TPRV<sub>1</sub>. Cabe destacar que el efecto inhibitorio de los agonistas cannabinoides sobre la proliferación celular tumoral se suele relacionar con una disminución de la expresión de los receptores oncogénicos tirosina-quinasa (TKR), proteínas quinasa, y la fosforilación [por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), receptor del factor de crecimiento nervioso (ErbB-2), prolactina y receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-R)] e inhibición de la señalización de la vía PI3K-Akt.

Por otro lado, en algunos estudios realizados con THC se ha observado un efecto bimodal sobre las células tumorales, de manera que a baja concentración incrementa la proliferación tumoral y a concentraciones más elevadas la inhibe. Este efecto positivo sobre la proliferación celular parece deberse a la activación de receptores CB2 que disminuiría la respuesta inmunitaria frente al tumor favoreciendo su crecimiento. Por lo tanto, aunque por ahora los resultados son prometedores, son todavía muchos los estudios necesarios para definir con

claridad el uso de los cannabinoides en el tratamiento del cáncer. (Alexander et al., 2009; Brown et al., 2013; Pisanti et al., 2013; Suárez et al., 2014).

### **1.5. Necesidad de nuevas terapias.**

Uno de los grandes motivos de la búsqueda imparable de nuevos tratamientos es aumentar la esperanza de vida de las personas que padecen de cáncer de pulmón puesto que el tumor desarrolla una alta resistencia a los tratamientos. La mortalidad del cáncer de pulmón a los 5 años es muy elevada, por ello es la principal causa de muerte neoplásica a nivel mundial. Con todo lo explicado anteriormente se busca poder utilizar los cannabinoides junto a las terapias actuales como tratamiento para combatir el cáncer, en concreto, el cáncer de pulmón. El uso de esta nueva combinación de tratamientos podría disminuir la mortalidad, puesto que se esquivaría la resistencia que este genera.

El tratamiento que se busca, basado en cannabinoides, junto a las terapias actuales resultan muy atractivos en comparación con los utilizados hasta ahora. Esto es porque hasta el momento los cannabinoides como medicamento no han mostrado efectos secundarios negativos como los que tienen la quimioterapia o la radioterapia. De hecho, tienen efectos secundarios que mejoran y hacen más llevadera la enfermedad. El simple hecho de combinar alguno de los tratamientos actuales con cannabinoides podría mejorar desde la calidad de vida hasta la supervivencia de las personas que la padecen, por ejemplo, ya sea por la reducción de las dosis o sesiones de quimioterapia o por la mejora de los síntomas de esta.

Para poder dar con la mejor combinación de los cannabinoides y antes de llevar a cabo ensayos clínicos en humanos es de gran importancia realizar diferentes ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* con los que se establecen buenos modelos para garantizar la seguridad del tratamiento. Como se ha comentado anteriormente existen diversas estrategias o modelos aplicables al estudio de los cannabinoides en el cáncer de pulmón ya sea con estudios de proliferación y biología molecular, como en este trabajo, o con *scaffolds* y biorreactores.

Por último, es muy importante recalcar que los efectos “buenos” que se buscan con el uso de cannabinoides ocurren cuando se utilizan como medicamentos, ya que fumar marihuana (obtenida de la planta *Cannabis sativa*) está demostrado que produce cáncer de pulmón y otros efectos nocivos para la salud (Blandin Knight et al., 2017).



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Justificación del trabajo.**

Este trabajo es el inicio de un proyecto mayor que busca generar un sistema de cultivo *in vitro* capaz de reproducir la complejidad del microambiente tumoral del cáncer de pulmón con la idea de optimizar modelo experimental para ensayar fármacos antitumorales. Supone una primera aproximación en la interrelación de dos de los tipos celulares clave en dicho microambiente como son las propias células cancerígenas y las células estromales relacionadas con las mismas (fibroblastos y fibroblastos asociados a cáncer).

El papel del ingeniero biomédico en estos proyectos es de gran ayuda, ya que es un buen perfil que posee conocimientos sobre distintas disciplinas como biología, química, genética, ingeniería tisular o ciencia de los materiales. Conocer las diferentes disciplinas citadas antes hace que se puedan utilizar técnicas de modelización y/o fabricación de materiales con capacidad para reproducir el microambiente, fundamental para el desarrollo de sistemas de estudio más realistas y precisos que los existentes en la actualidad.

### **2.2. Hipótesis del estudio.**

La hipótesis alrededor de la cual se desarrolló este trabajo fue que los agonistas cannabinoides tienen un poder antiproliferativo sobre las células cancerígenas/tumorales, y que es posible evaluar *in vitro* su efecto con modelos sistemáticos de cultivo celular. Esta hipótesis se confirmó con estudios previos del grupo de investigación relacionados con las células tumorales y los agonistas cannabinoides.

### **2.3. Objetivo.**

El objetivo que se planteó fue confirmar la influencia de los agonistas cannabinoides junto al TGF- $\beta$ 1 sobre la proliferación y comportamiento de los CAFs y, por consiguiente, como cambia la interacción entre los CAFs tratados con los cannabinoides y las células epiteliales tumorales de cáncer de pulmón.

Se planteó este objetivo, ya que existen evidencias realizadas *in vitro* que demuestran el papel de los agonistas de cannabinoides como inhibidores de la proliferación y de la TEM. Es fundamental tener en cuenta que estos estudios tienen ciertas limitaciones relacionadas con los modelos *in vitro* utilizados, ya que se basan en el efecto de factores bioquímicos como el TGF- $\beta$ 1 sobre líneas celulares de cáncer cultivadas en entornos bidimensionales.

Ahora bien, a fin de determinar el papel potencial de dichos fármacos como inhibidores de la proliferación y diseminación tumoral, es necesario ensayarlos en modelos más parecidos al microambiente tumoral que incluyan otros elementos como los CAFs. En este trabajo se planteó analizar el papel de dos de estos agonistas de cannabinoides, el THC y el CBD, junto con el TGF- $\beta$ 1 utilizando dos de los elementos clave del microambiente tumoral como son las propias células cancerígenas y los fibroblastos estromales (normales y los CAFs).

Para lograr este objetivo se plantearon varios sub-objetivos en relación al desarrollo del trabajo y su viabilidad:

- 1- Plantear un diseño de experimentos *in vitro* para estudiar el efecto de los agonistas cannabinoides junto al TGF- $\beta$ 1 sobre la proliferación de fibroblastos y CAFs que rodean a los tumores y los nutren ayudándoles a crecer.
- 2- Ampliar el diseño de experimentos *in vitro* para evaluar el papel del TGF- $\beta$ 1 y el efecto de los CAFs tratados con los cannabinoides sobre las células tumorales, como elementos inductores de la TEM.
- 3- Cuantificar y evaluar la viabilidad técnica, en cuanto a su escalado, y el coste total del estudio.
- 4- Establecer las directrices acerca de los siguientes modelos experimentales que serían necesarios para incrementar las evidencias en favor de la hipótesis del estudio en que se encuentra circunscrito este trabajo

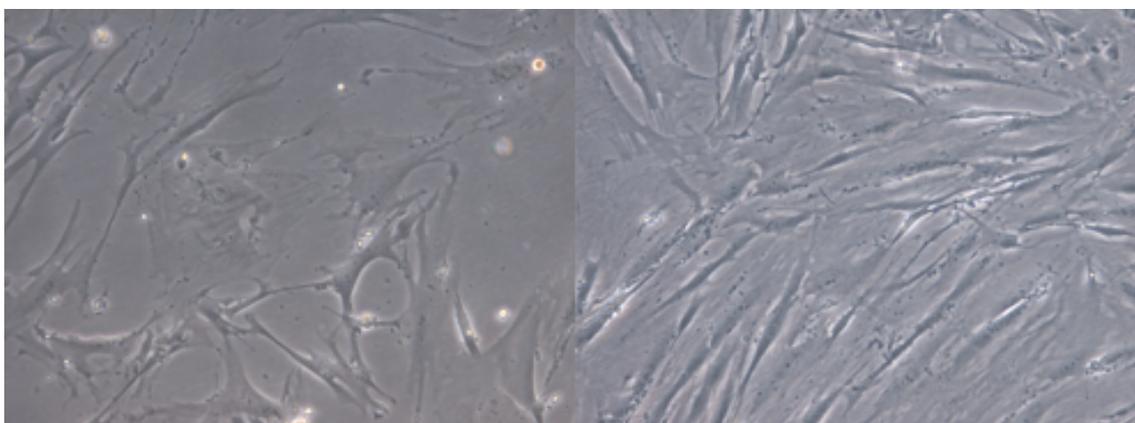
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

A continuación, se van a exponer los diferentes materiales y métodos seguidos para la realización de este proyecto.

#### 3.1. Fuentes celulares y medios de cultivo.

Para el desarrollo de los diferentes ensayos se utilizaron dos tipos de celulares: fibroblastos y células epiteliales. Se eligieron estos dos tipos de células por ser componentes fundamentales del modelo del microambiente tumoral que se quiere reproducir.

Por un lado, en cuanto a los fibroblastos provinieron de un paciente con cáncer de pulmón denominado paciente 12. Se estudiaron tanto fibroblastos tumorales (CAFs), los que rodean al tumor, como fibroblastos sanos, los que se encuentran en el tejido sano más o menos cercano al tumor (Figura 11).



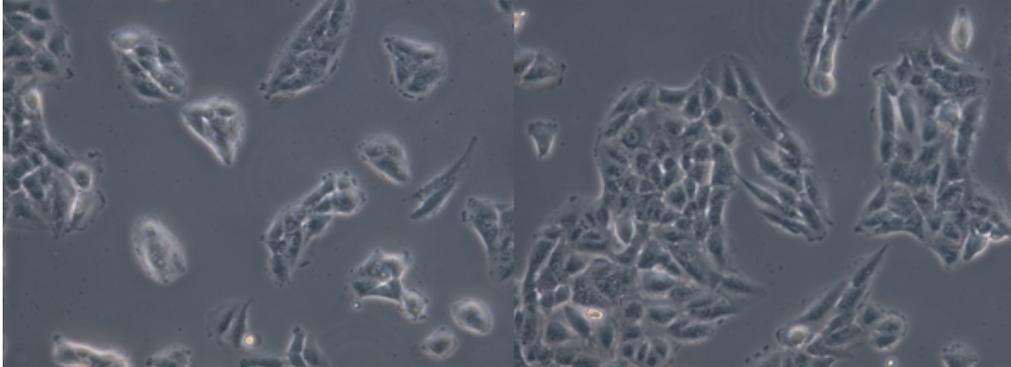
**Figura 11.** Imágenes de fibroblastos sanos (izquierda) y tumorales (derecha) del paciente 12 obtenidas con un aumento de 10x.

Por otro lado, en cuanto a las células epiteliales se utilizaron tres líneas celulares de cáncer de pulmón: A549, H460 y H1792. Se eligieron tres líneas tumorales diferentes, puesto que cada una representa un estadio diferente de cáncer de pulmón y así poder ver cómo afectan los tratamientos en los diferentes estadios. Además, se seleccionaron tres de cara a que los resultados obtenidos tuvieran significancia estadística.

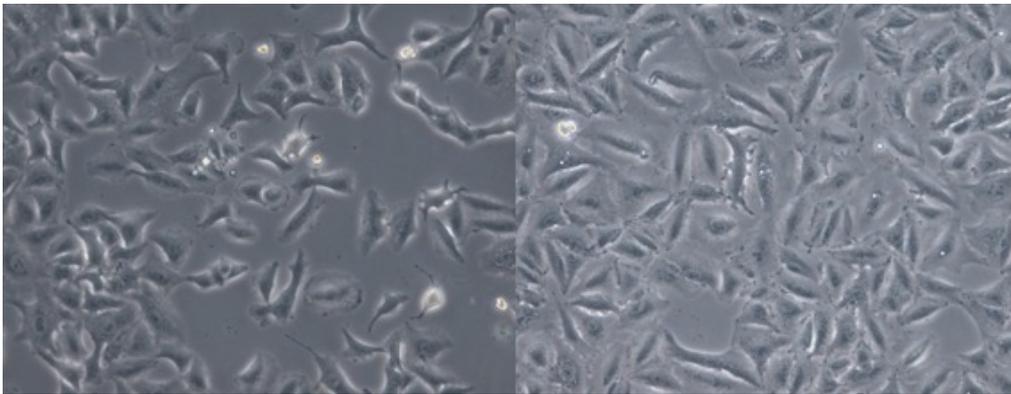
-A549: es una línea celular que se obtuvo de la *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (Public Health England, UK). Estas células fueron aisladas por primera vez en 1972 por D.J. Giard *et al.*, a partir de un adenocarcinoma extirpado de un varón caucásico de 58 años. En condiciones normales se comportan como células escamosas que difunden agua y electrolitos a través de los alveolos. En el cultivo *in vitro* crecen en monocapa adheridas al soporte, e *in vivo* pueden inducir tumores en ratones atómicos (Figura 13).

-H460: son células bronquiales aisladas por primera vez en 1982 por A. F. Gazdar de un varón con carcinoma de células grandes (CPCNP). La línea se obtuvo de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Barcelona, España). De tinción son positivas para queratina y vimentina y negativas para la proteína del neurofilamento. *In vivo* pueden inducir tumores en ratones *nude* (desnudo, del inglés, por contar con una mutación FOXP1 cuyo rasgo fenotípico más característico es la ausencia casi total de vello corporal) (Figura 14).

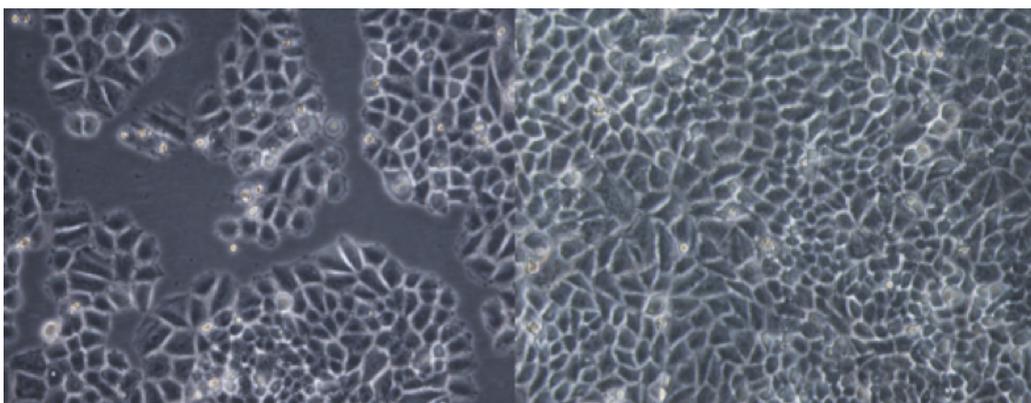
-H1792: son células epiteliales bronquiales aisladas por primera vez en 1987 por A. F. Gazdar procedentes de un varón fumador de 50 años de raza caucásica con un adenocarcinoma de pulmón en estadio 4. Su patrón de crecimiento es adherencial (Figura 12). La línea se obtuvo de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Barcelona, España).



**Figura 12.** Imágenes de las células de la línea celular H1792 sacadas con un aumento de 10x en diferentes tiempos de cultivo.



**Figura 13.** Imágenes de las células de la línea celular A549 sacadas con un aumento de 10x en diferentes tiempos de cultivo.



**Figura 14.** Imágenes de las células de la línea celular H460 sacadas con un aumento de 10x en diferentes tiempos de cultivo.

Los siguientes medios de cultivo son los que se utilizaron para cultivar las células nombradas anteriormente. Los fibroblastos, ambos tipos, fueron cultivados con medio DMEM (Gibco, Waltham, MA, EE.UU), suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco, Waltham, MA, EE.UU), tampón HEPES al 1% (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU), anfotericina B al 1% (Gibco,

Waltham, MA, EE.UU), penicilina-estreptomicina al 1% (Gibco, Waltham, MA, EE.UU) y L-glutamina al 1% (Gibco, Waltham, MA, EE.UU).

Para las A549 y H460 el medio utilizado fue el RPMI 1640 (Gibco, Waltham, MA, EE.UU), suplementado con suero fetal bovino al 5% (Gibco, Waltham, MA, EE.UU), tampón HEPES al 1% (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU), anfotericina B al 1% (Gibco, Waltham, MA, EE.UU), penicilina-estreptomicina al 1% (Gibco, Waltham, MA, EE.UU) y L-glutamina al 1% (Gibco, Waltham, MA, EE.UU). Para las H1792 el medio utilizado fue el RPMI 1640 (Euroclone, Milán, Italia), suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco, Waltham, MA, EE.UU), tampón HEPES al 1% (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU), anfotericina B al 1% (Gibco, Waltham, MA, EE.UU), penicilina-estreptomicina al 1% (Gibco, Waltham, MA, EE.UU) y L-glutamina al 1% (Gibco, Waltham, MA, EE.UU).

### **3.2. Cultivo de fibroblastos y células epiteliales.**

Todas las manipulaciones con cultivos celulares fueron realizadas en una sala de cultivos usando una campana de flujo laminar (Mars Safety Class 2, ScanLaf, Lynge, Dinamarca).

Los fibroblastos, sanos y tumorales, tras ser retirados fueron almacenados en crioviales. Las células A549, H460 y H1792 fueron descongeladas de sus respectivos crioviales donde son conservadas en nitrógeno líquido a  $-120^{\circ}\text{C}$ . Todas las células fueron cultivadas en frascos T25 y T75 con capacidad de 5 ml y 15 ml, respectivamente, para poder llevar a cabo los diversos experimentos.

Una vez las células alcanzaron el grado de confluencia adecuado se realizó un pase celular. Un pase celular consiste, en este caso, en despegar las células de una de las paredes de los frascos y volver a sembrar una cantidad conocida de células en otro frasco donde siguen creciendo. Este procedimiento es necesario, ya que, por ejemplo, las células H1792 antes de alcanzar el 100% de confluencia comienzan a desarrollar inhibición por contacto y para poder tener un control del resto de líneas lo idóneo es no superar el 95-100% de confluencia y así evitar un crecimiento excesivo, cambios en su morfología característica y obtener suficiente biomasa para los experimentos programados. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

1. Calentar el medio de cultivo y la Tripsina (Gibco, Waltham, MA, EE.UU) en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$ . Atemperar, a temperatura ambiente, la solución tampón fosfato salino (PBS) (Euroclone, Milán Italia).
2. Retirar el medio de cultivo.
3. Inmediatamente limpiar con PBS el frasco.
4. Añadir 1 ml de tripsina por cada 4 ml de medio. En el caso de un T25 se añade 1 ml de tripsina y de un T75 2 ml. Acto seguido se introduce el frasco en un incubador a  $37^{\circ}\text{C}$  con una atmósfera humidificada del 5% de  $\text{CO}_2$  (Forma Scientific Inc., Marietta, OH, EE.UU) durante 3 minutos.
5. Una vez pasa este tiempo y las células se han despegado del frasco se neutraliza la tripsina (Gibco, Waltham, MA, EE.UU) con 4 ml de medio si es un T25 y 8 ml si es un T75.
6. Se recoge el medio con las células y se pasa a un tubo falcon de 15 ml.
7. Se recogen 10  $\mu\text{l}$ , tras resuspender y homogeneizar el medio con las células, para poder realizar el conteo. A esos 10  $\mu\text{l}$  se le añaden 10  $\mu\text{l}$  de trypan blue (EVE<sup>TM</sup>,

NanoEntec, EEUU) y se cuentan con un contador de células (EVE™ automatic cell counter, NanoEntec, EEUU).

8. Según el número de células se decide cuantas se siembran de nuevo en un T25 o T75, y si es necesario cuantas células se congelan para poder ser utilizadas en el futuro. En este momento se pueden coger las células necesarias para el experimento que se desee realizar.
9. Por último, para mantener las condiciones óptimas de crecimiento celular el medio se cambia cada 2 o 3 días.

### **3.3. Estudio de la variación de la viabilidad celular por los agonistas cannabinoides.**

Para estudiar el efecto de los cannabinoides en la viabilidad de los fibroblastos, tumorales y normales, se llevaron a cabo varios ensayos de citotoxicidad donde se buscó conocer si las diferentes combinaciones de cannabinoides eran citotóxicas para los fibroblastos y si afectaban a su proliferación reduciéndola o potenciándola. Para ello se siguió el protocolo del XTT, que fue repetido tres veces. Este método se basa en la reducción extracelular del XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) por la NADH producida en las mitocondrias mediante el transporte de electrones por la membrana plasmática y un mediador de electrones. La reducción del XTT durante el ensayo produce un producto de formazán de color naranja soluble en agua que se disuelve directamente en el medio de cultivo, eliminando la necesidad de un paso de solubilización adicional (como se requiere en el ensayo MTT).

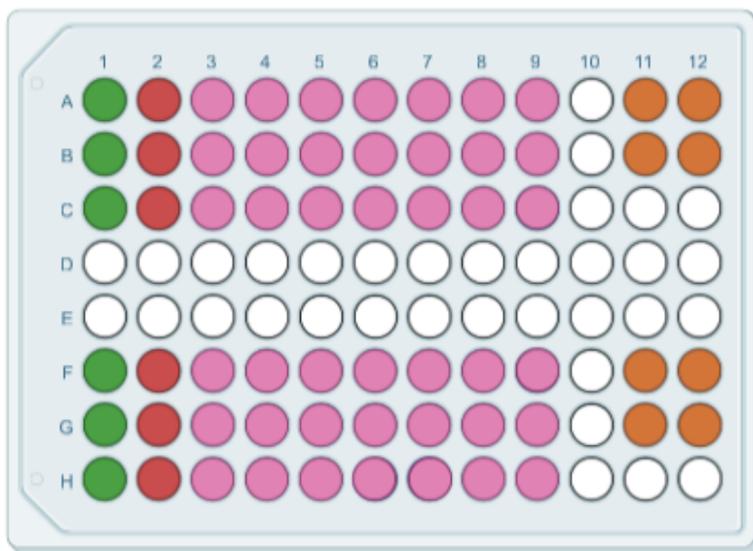
Los tratamientos a base de cannabinoides que se aplicaron a los fibroblastos fueron los siguientes: THC 30  $\mu$ M, CBC 30  $\mu$ M y mezcla de THC y CBD 30 10  $\mu$ M en presencia o ausencia de 5 ng/mL de TGF- $\beta$ 1. Estas concentraciones se eligieron conforme a estudios anteriores llevados a cabo por el grupo de investigación. (Milián et al., 2020)

Los concentrados de estas moléculas fueron suministrados por Sigma-Aldrich en forma de solución con base etanol con una concentración de 25 mg/mL. A partir de estas soluciones se preparó una dilución de trabajo a 100 mM en DMEM para posteriormente diluirla a 30 $\mu$ M. Para el uso combinado de los fármacos se preparó una solución madre con una mezcla equimolar de THC y CBD al 30 $\mu$ M. El TGF- $\beta$ 1 se obtuvo en forma de polvo liofilizado con una 97% de pureza.

Lo primero que se hizo fue sembrar los fibroblastos en placas de 96 pocillos (Figura 15). Se sembraron 2500 células de ambos tipos de fibroblastos por pocillo. Para seleccionar la cantidad de células adecuada se realizó un XTT previo con diferentes cantidades de células (10.000, 5000, 2500, 1250 y 625) y analizando los resultados del XTT se decidió que 2500 células era el número adecuado. A las 24 horas se añadieron los diferentes tratamientos. Las placas se incubaron durante dos horas y después, se añadió el TFG- $\beta$ 1 en los pocillos correspondientes. El TFG- $\beta$ 1 se añade a las dos horas, ya que primero se deja actuar a los cannabinoides para que estos se unas a los receptores CB1 y CB2. Este orden es importante, puesto que se ha demostrado que una posible ruta de acción del TFG- $\beta$ 1 se da mediante estos receptores.

A las 48 horas se añadieron 50 $\mu$ l del mix XTT (reactivo XTT y el reactivo de activación (PanReac AppliChem, Barcelona, España)). Las células se incubaron durante 2 horas, a la hora y a las dos

horas se realizó la lectura de las placas con la ayuda de un espectrofotómetro de masas VICTOR (Perkin-Helmer, Madrid, España). Con él se mide la absorbancia de cada pocillo (a una longitud de onda de 480 nm) para así poder obtener, mediante un modelo de regresión lineal, la tasa de proliferación en cada uno. En la Figura 15 se puede ver el diseño de la placa que se utilizó para este ensayo. Las filas A, B y C corresponden a los fibroblastos sanos y las filas F, G y H corresponden a los fibroblastos tumorales. De cada condición se tienen triplicados: un control negativo (las células con su medio de cultivo) en verde, control positivo (células con una solución con látex que se sabe que mata a las células) en rojo, los blancos del control negativo y control positivo en naranja y las células con los diferentes tratamientos en rosa.



**Figura 15.** Diseño de la placa de 96 pocillos para el ensayo de citotoxicidad de los fibroblastos tratados con las diferentes combinaciones de agonistas cannabinoides.

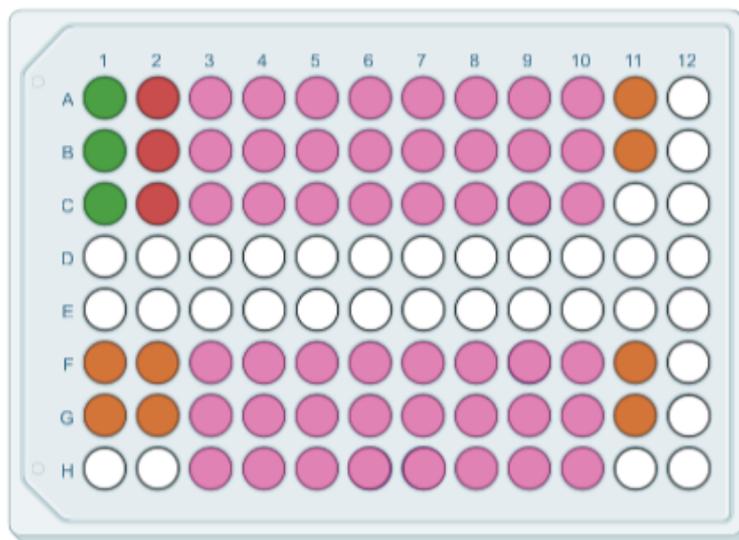
### 3.4. Preparación de los tratamientos basados en agonistas cannabinoides.

Los tratamientos que se utilizaron constaron de una parte de sobrenadante de los fibroblastos del paciente 12 (medio utilizado para cultivarlos) y otra de medio de cultivo de las células epiteliales. Esta combinación se realizó, ya que el sobrenadante de los fibroblastos contiene diversos factores liberados por ellos, descritos anteriormente, que se consideran fundamentales en la TEM y la proliferación tumoral. Su combinación es necesaria, puesto que los nutrientes del sobrenadante han sido consumidos por los fibroblastos y el añadir una parte de medio de cultivo proporciona esos nutrientes. Con este método se consiguió un avance respecto a anteriores estudios en cuanto a mejorar las técnicas para reproducir el microambiente tumoral. El sobrenadante se recogió tras 72 horas de cultivo de los fibroblastos con las diferentes combinaciones de los cannabinoides, THC y CBD, y TGF- $\beta$ 1. Además, algunos no fueron tratados y simplemente se recogió su sobrenadante.

Para elegir la proporción en la que se combinaron el medio y el sobrenadante, como paso preliminar, se realizaron varios ensayos de citotoxicidad para analizar el efecto del sobrenadante. Las proporciones de medio y sobrenadante que se estudiaron fueron las siguientes: 100%, 50%, 30%, 10%, 5% y 1% de sobrenadante. El ensayo de citotoxicidad se ha llevado a cabo siguiendo el método del XTT explicado en el apartado anterior.

En primer lugar, se sembraron en placas de 96 pocillos las 3 líneas tumorales. Teniendo en cuenta la tasa de proliferación y la capacidad de cada pocillo se calculó el número de células que se debía sembrar en cada pocillo para que estas no saturasen el medio del pocillo. La cantidad de células seleccionada fue: 1000 de H460, 1500 de A549 y 1500 de H1792 por pocillo en 100 µl de medio. Para seleccionar esta selección se realizó un XTT previo con diferentes cantidades de células de cada línea celular y analizando los resultados del XTT se decidió que 1000, 1500 y 1500 células fueron las adecuadas. A las 24 horas se les aplicó los diferentes tratamientos y tras 48 horas se siguió el procedimiento explicado anteriormente con los mismos pasos de incubación y lectura de la placa.

En la Figura 16 se muestra el diseño de las placas para el ensayo con las líneas celulares (A549, H460 y H1792). De cada condición se tienen triplicados: un control negativo (las células con su medio de cultivo) en verde, control positivo (células con una solución con látex que se sabe que mata a las células) en rojo, los blancos del control negativo, control positivo y el sobrenadante de los fibroblastos sin ningún tratamiento en naranja y las células con los diferentes sobrenadantes en rosa. En las filas A, B y C se trataron las células con los sobrenadantes de los fibroblastos sanos y en las filas F, G y H se trataron con los sobrenadantes de los fibroblastos tumorales.



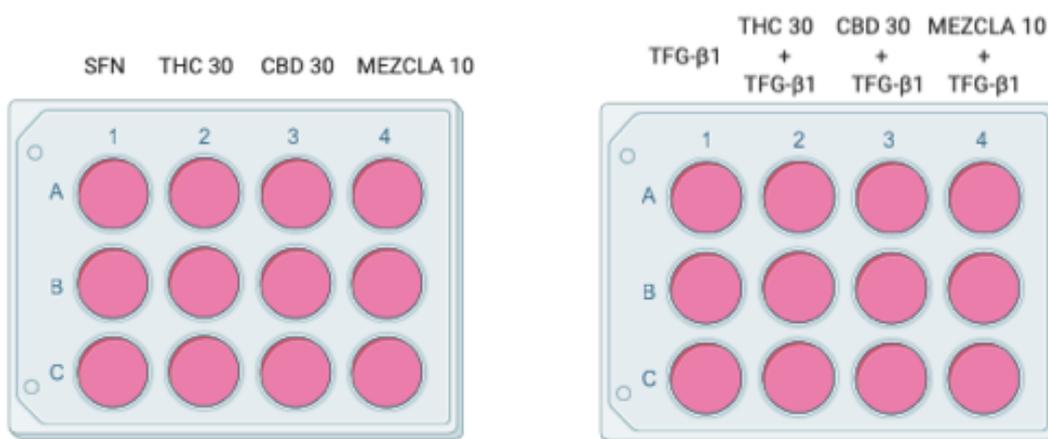
**Figura 16.** Diseño de la placa de 96 pocillos para el ensayo de citotoxicidad de las líneas celulares tumorales tratadas con los tratamientos.

### 3.5. Análisis de la expresión relativa de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima mediante el uso de Real Time PCR.

La realización de experimentos utilizando técnicas de biología molecular es de gran importancia, ya que respalda y demuestra los resultados que son obtenidos por otros ensayos como la inmunofluorescencia. En este experimento se estudiaron la expresión de diversos genes relacionados con la TEM: FAP y FSP-1 tanto en los fibroblastos como en la línea celular H460, y CDH1, CDH2 y VIM en la línea celular H460. Para poder llevar a cabo este estudio se hizo uso de la técnica Real Time PCR.

Antes de realizar la Real Time PCR se siguieron los siguientes pasos. Los fibroblastos y la línea H460 fueron cultivados en placas de 12 pocillos. En cada pocillo se sembró un volumen de 1,5 mL con un número de células que dependió de cada tipo celular ya que tienen una tasa de proliferación diferente. Se sembraron 30000 células de H460 y 20000 de los fibroblastos, sanos y tumorales.

Tras llegar a la confluencia del 70% se les aplicó 1,5 mL de los tratamientos correspondientes, a los fibroblastos los cannabinoides y a la línea tumoral los sobrenadantes. Como en el ensayo de citotoxicidad en el caso de los fibroblastos el TFG- $\beta$ 1 se añadió dos horas después al resto de componentes de los tratamientos. Cada tratamiento se reprodujo por triplicado. En la Figura 17 se puede observar el diseño utilizado en las placas. Se incubaron durante 72 horas para después retirar el tratamiento y añadir 500  $\mu$ l de TRIzol (Ambion, Waltham, MA, EE.UU). El TRIzol se recogió de cada pocillo y se guardó en microtubos de 1,5 mL previamente rotulados con el tipo de celular y el tratamiento que se le había aplicado. Este TRIzol contiene el ARN de las células. Para poder conservarlos se almacenaron a una temperatura de -80°C.



**Figura 17.** Diseño de las placas de 12 pocillos para la extracción de ARN necesaria para la qPCR de la línea H460 tratada con los sobrenadantes de los fibroblastos sanos (normales).

A partir de aquí se siguió un protocolo de extracción y cuantificación del RNA:

1. Se sacan las muestras del congelador de -80°C y se dejan atemperar durante 5 minutos para que se descongelen.
2. Se añaden 100  $\mu$ l dicloro metanol en cada microtubo y una vez mezclado bien se dejan reposar durante 5 minutos.
3. Después de que reposen se centrifugan durante 15 minutos a 12000G y 4°C con la ayuda de una centrífuga de la serie Sorvall Legend Micro 17R (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU).
4. Con los pasos anteriores se consigue separar la muestra en tres fases, en la fase acuosa se encuentran los ácidos nucleicos (ARN). Se rotulan unos nuevos microtubos y se añade 1  $\mu$ l de glucógeno (Invitrogen, Waltham, MA, EE.UU) en cada uno, esto ayuda a la precipitación de los mismos.
5. De la fase acuosa se intenta recoger el máximo de volumen posible y se transfiere a los nuevos microtubos. Se añaden 250  $\mu$ l de isopropanol y se mezcla bien.

6. Se dejan reposar las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente y otros 15 minutos a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
7. Se centrifugan durante 10 minutos a 12000G a  $4^{\circ}\text{C}$ . A partir de este momento las muestras tienen que estar conservadas en hielo.
8. Las muestras se lavan con etanol al 75% dos veces y en cada lavado se centrifugan 5 minutos a 7500G y  $4^{\circ}\text{C}$ .
9. Tras el último lavado el etanol se retira con mucho cuidado para no arrastrar el pellet (compuesto por ARN) y se secan las muestras en un termobloque Thermomixer C (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) calentado previamente a  $40^{\circ}\text{C}$  para evaporar los restos de etanol.
10. Una vez están secas las muestras se resuspende el pellet en 30  $\mu\text{l}$  de agua.
11. Por último, se calientan las muestras a  $65^{\circ}\text{C}$  durante un máximo de 5 minutos, se pasan por el vórtex, se les aplica un ciclo breve en la centrifugadora y se almacenan a  $-80^{\circ}\text{C}$  para conservarlas o se procede a su cuantificación.

Para poder cuantificar la cantidad de ARN existente en cada muestra se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU). La cantidad de ARN vino dada en  $\text{ng}/\mu\text{l}$  y se obtuvo a partir de las absorbancias medidas a 260( $A_{260}$ ) y 280( $A_{280}$ ) nm. Con la relación  $A_{260}/A_{280}$  se conoció el grado de pureza de las muestras. Para estudios de expresión génica únicamente se consideran aquellas muestras con una pureza entre 1,8 y 2.

Con la cuantificación hecha, se procedió a realizar una retrotranscripción inversa (RT) por la cual se pasó de tener RNA, inestable, a tener DNA complementario(cADN) para la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (Real Time PCR o qPCR). Para preparar las nuevas muestras y placa necesaria para la RT se trabajó en una campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI (ALS, Milán, Italia).

Los componentes para la RT fueron 50% del volumen final la mezcla reactiva (agua, RT buffer, *random hexamers*, dNTPs, inhibidor RNasa y la enzima retrotranscriptasa inversa) donde las proporciones de sus componentes vienen dadas por el fabricante, Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU), y 50% del volumen final de agua y la muestra en cuestión. La cantidad de agua y muestra variaron según la cantidad de ARN obtenido en la extracción, y la cantidad de componentes se decidió según el número de genes que se desearon analizar. La combinación de todos estos componentes se almacenó en microtubos de 200  $\mu\text{L}$ . Uno de los microtubos no contuvo muestra solo la mezcla reactiva, la BRT, y así cuando se hizo la qPCR se pudo comprobar que la mezcla se había hecho correctamente.

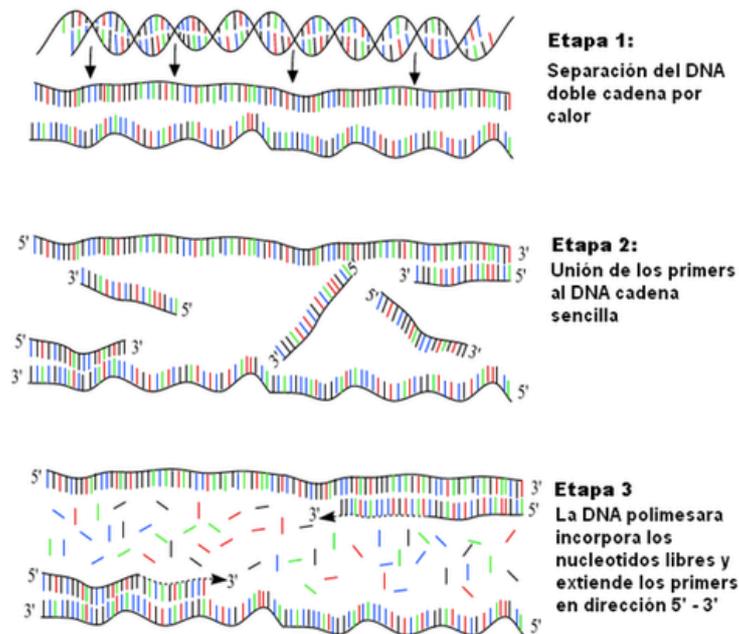
La retrotranscripción se realizó en un termociclador LifePro Thermal Cycler (Lan Technics) donde se dieron una serie de fases en las cuales varía la temperatura y el tiempo de duración, y se consiguió el paso de ARN a cDNA. Las fases son: 10 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ , 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 minutos a  $85^{\circ}\text{C}$  y 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Una vez se acabó el proceso las nuevas muestras se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Por último, se llevó a cabo la técnica de la qPCR. Esta técnica consiste en repetidos ciclos donde la temperatura varía y el cDNA de manera selectiva se amplifica y simultáneamente se

cuantifica gracias a la presencia de un fluoróforo. Concretamente en cada ciclo se dan tres etapas (Figura 18):

- Desnaturalización del cDNA a 94°C
- Hibridación de los cebadores a 55°C
- Elongación a 72°C

Después de estas tres etapas gracias al fluoróforo se cuantifica el cDNA que se ha amplificado y se sigue con el siguiente ciclo.



**Figura 18.** Representación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (León, I., 2017).

Los componentes necesarios para esta reacción son: agua, un *master mix* de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU) y el cebador o primer específico del gen que se quiere estudiar. Esta combinación se preparó tantas veces como genes se quisieron estudiar según las especificaciones de TaqMan. El protocolo que se siguió para la realización de esta técnica fue el siguiente:

1. La reacción se llevaba a cabo en un pocillo de una placa de 384 pocillos. Así pues, el primer paso es optimizar el diseño de esta placa, es decir, usar la mejor distribución posible de las muestras y los genes.
2. Descongelar las muestras y los cebadores de cada gen.
3. En microtubos de 500  $\mu$ l se preparan los componentes para la reacción.
4. Se añade 1  $\mu$ l de las muestras en los pocillos correspondientes de la placa. Una serie de pocillos no llevaban ninguna muestra ya que son el control negativo. Este control sirve para asegurarse de que los diferentes componentes para la reacción están bien.
5. Según el diseño de la placa, en cada pocillo se colocan 9  $\mu$ l de la mezcla de los componentes preparada previamente.
6. Con mucho cuidado se le da un spin a la placa para que el contenido de los pocillos se deposite en el fondo.

7. La placa se introduce en un termociclador QuantStudio 5 (Applied Biosystems, Waltham, MA, EE.UU).

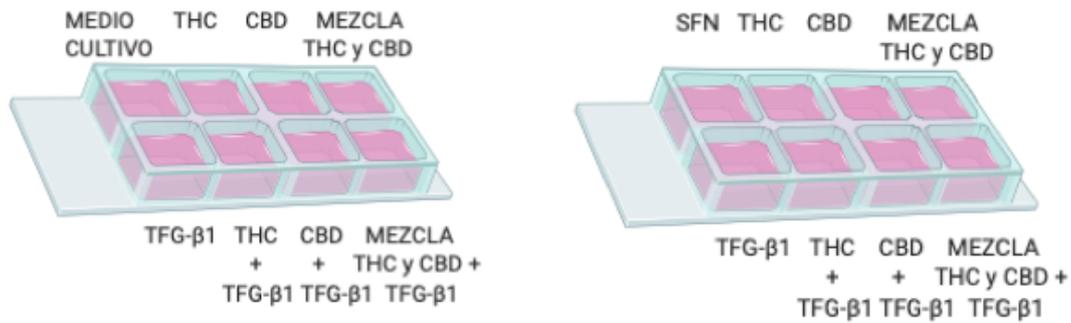
Los resultados registrados por el termociclador se obtienen las curvas de amplificación. El valor importante es el Ct, con este valor se realizaron una serie de cálculos con los que finalmente se consiguieron las expresiones relativas de los genes en cuestión. Primero se calculó el  $\Delta\text{Ct}$ , después el  $\Delta\Delta\text{Ct}$  y por último la expresión relativa se consiguió con la fórmula:  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Para estos cálculos se utilizó el gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control endógeno y se normalizaron los resultados al grupo control.

### **3.6. Evaluación de los cambios morfológicos mediante tinción con Faloidina, y de la expresión de ASMA y FSP1 mediante inmunofluorescencia.**

Partiendo de la base de que la morfología de las células tumorales es diferente a la de las células normales, se han querido evaluar los cambios de morfología característicos producidos por la TEM y los diferentes tratamientos mediante la tinción con faloidina-rodamina tanto de ambos tipos de fibroblastos como en la línea celular H460. Por otro lado, se evaluó la expresión de ASMA y FSP-1 mediante inmunofluorescencia. En todos los casos se tiñeron los núcleos con DAPI.

El DAPI (dihidrocloruro de 4',6-diamidino-2-fenilidol) es un colorante que tiñe el núcleo de las células y que emite fluorescencia azul tras unirse a él. La faloidina pertenece a una clase de las falotoxinas y es un heptapéptido bicíclico tóxico. Se une específicamente a los filamentos de actina F del citoesqueleto, impidiendo su despolarización. La rodamina es un marcador fluorescente asociado a la faloidina que permite la visualización mediante el microscopio de fluorescencia de la unión faloidina-actina F de color. El ASMA[1A4] es un anticuerpo con fluorescencia verde que se une a la actina de los microfilamentos del citoesqueleto. FSP1 es un anticuerpo que se une a la proteína FSP-1 propia de los fibroblastos y al añadirle un anticuerpo secundario emite fluorescencia verde.

Este ensayo tuvo dos partes; en la primera se sembraron 2 cámaras de 8 pocillos (micell) de los fibroblastos y 3 de la línea celular H460 para la tinción con DAPI y faloidina. En el caso de los fibroblastos se sembraron 12000 células por pocillo y en el caso de las H460 3000. En la segunda parte se sembraron cuatro cámaras de ambos tipos de fibroblastos con el mismo número de células que en la anterior parte y se realizó la inmunofluorescencia con ASMA y FSP-1. En ambas partes una vez las células llegaron a una confluencia del 70% se les aplicaron los respectivos tratamientos. En la Figura 19 se puede observar el diseño de dos de las cámaras que se utilizaron para la primera parte del ensayo, la primera corresponde al diseño para los fibroblastos y la segunda para la línea celular H460 tratada con los sobrenadantes de los fibroblastos sanos o normales (SFN).



**Figura 19.** Diseño de las cámaras de 8 pocillos, de los fibroblastos y la línea celular H460 tratada con el sobrenadante de los fibroblastos sanos (normales), para el ensayo de tinción e inmunofluorescencia.

Una vez pasan las 72 horas con el tratamiento se procedió a seguir el siguiente protocolo para las tinciones e inmunofluorescencia:

1. Se retira el medio de los pocillos y se realizan dos limpiezas con PBS. El primer lavado es rápido y el en el segundo se deja reposar el PBS durante 5 minutos.
2. A continuación, se retira el PBS y se fijan las células al portaobjetos de vidrio (el fondo del pocillo) tras dejarlas 25 minutos con formol.
3. Una vez han pasado los 25 minutos se retira el formol y se vuelven a realizar como mínimo dos lavados con PBS. En este punto las muestras pueden mantenerse con el PBS en la nevera durante un tiempo y realizar las tinciones en otro momento. En la mayoría de lo posible los pasos anteriores se realizan en frío utilizando la nevera.
4. Si se sigue con el protocolo, el siguiente paso es preparar una solución de tritón al 0,1% mezclando 0,1mL de Tritón X-100 (Merck, Darmstadt, Alemania) con 100mL de PBS. Se retira el PBS, se añade a ojo la solución de tritón para permeabilizar las células y se deja actuar durante 5 minutos.
5. Se vuelven a realizar dos lavados con PBS.
6. Para evitar las uniones inespecíficas se tratan las células con BSA (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EEUU) al 1% en PBS durante 25 minutos.
7. Llegado a este punto se preparan las diluciones necesarias de los anticuerpos ya que estos se comercializan de manera muy concentrada. La disolución madre del FSP-1 (NovusBio, Colorado, Estados Unidos) está concentrada a 1 mg/mL, la del ASMA (abcam, Cambridge, Reino Unido) a 0,5 mg/mL y el DAPI (VECTASHIELD® PLUS Antifade Mounting Medium with DAPI H-2000, Vector Laboratories, San Francisco, EE.UU). Para la tinción con Faloidina-Rodamina (Invitrogen,) la dilución era 2:200 (PBS). Las diluciones se realizan con el diluyente Envision (Dako, Dinamarca) que bloquea uniones inespecíficas. Para prepararlas se sigue el protocolo establecido por el grupo de investigación.
8. Para la tinción de faloidina se añade la disolución de faloidina, se deja actuar durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y se realizan dos lavados con PBS. En el caso de los anticuerpos se ponen las diluciones de ASMA y FSP-1 en los pocillos correspondientes y se deja incubar durante toda la noche en nevera. Al día siguiente se realizan varios lavados. A las muestras con el anticuerpo FSP-1 se les añade un anticuerpo secundario unido a un fluoróforo FITC y tras incubarse 2 horas se lava varias veces con PBS.

9. Después de las tinciones e inmunofluorescencias se procede a desmontar las cámaras quedándose los portaobjetos con las células fijadas en él.

Por último, se añade el medio de montaje con DAPI y se sellan los portaobjetos, tras 24 horas se procede a su visualización con un microscopio de fluorescencia Leica DM 25000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se fotografían con el programa LAS AF Lite (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Las fotografías se tomaron de tal manera que se apreciaran los cambios morfológicos de la TEM: sitios de unión entre las células, la elongación de su citoesqueleto, la marcación de las fibras de estrés, los espacios entre las agrupaciones y la proteína FSP-1 propia de los fibroblastos.

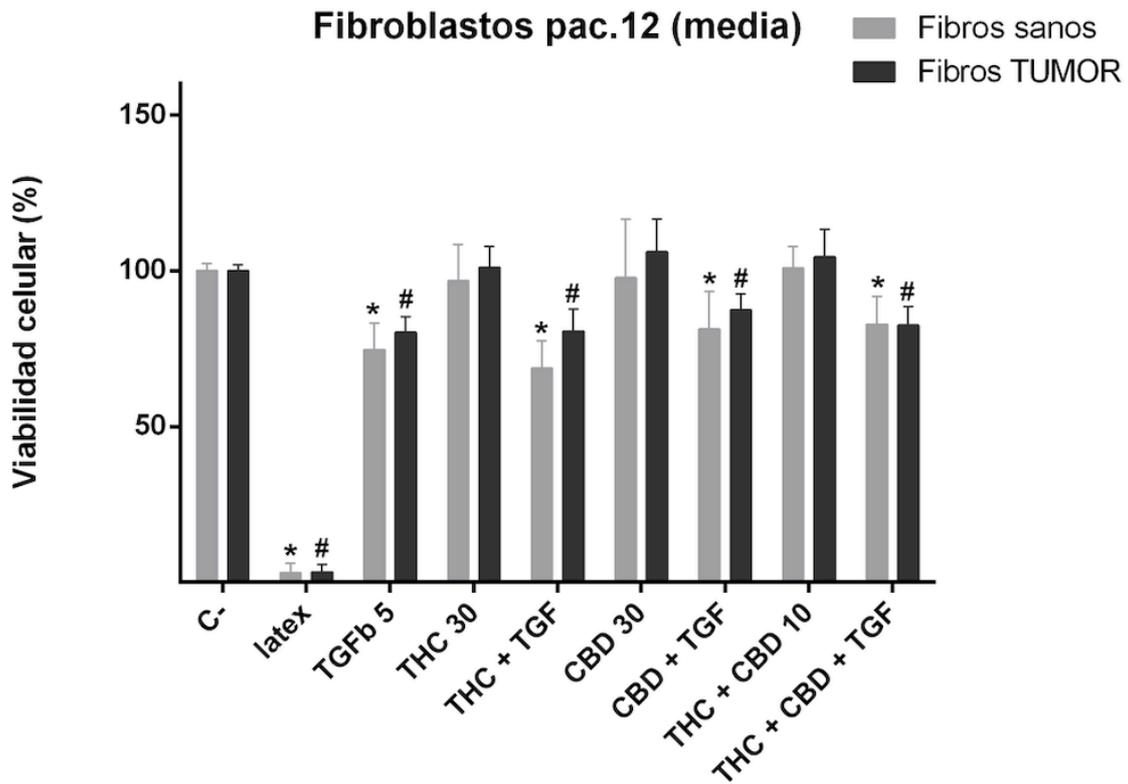
### **3.7. Análisis de los resultados.**

Para el análisis y la obtención de los resultados los diferentes datos fueron analizados mediante un test ANOVA (análisis de varianzas) y un post-test de comparación múltiple de Turkey (GraphPad Software Inc., San Diego, CA., EEUU). Los resultados obtenidos se presentaron en forma de medias  $\pm$  desviación estándar y la significatividad mínima aceptada fue de un p-valor  $< 0.05$ .

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

##### 4.1. Efecto de los agonistas cannabinoides sobre la viabilidad en fibroblastos aislados de tejido tumoral o sano de pacientes con cáncer de pulmón.

Se realizó un ensayo de citotoxicidad con el fin de valorar el efecto que los agonistas tienen sobre los dos tipos de fibroblastos. Para ello se siguió el procedimiento explicado en el apartado 3.3. Estudio de la variación de la viabilidad celular por los agonistas cannabinoides. Con los datos obtenidos y los análisis correspondientes se obtuvieron los siguientes resultados para los fibroblastos procedentes del paciente 12 (Figura 20):



**Figura 20.** Gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad de los fibroblastos tratados con los cannabinoides. Se resumen los datos experimentales obtenidos para una n de 3. \*  $p < 0.05$  comparado con el grupo control de fibroblastos sanos. #  $p < 0.05$  comparado con el grupo control de fibroblastos tumorales.

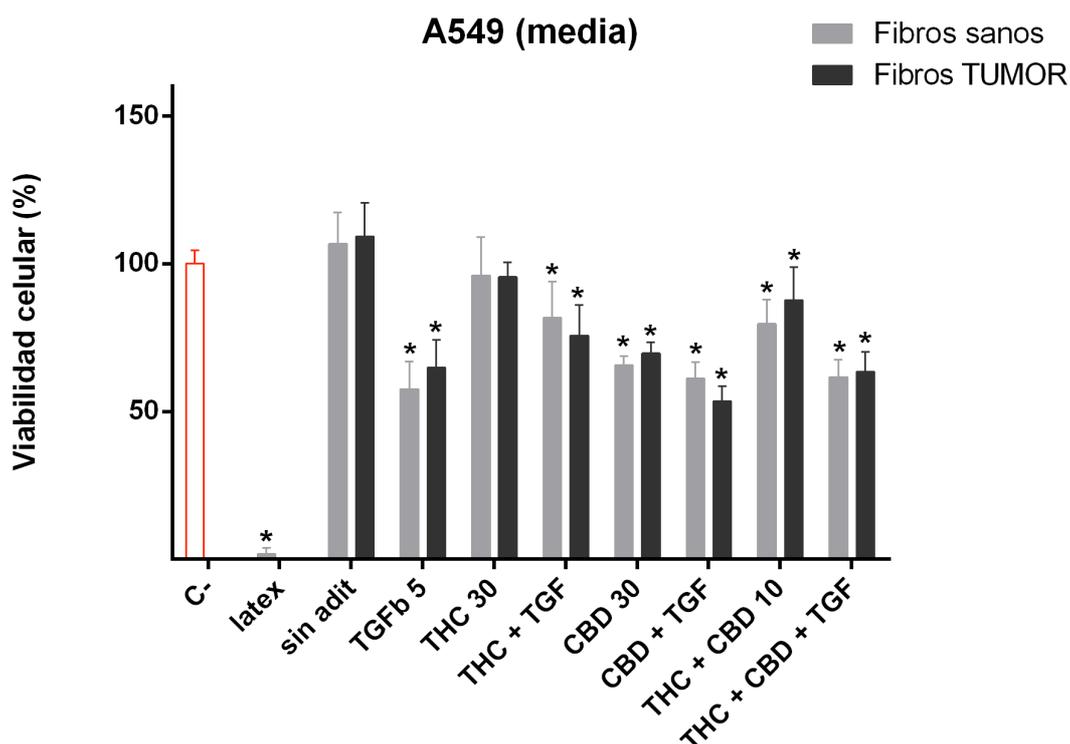
Observando los resultados que se muestran en la gráfica de la Figura 20 se puede decir que solo existe diferencia significativa, en cuanto a la viabilidad celular, respecto del control negativo en las células que fueron tratadas con los tratamientos junto al TGF- $\beta$ 1. De hecho, el THC al 30  $\mu$ M más TGF- $\beta$ 1 es el tratamiento que más la redujo. El tratamiento con TGF- $\beta$ 1 produjo una inhibición significativa de la viabilidad celular que no fue significativamente inhibida por ninguno de los tratamientos ensayados, si bien se observaron diferentes efectos en función del origen de los fibroblastos, en especial en los grupos en los que se administró THC en combinación con CBD donde se observó una tendencia a la reversión del efecto del TGF- $\beta$ 1. Ni el THC ni el CBD produjeron efectos sobre la viabilidad celular a ninguna de las concentraciones ensayadas. Como cabía esperar los tratamientos afectaron menos a los fibroblastos tumorales, ya que el TGF- $\beta$ 1 potenció su proliferación, pero la viabilidad en ambos

tipos de fibroblastos se vio reducida. Además, la reducción de la viabilidad no es suficiente como para decir que los cannabinoides son citotóxicos para las células.

#### 4.2. Papel modulador de los sobrenadantes de los fibroblastos tumorales y sanos sobre la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de pulmón.

El efecto modulador de los diferentes sobrenadantes con los tratamientos de cannabinoides se estudió mediante ensayos de citotoxicidad de las tres líneas celulares: A549, H460 y H1792.

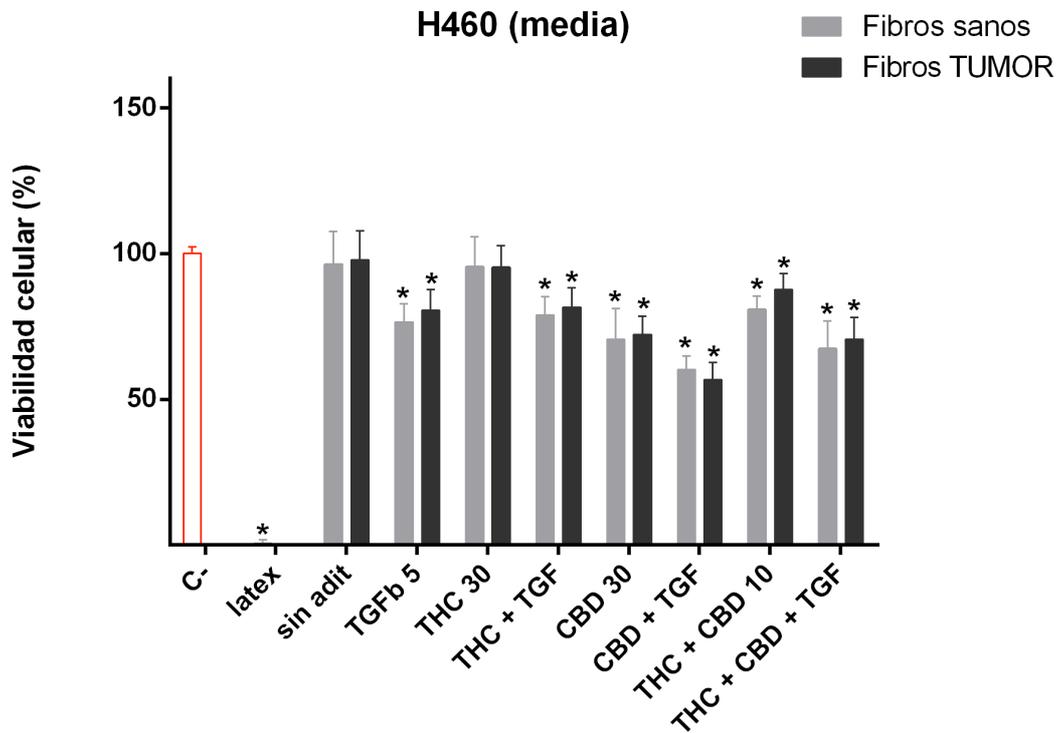
Los resultados obtenidos para la línea celular A549 se resumen en la Figura 21. El único sobrenadante que no afectó significativamente a la viabilidad celular fue el de THC al 30  $\mu$ M en ausencia de TGF- $\beta$ 1. Además, la viabilidad fue menor en los sobrenadantes que incluyeron TGF- $\beta$ 1 tanto los obtenidos a partir de fibroblastos sanos como de tumorales. Los sobrenadantes de los fibroblastos tratados con CBD al 30  $\mu$ M, en presencia o ausencia de TGF- $\beta$ 1 fueron los que más redujeron la viabilidad celular. Un efecto similar se registró para las células tratadas con la mezcla de THC más CBD al 10  $\mu$ M en presencia de TGF- $\beta$ 1.



**Figura 21.** Gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad de la línea celular A549 tratada con los sobrenadantes de fibroblastos sanos y tumorales. Se presentan los datos obtenidos para una n de 2. \*  $p < 0.05$  respecto al grupo control. En el eje X se sitúan los diferentes tratamientos donde "sin adit" hace referencia al sobrenadante sin ningún tratamiento y en el eje Y está representada la viabilidad en porcentaje.

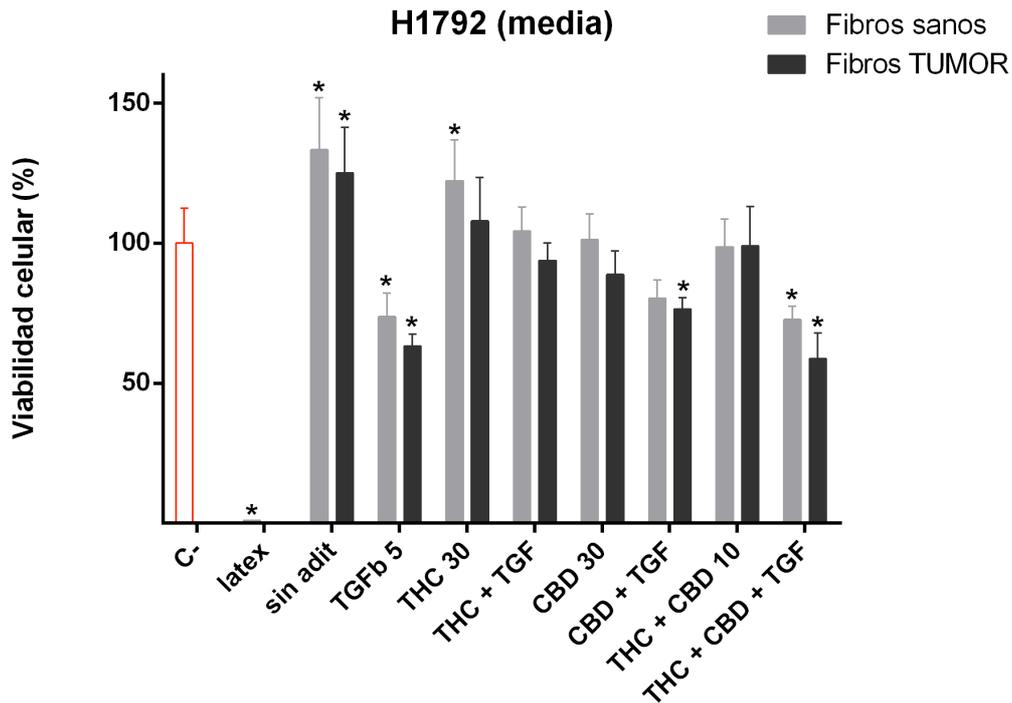
Se observó una tendencia similar para la línea celular H460 (Figura 22). El único sobrenadante que no influyó significativamente sobre la viabilidad fue el THC al 30  $\mu$ M, tanto el obtenido a partir de fibroblastos sanos como tumorales. Con respecto a los sobrenadantes de fibroblastos

tratados con CBD al 30  $\mu$ M, CBD al 30  $\mu$ M más TGF- $\beta$ 1 y la mezcla de THC más CBD al 10  $\mu$ M en presencia de TGF- $\beta$ 1, fueron los que más redujeron la viabilidad, llegando a ser citotóxicos.



**Figura 22.** Gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad de la línea H460 tratada con los sobrenadantes de fibroblastos sanos y tumorales. Se presentan los datos obtenidos para una n de 2. \*  $p < 0.05$  respecto al grupo control. En el eje X se sitúan los diferentes tratamientos donde "sin adit" hace referencia al sobrenadante sin ningún tratamiento y en el eje Y está representada la viabilidad en porcentaje.

Con respecto a la línea celular H1792, en general se observó un menor efecto sobre la viabilidad celular, tal y como se representa en la Figura 23. La tendencia observada fue, no obstante, similar, encontrando un mayor efecto en los grupos tratados con sobrenadantes de fibroblastos tratados con THC más CBD al 10  $\mu$ M con TGF- $\beta$ 1.



**Figura 23.** Gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad de la línea H1792 tratada con los sobrenadantes de fibroblastos sanos y tumorales. Se presentan los datos obtenidos para una n de 2. \*  $p < 0.05$  respecto al grupo control. En el eje X se sitúan los diferentes tratamientos donde "sin adit" hace referencia al sobrenadante sin ningún tratamiento y en el eje Y está representada la viabilidad en porcentaje y en el eje Y está representada la viabilidad en porcentaje.

### 4.3. Regulación de la expresión génica de los fibroblastos tumorales y sanos tratados con los agonistas cannabinoides.

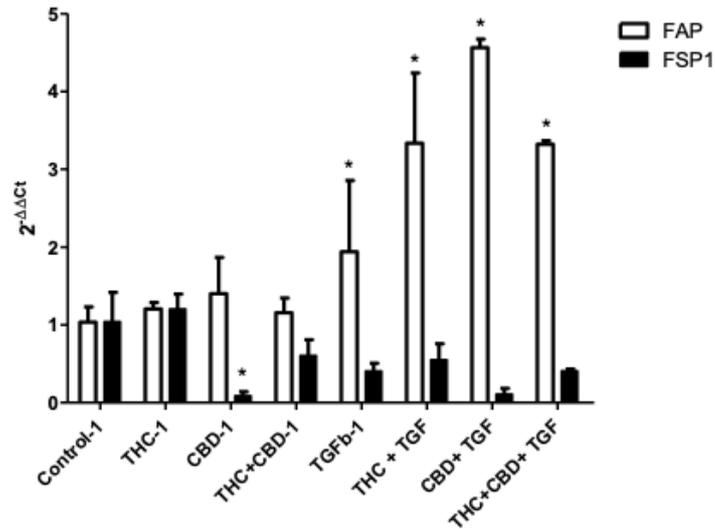
Se hizo uso de la técnica Real Time PCR para estudiar la expresión relativa de los genes FAP y FSP-1 relacionados con la TEM en los fibroblastos tumorales y sanos como se explica en el apartado 3.5. Los resultados se presentan en la Figura 24, fibroblastos sanos, y Figura 25, fibroblastos tumorales. Como se pueden apreciar los resultados fueron muy diferentes tanto si se comparan los dos tipos de fibroblastos como si se compara entre los diferentes tratamientos. El gen FAP, se expresa en la superficie de los fibroblastos, está más relacionado con los fibroblastos sanos, mientras que el FSP-1, una proteína asociada a los filamentos intermedios, está relacionada con ambos tipos de fibroblastos.

Tal y como se representa en la Figura 24, en todos los grupos estudiados se registró un incremento en la expresión de FAP, alcanzando la significatividad estadística en los grupos tratados con  $TGF\beta-1$ . El  $TGF\beta-1$  potencia la capacidad tumoral de las células activando diferentes mecanismos de la TEM y este gen implica la activación de los fibroblastos. Con respecto a la expresión relativa de FSP-1, se observó una inhibición en la misma prácticamente en todas las condiciones ensayadas, si bien solo el grupo tratado con CBD 30  $\mu M$  produjo una inhibición estadísticamente significativa.

El perfil de expresión de ambos genes fue diferente para los fibroblastos tumorales, tal y como se resume en la Figura 25. Los fármacos *per se*, produjeron una inhibición significativa en los niveles de expresión del gen FAP. Con respecto al gen FSP, todos los fármacos ensayados

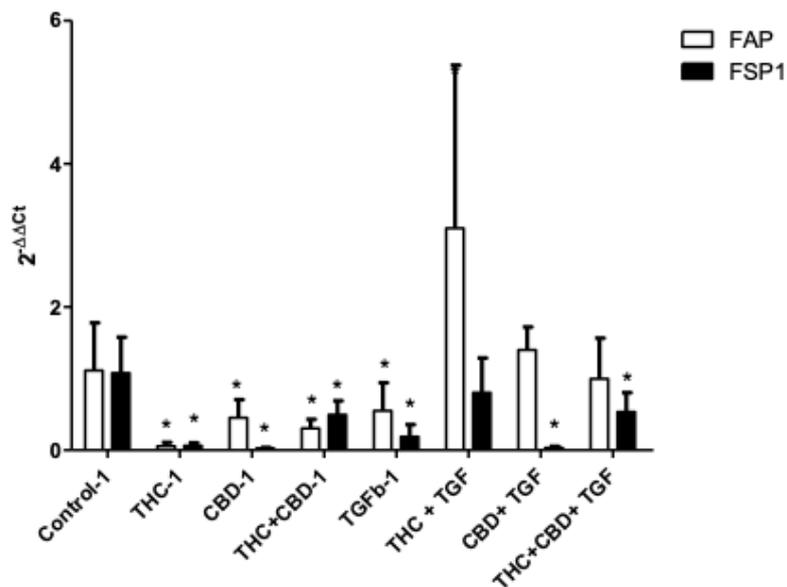
produjeron una inhibición significativa en su expresión. No obstante, no se registró un incremento en la expresión del mismo como consecuencia a la estimulación con TGFβ-1. Esta reducción, significativa en la mayoría de tratamientos menos en el THC más TGFβ-1 puede ocurrir porque los fibroblastos evolucionaron a otro tipo celular como el mesenquimal, dejando de expresar estos genes ligados a ellos.

### FIBROBLASTOS SANOS



**Figura 24** Expresión relativa de los genes FAP y FSP-1 de los fibroblastos sanos/normales con los diferentes tratamientos. Se presentan los resultados obtenidos para una n de 2. \* p < 0.05 respecto al grupo control. En el eje Y está representada la expresión como 2<sup>-ΔΔCt</sup> y en el eje X las diferentes condiciones experimentales.

### FIBROBLASTOS TUMORALES



**Figura 25.** Expresión relativa de los genes FAP y FSP-1 de los fibroblastos tumorales con los diferentes tratamientos. Se presentan los resultados obtenidos para una n de 2. \* p < 0.05 respecto al grupo control. En el eje Y está representada la expresión como 2<sup>-ΔΔCt</sup> y en el eje X las diferentes condiciones experimentales.

#### **4.4. Análisis morfológico de los fibroblastos tratados con los agonistas cannabinoides.**

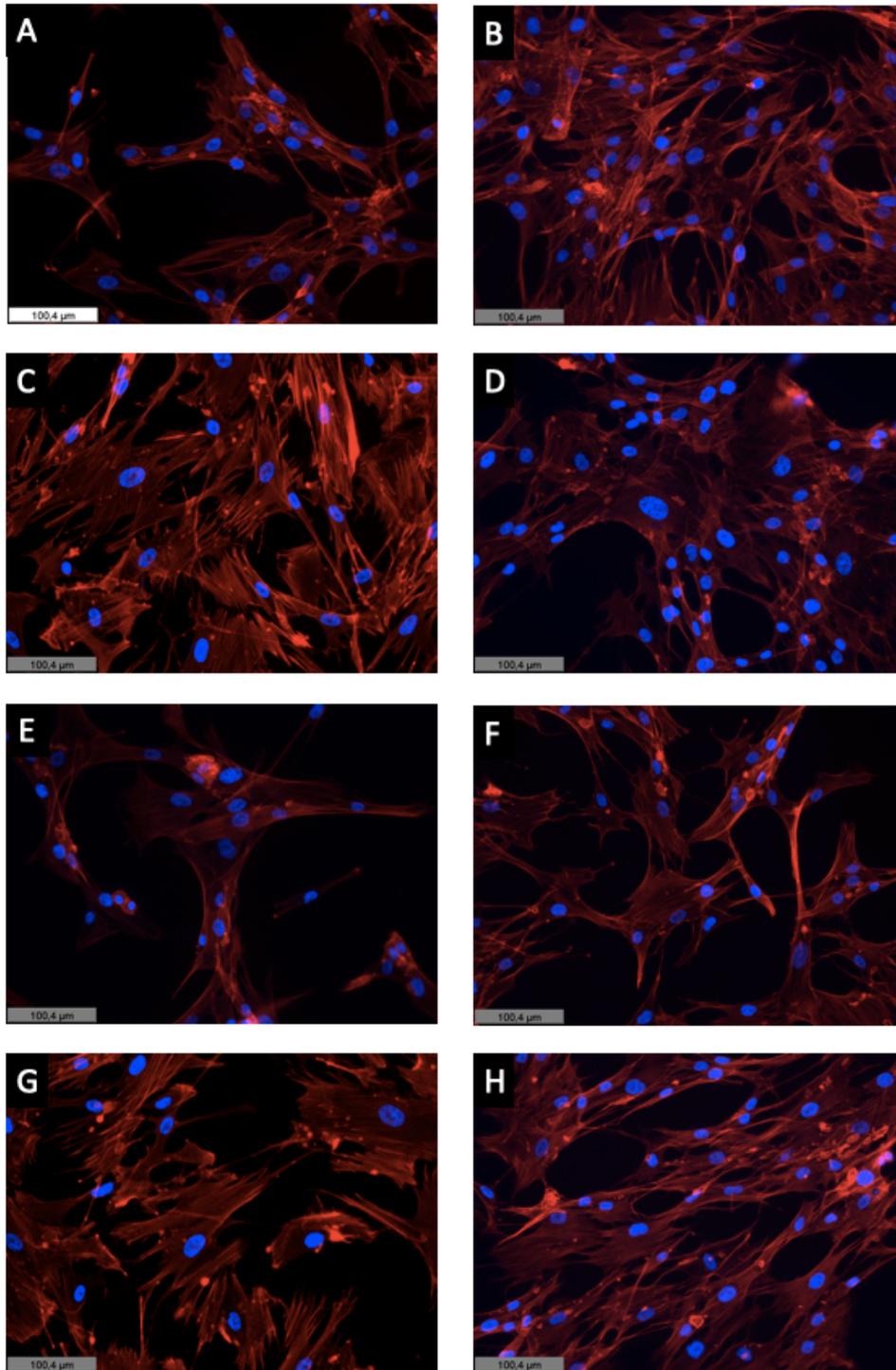
##### **4.4.1. Organización del citoesqueleto.**

Uno de los eventos que ocurren en el microambiente tumoral, consiste en la transición de fibroblastos estromales a células denominadas miofibroblastos (CAFs), con características mixtas entre fibroblastos y fibras musculares lisas. Durante dicha transición se producen una serie de alteraciones morfológicas que implican, entre otras la reorganización de la actina fibrilar del citoesqueleto. Con la idea de estudiar dichas alteraciones, se realizaron tinciones fluorescentes con faloidina rodamina.

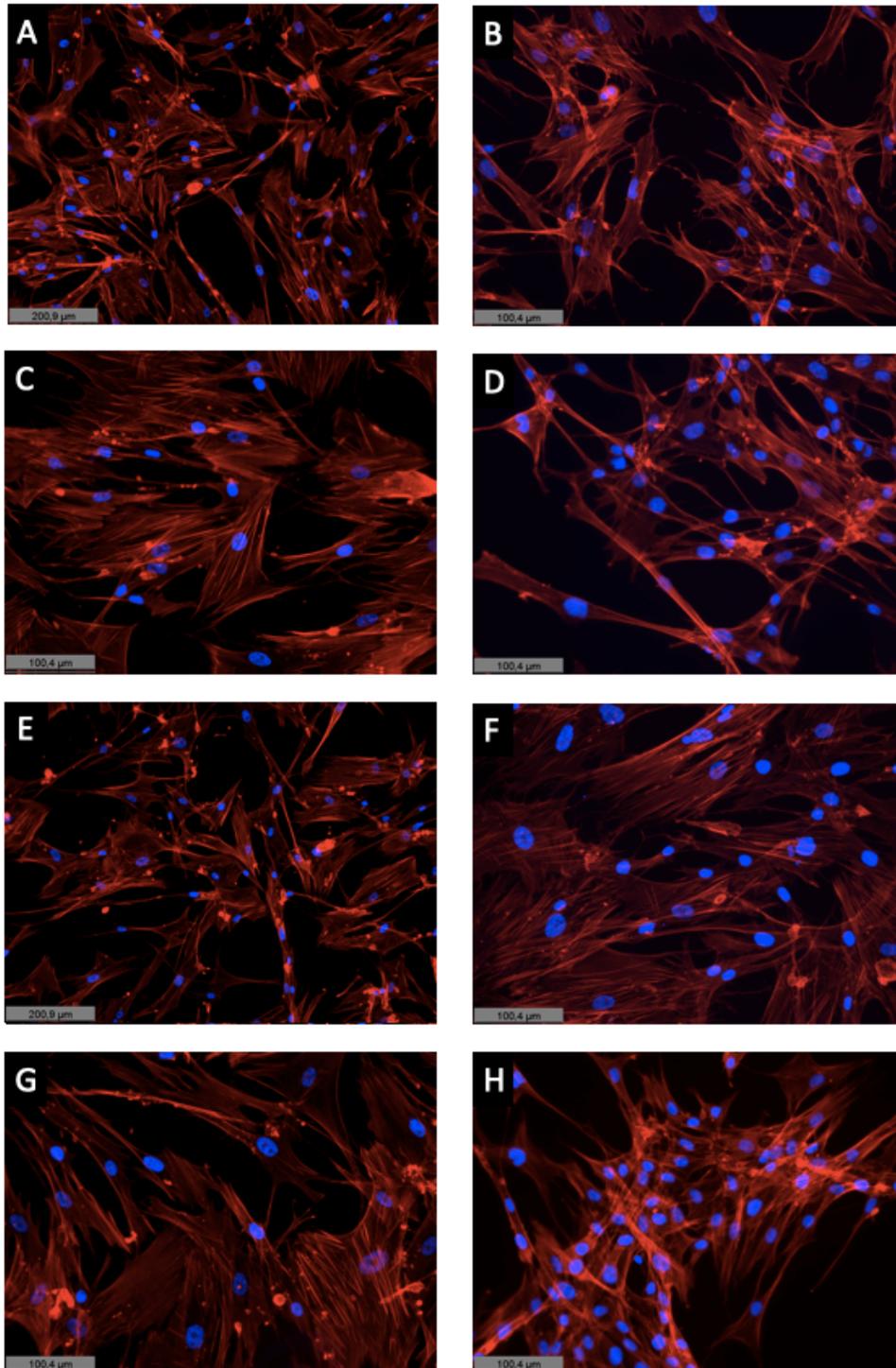
En las figuras 26-29 se resumen los resultados obtenidos de los experimentos realizados con fibroblastos sanos y tumorales tratados con THC y CBD solos o en combinación y en presencia o ausencia de TGF $\beta$ -1 5 ng/ml.

Estas alteraciones, según el tratamiento en cada caso, de forma más general se pueden observar en las figuras 26 y 27. En cambio, en las figuras 28 y 29 se puede observar con más claridad la morfología de las células tratadas.

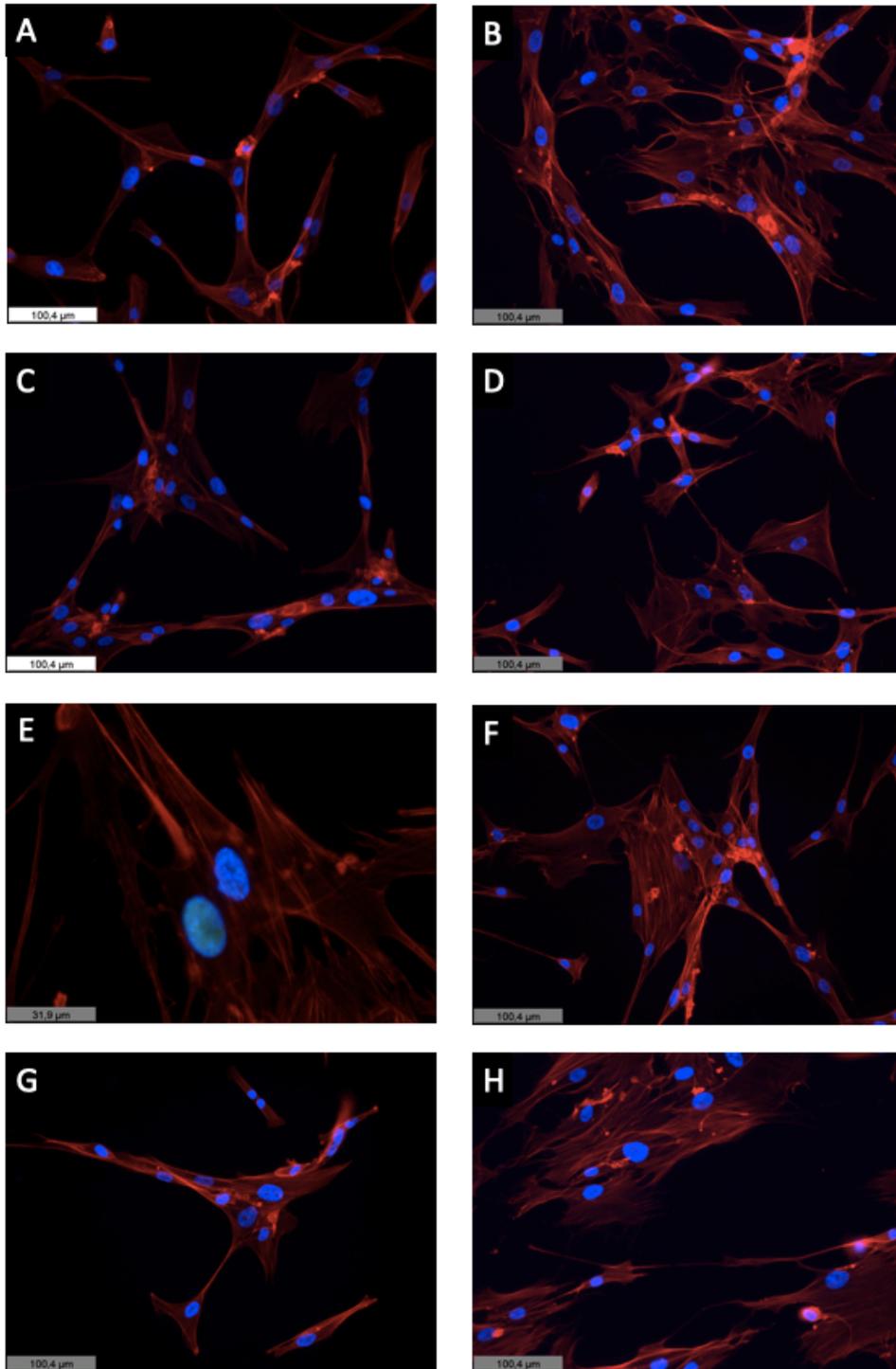
Respecto a las diferentes figuras, en todas las imágenes ven marcadas las fibras de actina de color rojo, sobre todo en las que se ha suministrado el tratamiento con TGF $\beta$ -1.



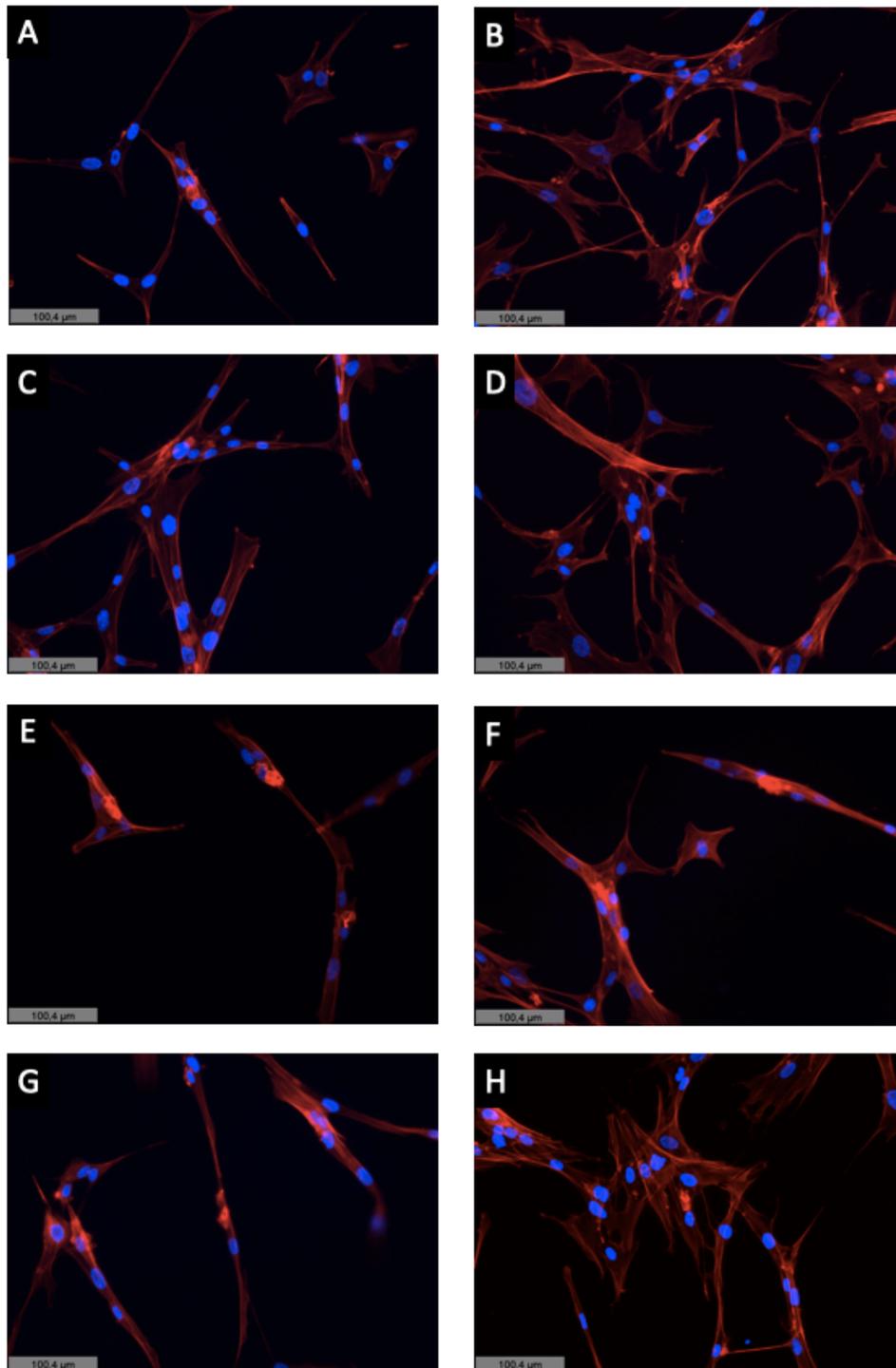
**Figura 26.** Imágenes de los fibroblastos tratados con los agonistas cannabinoides con un aumento de 20x. Los paneles A, C, E y G se corresponden con fibroblastos sanos y los B, D, F y H con fibroblastos tumorales. Se incluyen los siguientes grupos experimentales: control (A-B), THC 30  $\mu$ M (C-D), CBD 30  $\mu$ M (E-F) y THC + CBD 10  $\mu$ M (G-H).



**Figura 27.** Imágenes de los fibroblastos tratados con los agonistas cannabinoides en presencia de TGF- $\beta$ 1 con aumento de 20x. Los paneles A, C, E y G se corresponden con fibroblastos sanos y los B, D, F y H con fibroblastos tumorales. Se incluyen los siguientes grupos experimentales control (A-B), THC 30  $\mu$ M (C-D), CBD 30  $\mu$ M (E-F) y THC + CBD 10  $\mu$ M (G-H).



**Figura 28.** Imágenes de los fibroblastos tratados con los agonistas cannabinoides con un aumento de 20x. Los paneles A, C, E y G se corresponden con fibroblastos sanos y los B, D, F y H con fibroblastos tumorales. Se incluyen los siguientes grupos experimentales: control (A-B), THC 30  $\mu$ M (C-D), CBD 30  $\mu$ M (E-F) y THC + CBD 10  $\mu$ M (G-H).

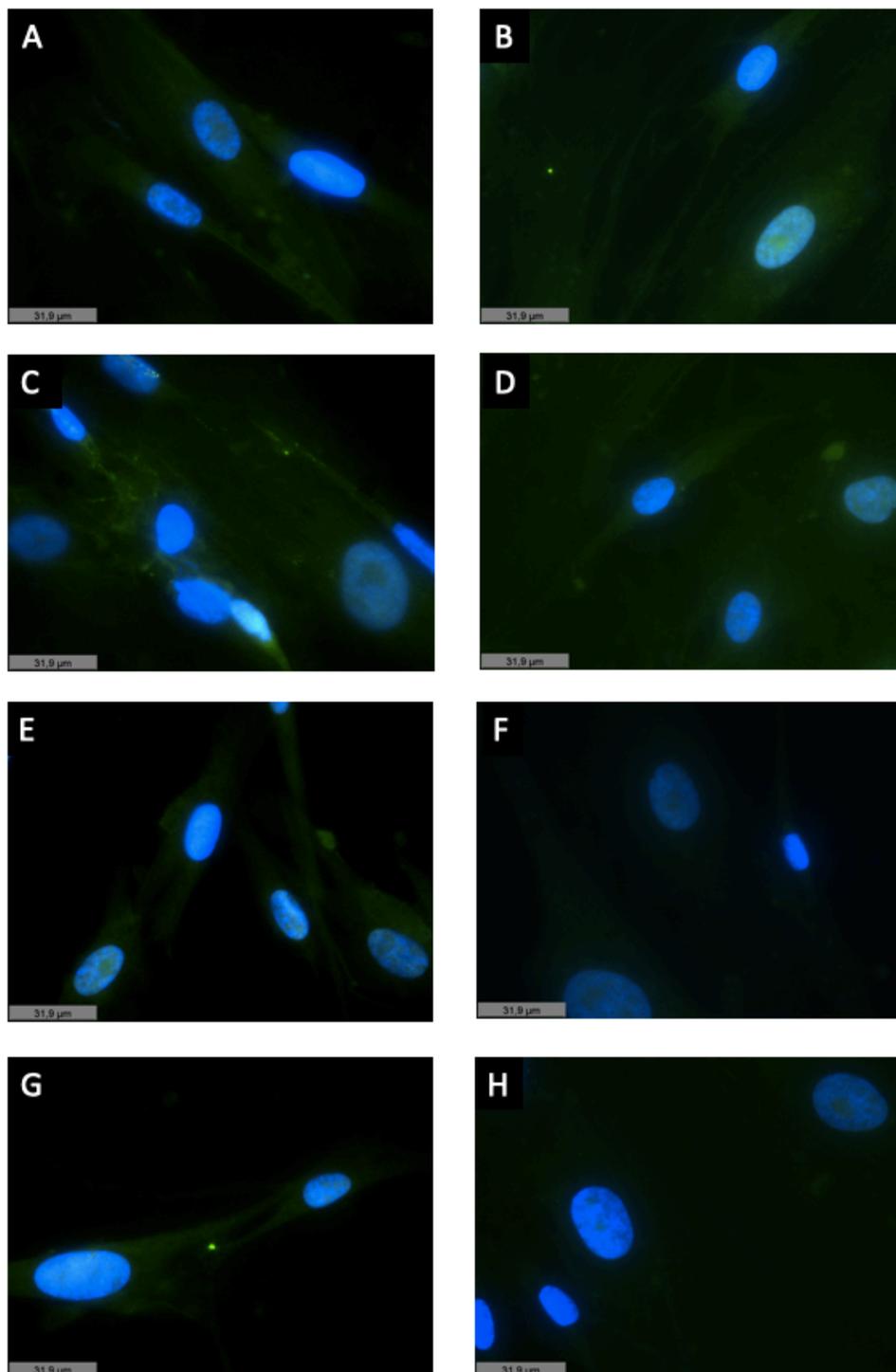


**Figura 29.** Imágenes de los fibroblastos tratados con los agonistas cannabinoides en presencia de TGF- $\beta$ 1 con un aumento de 20x. Los paneles A, C, E y G se corresponden con fibroblastos sanos y los B, D, F y H con fibroblastos tumorales. Se incluyen los siguientes grupos experimentales: control (A-B), THC 30  $\mu$ M (C-D), CBD 30  $\mu$ M (E-F) y THC+ CBD 10  $\mu$ M (G-H).

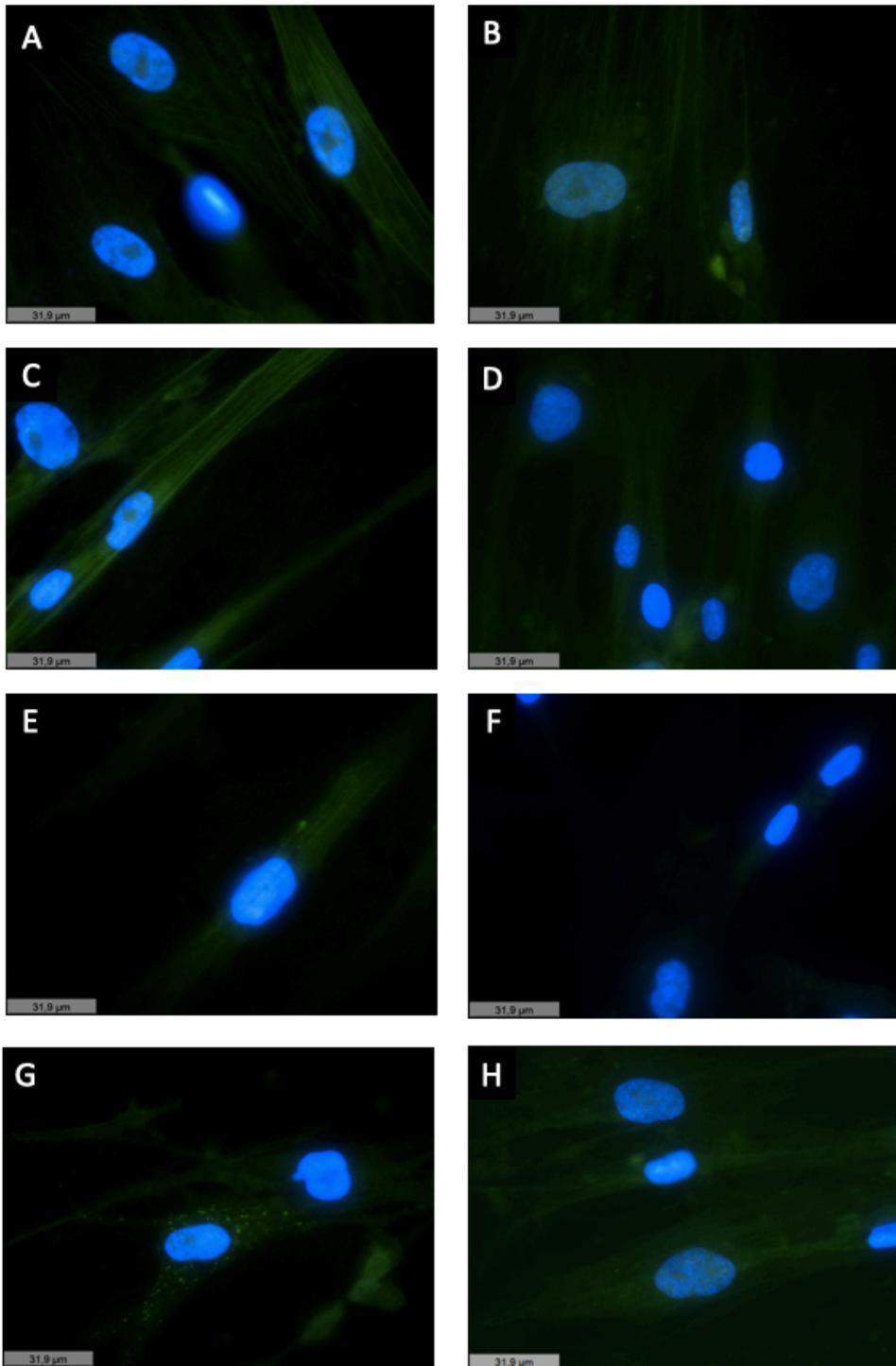
#### **4.4.2. Estudio de la expresión de ASMA mediante inmunofluorescencia en fibroblastos.**

La expresión de ASMA en los fibroblastos tratados con los agonistas cannabinoides y TGF- $\beta$ 1 además de estudiarse por biología molecular, calculando su expresión relativa, también se estudió mediante inmunofluorescencia de manera cualitativa como se ha explicado en el apartado 3.6.

Una vez seguido el protocolo de la inmunofluorescencia para el ASMA se obtuvieron las imágenes de las figuras 30 y 31. En ellas se pueden observar cómo están marcadas con fluorescencia verde las fibras de actina, sobre todo en los fibroblastos que han sido tratados con TGF- $\beta$ 1. Esto ocurre puesto que fibroblastos tumorales (CAFs) tienen ciertas características de unas células denominadas miofibroblastos, las cuales presentan características mixtas entre fibroblastos y fibras musculares lisas. Además, los fibroblastos sanos también la expresan, es por ello que se confirma que la TEM inducida por el TGF- $\beta$ 1 produce una reorganización de la actina en estas células con su consiguiente marcación.



**Figura 30.** Imágenes de la inmunofluorescencia con ASMA de los fibroblastos tratados con los agonistas cannabinoides con un aumento de 60x. Los paneles A, C, E y G se corresponden con fibroblastos sanos y los B, D, F y H con fibroblastos tumorales. Se incluyen los siguientes grupos experimentales: control (A-B), THC 30  $\mu$ M (C-D), CBD 30  $\mu$ M (E-F) y THC + CBD 10  $\mu$ M (G-H).

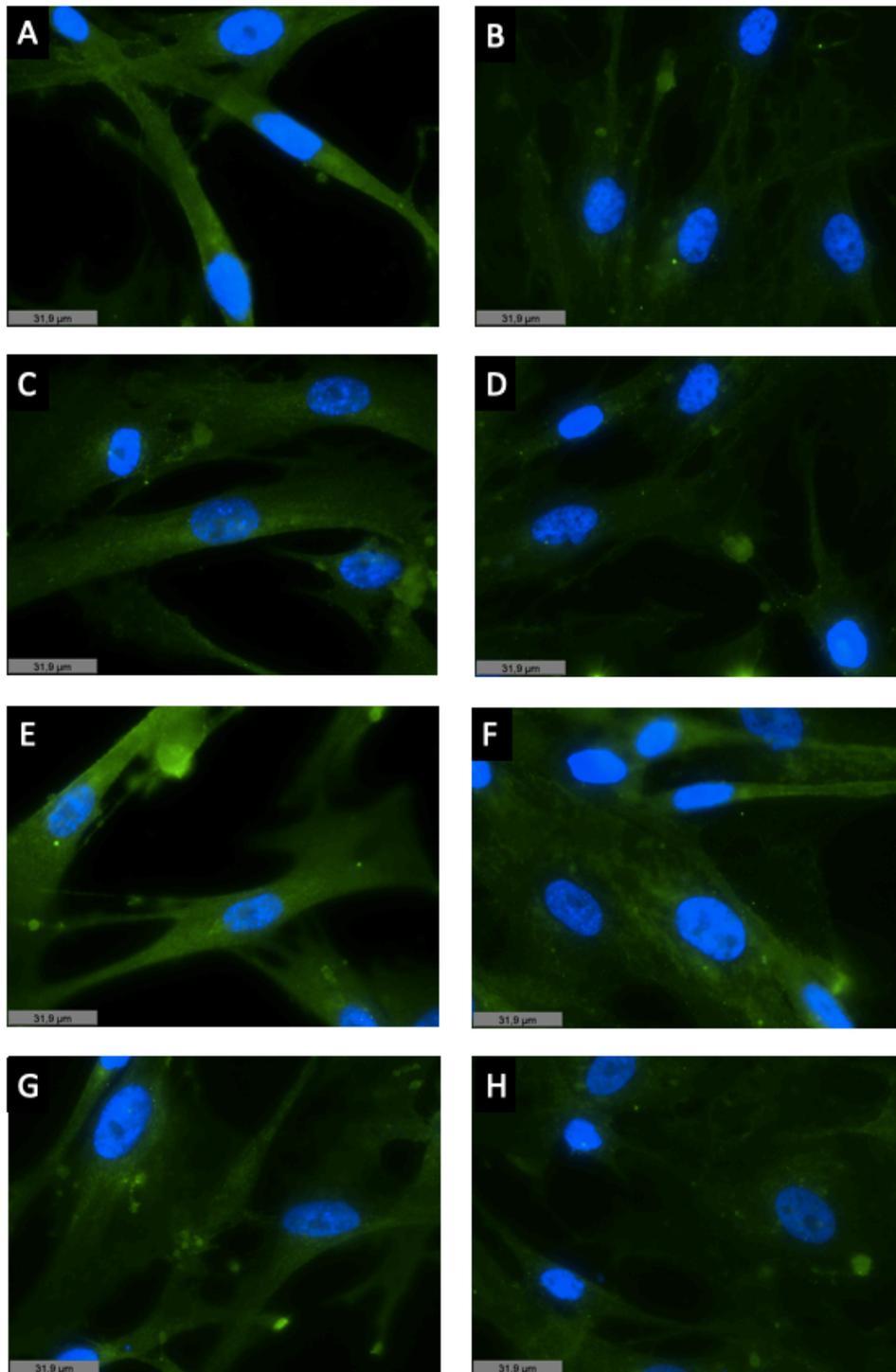


**Figura 31.** Imágenes de la inmunofluorescencia con ASMA de los fibroblastos tratados con los agonistas cannabinoides y TGF- $\beta$ 1 con un aumento de 60x Los paneles A, C, E y G se corresponden con fibroblastos sanos y los B, D, F y H con fibroblastos tumorales. Se incluyen los siguientes grupos experimentales: control (A-B), THC 30  $\mu$ M (C-D), CBD 30  $\mu$ M (E-F) y THC + CBD 10  $\mu$ M (G-H).

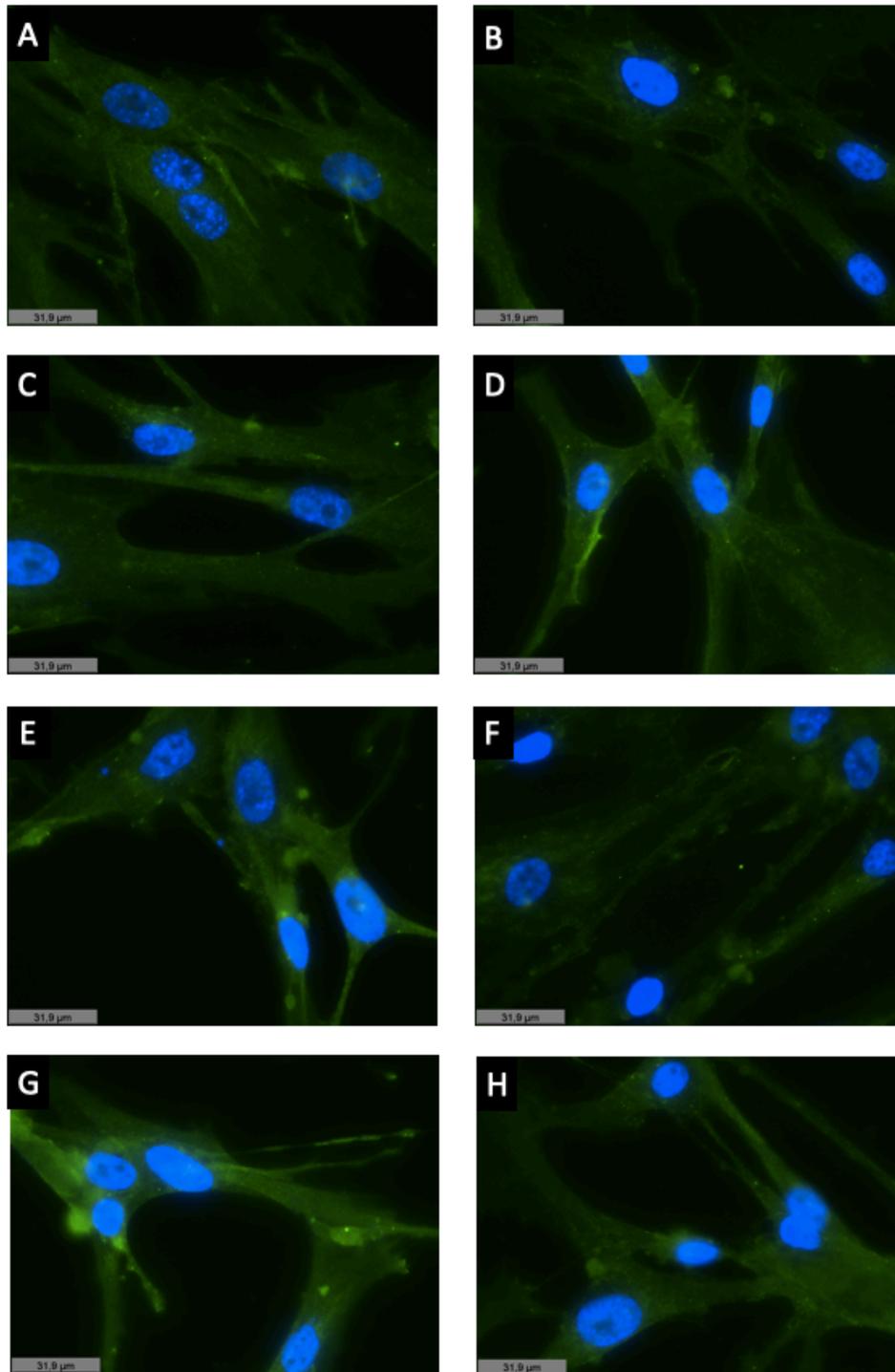
#### **4.4.3. Estudio de la expresión de FSP1 mediante inmunofluorescencia en fibroblastos.**

La expresión de FSP-1 en los fibroblastos tratados con los agonistas cannabinoides y TGF- $\beta$ 1 además de estudiarse por biología molecular, calculando su expresión relativa, también se estudió mediante inmunofluorescencia como se ha explicado en el apartado 3.6.

Tras seguir el protocolo de la técnica se sacaron las imágenes de las figuras 32 y 33. En ellas se puede apreciar un color verde que indica la presencia de FSP-1. En la Figura 33 se aprecia una mayor intensidad de fluorescencia. Esto puede ser porque el TGF- $\beta$ 1 como se viene confirmando impulsa la TEM y la proliferación de estas células y, por tanto, la expresión de FSP-1 aumenta (Kahounova et al.,2018).



**Figura 32.** Imágenes de la inmunofluorescencia con FSP-1 de los fibroblastos tratados con los agonistas cannabinoides con un aumento de 60x. Los paneles A, C, E y G se corresponden con fibroblastos sanos y los B, D, F y H con fibroblastos tumorales. Se incluyen los siguientes grupos experimentales: control (A-B), THC 30  $\mu$ M (C-D), CBD 30  $\mu$ M (E-F) y THC + CBD 10  $\mu$ M (G-H).



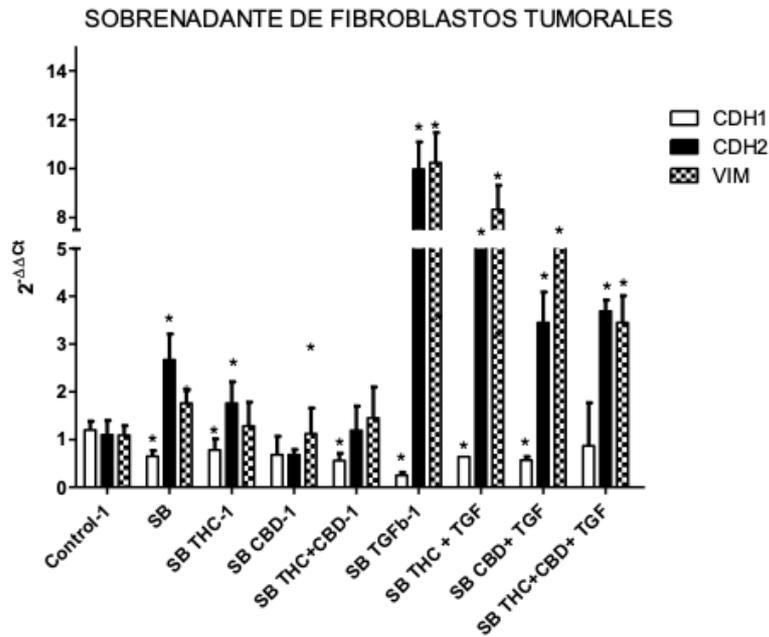
**Figura 33.** Imágenes de la inmunofluorescencia con FSP-1 de los fibroblastos tratados con los agonistas cannabinoides y TGF- $\beta$ 1 con un aumento de 60x Los paneles A, C, E y G se corresponden con fibroblastos sanos y los B, D, F y H con fibroblastos tumorales. Se incluyen los siguientes grupos experimentales: control (A-B), THC 30  $\mu$ M (C-D), CBD 30  $\mu$ M (E-F) y THC + CBD 10  $\mu$ M (G-H).

#### **4.5. Regulación de la expresión génica de la línea celular H460 tratada con los sobrenadantes de los fibroblastos.**

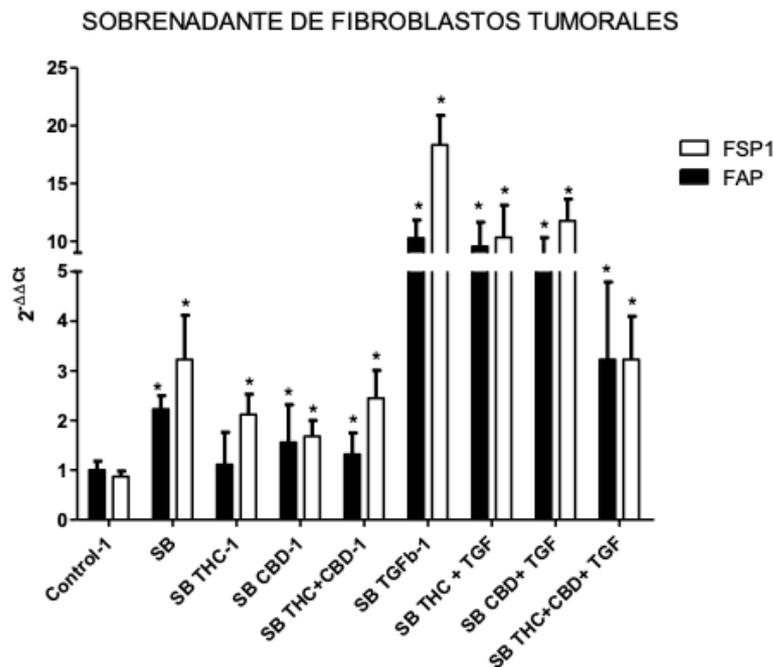
Se hizo uso de la técnica Real Time PCR para estudiar la expresión relativa de los genes CDH1, CDH2, VIM, FAP y FSP-1 relacionados con la TEM en la línea celular tumoral H460 como se explica en el apartado 3.5. Los resultados se muestran en las figuras 34-37. Estos genes se han demostrado estar relacionados con la TEM, ya que su expresión varía cuando se da este proceso. Como se ha descrito en la introducción la E-cadherina es una proteína involucrada en las uniones intercelulares producida por el gen CDH1. La N-cadherina es una proteína producida por el gen CDH2, de la cual se aumenta la expresión durante la TEM y, además, sustituye a la E-cadherina en este proceso. La expresión del gen VIM es propio de los fibroblastos y su sobreexpresión está relacionada con la TEM (Kalluri et al.,2009). La expresión de los genes FAP y FSP-1 se consideran marcadores de la TEM , ya que su expresión aumenta durante la misma (Kahounova et al.,2018). Es importante recalcar que el TGF- $\beta$ 1 se ha demostrado ser un claro potenciador de la TEM en células bronquiales como son las H460 (Doerner & Zuraw, 2009).

En la mayoría de las condiciones (control negativo y tratamientos con sobrenadantes) ocurrió lo esperado, las células experimentaron los cambios relacionados con la TEM: la expresión de CDH1 fue menor respecto el control, ya que se reprimió su producción y aumentó la expresión de CDH2, su sustituta. Además, la expresión de VIM, FAP y FSP-1, también fue mayor respecto del control.

Tal y como se resumen en la Figura 34, el tratamiento con sobrenadante de fibroblastos tumorales produjo una inhibición en la expresión de CDH1 y un incremento en la expresión de CDH2 y de VIM, tanto en ausencia como en presencia de TGF- $\beta$ 1. La adición de dicho factor potenció significativamente los efectos del sobrenadante. Dicho efecto fue discretamente modificado como efecto del tratamiento con THC y CBD en todos los grupos experimentales, siendo más marcado el efecto en aquellos grupos tratados con la combinación de fármacos. Una tendencia similar se registró para la expresión de los genes FAP y FSP tal y como se resume en la Figura 35, su expresión fue inducida por el sobrenadante de fibroblastos tumorales y potenciada como efecto de la estimulación con TGF- $\beta$ 1. De nuevo se registró una inhibición de dicho efecto en los grupos tratados tanto con THC como con CBD. De igual manera la combinación de ambos cannabinoides produjo un mayor efecto que los mismos por separado.



**Figura 34.** Expresión relativa de los genes CDH1, CDH2 y VIM en la línea celular H460 tratada con los sobrenadantes de los fibroblastos tumorales. Se muestran los resultados obtenidos para una n de 2. \*  $p < 0.05$  respecto al grupo control. En el eje Y está representada la expresión como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y en el eje X las diferentes condiciones experimentales.



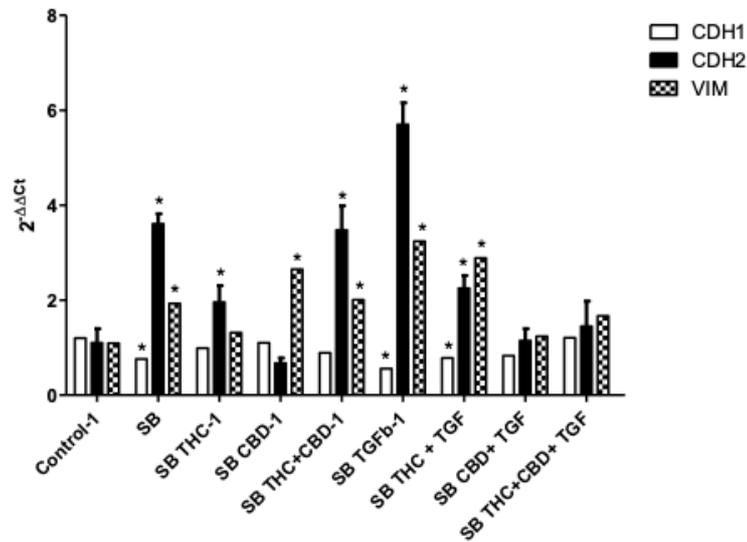
**Figura 35.** Expresión relativa de los genes FAP y FSP-1 en la línea celular H460 tratada con los sobrenadantes de los fibroblastos tumorales. Se muestran los resultados obtenidos para una n de 2. \*  $p < 0.05$  respecto al grupo control. En el eje Y está representada la expresión como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y en el eje X las diferentes condiciones experimentales.

En las figuras 36 y 37, están representados los resultados que se obtuvieron al tratar las células con los diferentes sobrenadantes de los fibroblastos sanos. Se observa una tendencia similar a la registrada para las células tratadas con sobrenadante de células tumorales para la expresión de los genes CDH1, CDH2 y VIM (Figura 36), así como para los genes FAP y FSP1 (Figura 37). En las condiciones en ausencia de TGF- $\beta$ 1 no ocurrió lo esperado, puesto que las células experimentaron los cambios relacionados con la TEM como en las células tratadas con el

sobrenadante de los fibroblastos tumorales. En principio el sobrenadante de los fibroblastos sanos en ausencia de TGF-β1 no debería haber potenciado la TEM, es por ello que no se descarta el hecho de que las propias células H460 al ser tumorales hayan secretado TGF-β1 de tal manera que se auto-induzcan la TEM.

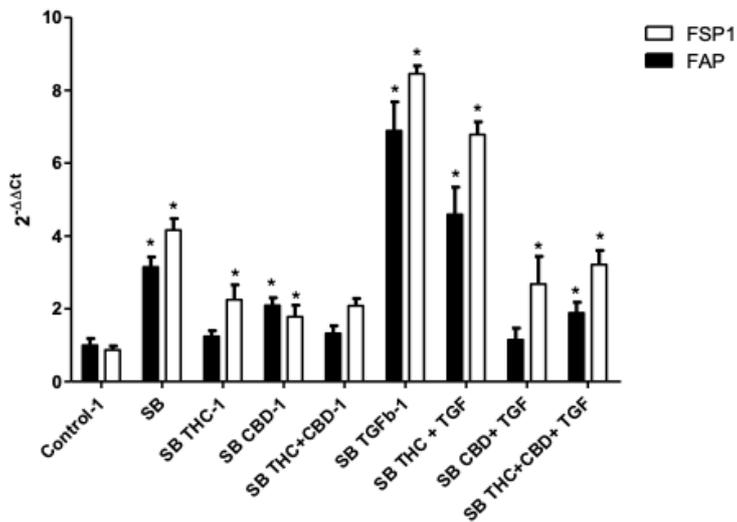
Comparando estos los resultados con los que se obtuvieron con los sobrenadantes tumorales recalcar que en este caso la expresión de los genes en proporción fue menor, sobre todo en aquellos sobrenadantes que incluyeron TGF-β1.

SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS NORMALES



**Figura 36.** Expresión relativa de los genes CDH1, CDH2 y VIM en la línea celular H460 tratada con los sobrenadantes de los fibroblastos sanos/normales. Se muestran los resultados obtenidos para una n de 2. \* p< 0.05 respecto al grupo control. En el eje Y está representada la expresión como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y en el eje X las diferentes condiciones experimentales.

SOBRENADANTE DE FIBROBLASTOS NORMALES

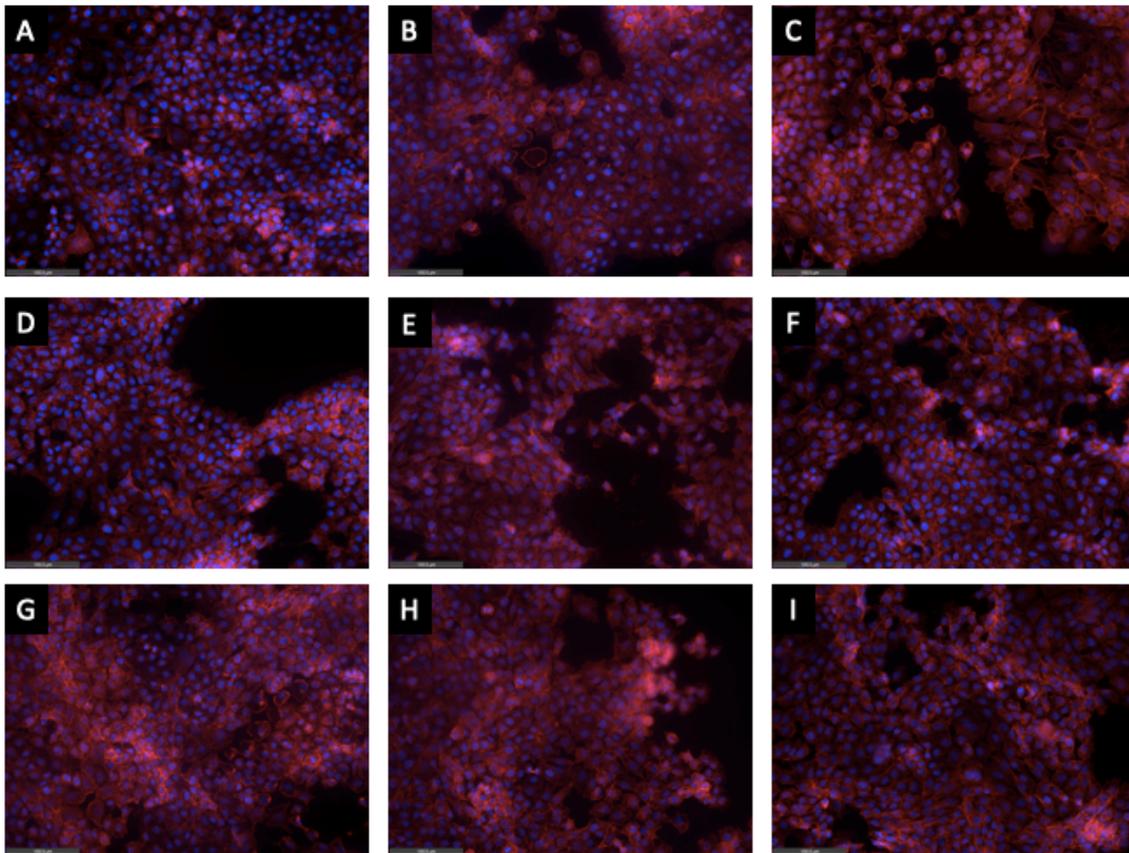


**Figura 37.** Expresión relativa de los genes FAP y FSP-1 en la línea celular H460 tratada con los sobrenadantes de los fibroblastos sanos/normales. Se muestran los resultados obtenidos para una n de 2. \* p< 0.05 respecto al grupo control. En el eje Y está representada la expresión como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y en el eje X las diferentes condiciones experimentales.

#### 4.6. Análisis morfológico de la línea celular H460 tratada con los sobrenadantes de los fibroblastos.

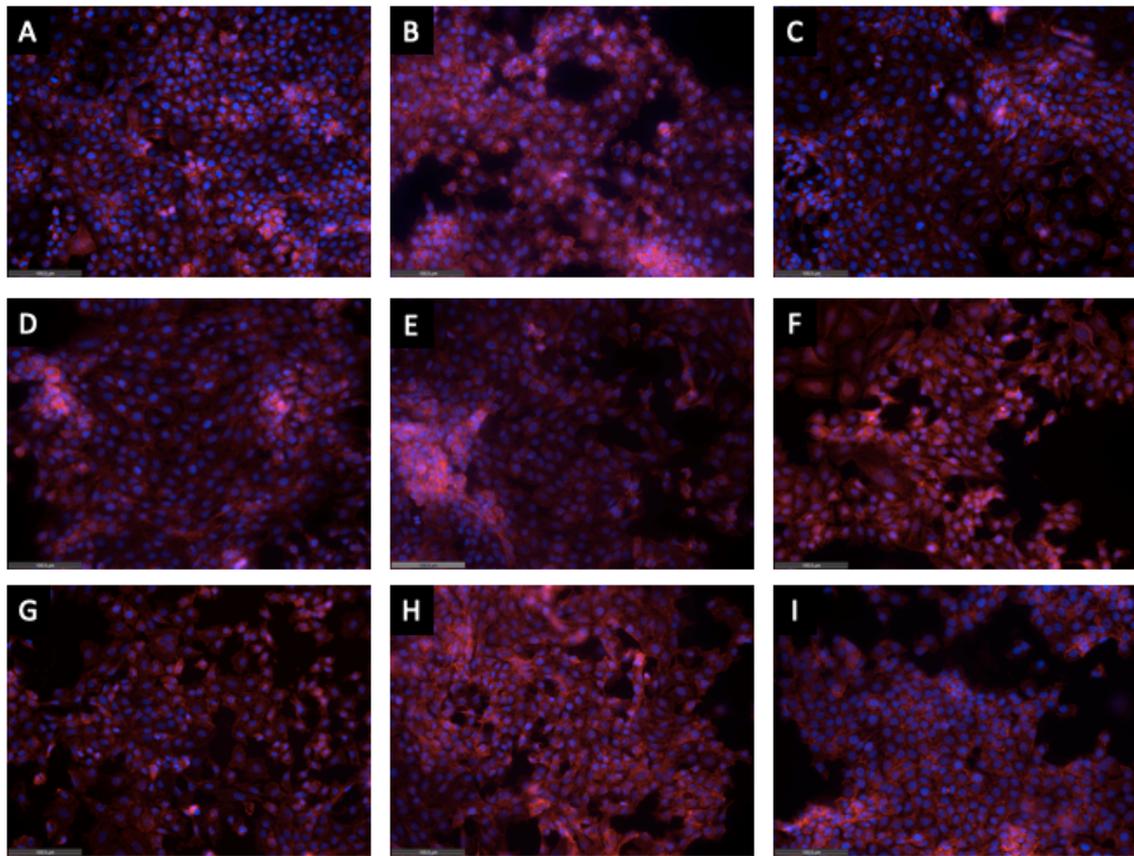
Como se ha explicado a lo largo de este trabajo, la TEM está asociada con unos cambios fenotípicos que se pueden detectar mediante el cambio de la morfología de las células. Para poder observar estos cambios se llevó la técnica explicada en el apartado 3.6. Los cambios morfológicos esperados en las células de la línea H460 tratadas con los sobrenadantes fueron: separaciones entre las células por la desaparición de la E-cadherina y, por tanto, menos sitios de unión, elongación del citoesqueleto y marcación de las fibras de actina. (Lindsey, 2014; Thiery, 2002)

En la Figura 38, la Figura 39, la Figura 40 y la Figura 41 se pueden observar las imágenes obtenidas tras la tinción con faloidina de la línea celular H460 con los diferentes tratamientos. Se muestran imágenes panorámicas (Figura 38) y de detalle (Figura 39) de los resultados obtenidos.



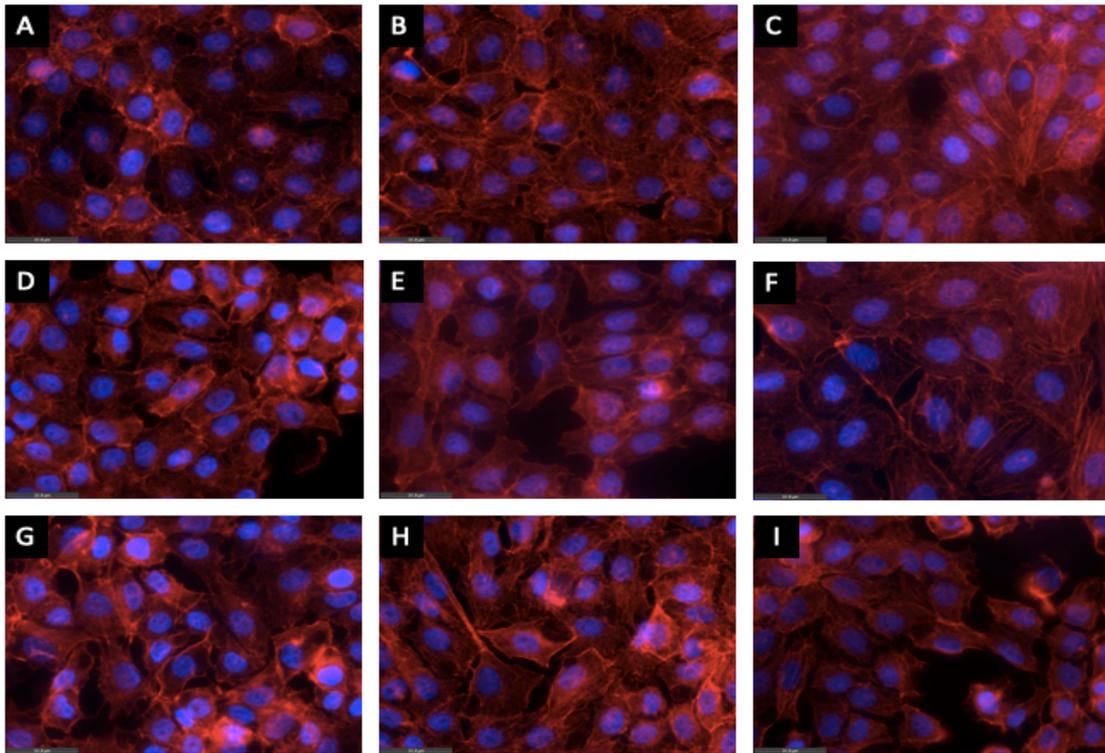
**Figura 38.** Imágenes de línea H460 tratados con los sobrenadantes de fibroblastos. Se muestran los siguientes grupos experimentales: control (A), sobrenadante de fibroblastos sanos (D), sobrenadante de fibroblastos tumorales (G), sobrenadante de fibroblastos normales tratados con THC (B), CBD (E) y THC+CBD (H), sobrenadante de fibroblastos tumorales tratados con THC (C), CBD (F) y THC + CBD (I).

En la Figura 38 y la Figura 39 se pueden apreciar los espacios que existen entre las células con las consiguientes pérdidas de los sitios de unión. Los sitios de unión se observan como líneas rojas muy marcadas entre las células.

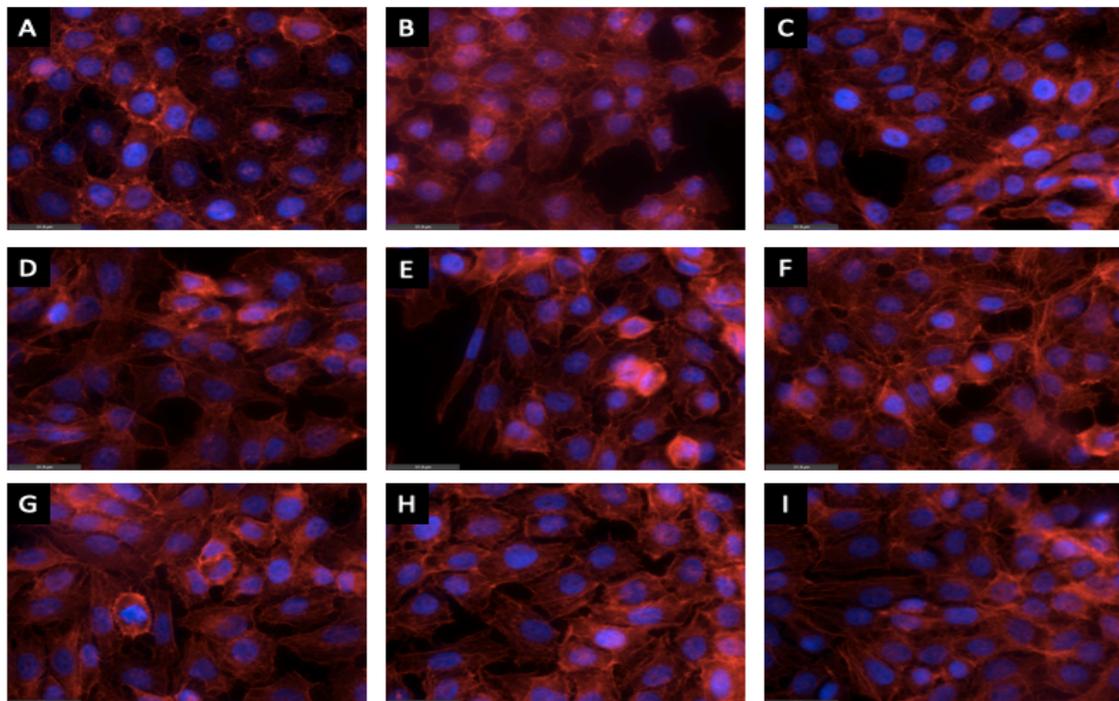


**Figura 39.** Imágenes de línea H460 tratados con los sobrenadantes de fibroblastos tratados con TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml. Se muestran los siguientes grupos experimentales: control (A), sobrenadante de fibroblastos sanos (D), sobrenadante de fibroblastos tumorales (G), sobrenadante de fibroblastos normales tratados con THC (B), CBD (E) y THC+CBD (H), sobrenadante de fibroblastos tumorales tratados con THC (C), CBD (F) y THC + CBD (I).

Para poder apreciar el cambio de la morfología del citoesqueleto y la marcación de las fibras de actina se deben observar la Figura 40 y la Figura 41. El citoesqueleto de las células tratadas con los diferentes sobrenadantes tiene una forma más elongada mientras que las células del control tienen la morfología poligonal propia de las H460. En estas figuras también se puede observar la pérdida de los sitios de unión y las separaciones entre las células.



**Figura 40.** Imágenes de línea H460 tratados con los sobrenadantes con un aumento de 60x. Se muestran los siguientes grupos experimentales: control (A), sobrenadante de fibroblastos sanos (D), sobrenadante de fibroblastos tumorales (G), sobrenadante de fibroblastos normales tratados con THC (B), CBD (E) y THC+CBD (H), sobrenadante de fibroblastos tumorales tratados con THC (C), CBD (F) y THC + CBD (I).



**Figura 41.** Imágenes de línea H460 tratados con los sobrenadantes y TGF-β1 5 ng/ml con un aumento de 60x. Se muestran los siguientes grupos experimentales: control (A), sobrenadante de fibroblastos sanos (D), sobrenadante de fibroblastos tumorales (G), sobrenadante de fibroblastos normales tratados con THC (B), CBD (E) y THC+CBD (H), sobrenadante de fibroblastos tumorales tratados con THC (C), CBD (F) y THC + CBD (I).

## 5. CONCLUSIONES.

El cáncer resultado de un crecimiento anormal de las células, en este complejo proceso intervienen diversas rutas de señalización, así como diferentes sustancias que conjuntamente orquestan una serie de cambios tanto en las propias células como en su microambiente.

Actualmente los tratamientos principales (cirugía, quimioterapia y radioterapia) eliminan el tumor primario, pero no tienen tanta eficacia contra la metástasis. En el cáncer de pulmón ocurre que este no se suele detectar hasta que está en un estado avanzado y se ha diseminado a otras partes del cuerpo. Por ello es importante investigar sobre los procesos involucrados en la metástasis como la TEM para así descubrir nuevas dianas terapéuticas y marcadores con el fin de evitar que se produzca. La detección temprana de los marcadores es crucial para un mejor pronóstico de la enfermedad.

Los estudios con agonistas cannabinoides están abriendo puertas al desarrollo de nuevos tratamientos complementarios a los utilizados actualmente con el fin de mejorar el pronóstico tanto de los pacientes que desarrollan metástasis como los que no.

De acuerdo a los objetivos marcados, tras haberse desarrollado este trabajo se puede afirmar que el modelo *in vitro* planteado es válido para estudiar el efecto de los agonistas cannabinoides junto al TGF- $\beta$ 1 sobre los CAFs. Además, también se ha confirmado que los CAFs tratados con los cannabinoides no interactúan de la misma manera con las células tumorales.

Aunque, bien es cierto que hay aspectos que sería mejor modificar de cara a tener ensayos y resultados más reproducibles. Por ejemplo, sería conveniente utilizar líneas celulares de fibroblastos establecidas y no obtenidas a partir de un paciente, ya que estas cuando son suministradas pueden contener más de un tipo celular. También sería interesante realizar todos los ensayos con todas las líneas celulares tumorales, no solo con la línea H460.

Como conclusión, se puede decir que gracias a este trabajo se asientan las bases para futuros modelos experimentales que incrementan las evidencias científicas que respalden la hipótesis de que los agonistas cannabinoides tienen un poder antitumoral.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

AECC. (2020). Cáncer de pulmón. AECC. Recuperado de: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-pulmon> [21/10/2020].

Almazán-Moga, A., Zarzosa, P., Molist, C., Velasco, P., Pyczek, J., Simon-Keller, K., ... & Soriano, A. (2017). Ligand-dependent Hedgehog pathway activation in Rhabdomyosarcoma: the oncogenic role of the ligands. *British journal of cancer*, 117(9), 1314-1325. Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420-1428.

Arvelo, F., & Poupon, M. F. (2001). Aspectos moleculares y celulares de la metástasis cancerosa. *Acta Cient Venez*, 52(4), 304-12.

Battista, N., Di Tommaso, M., Bari, M., & Maccarrone, M. (2012). The endocannabinoid system: an overview. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 6, 9.

Blandin Knight, S., Crosbie, P. A., Balata, H., Chudziak, J., Hussell, T., & Dive, C. (2017). Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open biology*, 7(9), 170070.

Bremnes, R. M., Dønnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Andersen, S., Sirera, R., ... & Busund, L. T. (2011). The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology*, 6(1), 209-217.

Brown, I., Cascio, M. G., Rotondo, D., Pertwee, R. G., Heys, S. D., & Wahle, K. W. (2013). Cannabinoids and omega-3/6 endocannabinoids as cell death and anticancer modulators. *Progress in lipid research*, 52(1), 80-109.

Bu, L., Baba, H., Yoshida, N., Miyake, K., Yasuda, T., Uchihara, T., ... & Ishimoto, T. (2019). Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Oncogene*, 38(25), 4887-4901.

Cannabis Consciente. (n.d.). Sistema Endocannabinoide. Cannabis Consciente. Recuperado de: <http://www.cannabisconsciente.com/sistema-endocannabinoide> [25/11/2020].

- Centers for Disease Control and Prevention. (2020, 22 septiembre). United States Cancer Statistics: Data visualizations. CDC. Recuperado de:  
<https://gis.cdc.gov/cancer/USCS/DataViz.html> [22/10/2020].
- Cheng, F., Shen, Y., Mohanasundaram, P., Lindström, M., Ivaska, J., Ny, T., & Eriksson, J. E. (2016). Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF- $\beta$ -Slug signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(30), E4320-E4327.
- Cirri, P., & Chiarugi, P. (2011). Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *American journal of cancer research*, *1*(4), 482.
- Doerner, A. M., & Zuraw, B. L. (2009). TGF- $\beta$  1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1 $\beta$  but not abrogated by corticosteroids. *Respiratory research*, *10*(1), 1-15.
- Felibert, P., Quintana, J., & Arvelo, F. (2009). Metaloproteasas Propiedades, funciones y sus usos como blancos terapéuticos en el tratamiento antineoplásico. *Acta Científica Venezolana*, *60*(1-2).
- Fundación CANNA. (2020) El sistema endocannabinoide. Fundación CANNA: Investigación y análisis de Cannabis. Recuperado de: <https://www.fundacion-canna.es/sistema-endocannabinoide>.
- Global Cancer Observatory. (2018). World Health Organization. Recuperado de:  
<https://gco.iarc.fr> [20/10/2020].
- Grotenhermen, F. (2006). Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. *Cannabinoids*, *1*(1), 10-14.
- Hay, E. D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Cells Tissues Organs*, *154*(1), 8-20.

- HempMeds. (2019, 15 agosto). Diferencias entre el CBD y el THC. HempMeds Mexico.  
Recuperado de: <https://hempmedsmx.com/diferencias-entre-el-cannabidiol-y-el-thc>.  
<https://www.cannabis-med.org/spanish/bulletin/iacm.php> [22/10/2020].
- Hua, H., Li, M., Luo, T., Yin, Y., & Jiang, Y. (2011). Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(23), 3853-3868.
- IACM. (2020) Boletín de la IACM. Asociación Internacional por el Cannabis como Medicamento.
- Kahounová, Z., Kurfürstová, D., Bouchal, J., Kharraishvili, G., Navrátil, J., Remšík, J., ... & Souček, K. (2018). The fibroblast surface markers FAP, anti-fibroblast, and FSP are expressed by cells of epithelial origin and may be altered during epithelial-to-mesenchymal transition. *Cytometry Part A*, 93(9), 941-951.
- Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., ... & Weinberg, R. A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449(7162), 557-563.
- Katona, I., & Freund, T. F. (2012). Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annual review of neuroscience*, 35, 529-558.
- Katsuno, Y., Lamouille, S., & Derynck, R. (2013). TGF- $\beta$  signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Current opinion in oncology*, 25(1), 76-84.
- Leon, I. (2017). ¿Cuáles son las diferencias entre la PCR, QPCR Y RT QPCR? AllScience: ciencia tecnología y ambiente. Recuperado de:  
<https://www.eallscience.com/blogs/news/cuales-son-las-diferencias-entre-pcr-rt-pcr-qpcr-y-rt-qpcr>.
- Lim, S., Becker, A., Zimmer, A., Lu, J., Buettner, R., & Kirfel, J. (2013). SNAI1-mediated epithelial-mesenchymal transition confers chemoresistance and cellular plasticity by regulating genes involved in cell death and stem cell maintenance. *PloS one*, 8(6), e66558.

- Lindsey, S., & Langhans, S. A. (2014). Crosstalk of oncogenic signaling pathways during epithelial–mesenchymal transition. *Frontiers in oncology*, *4*, 358.
- Liu, T., Zhou, L., Li, D., Andl, T., & Zhang, Y. (2019). Cancer-associated fibroblasts build and secure the tumor microenvironment. *Frontiers in cell and developmental biology*, *7*, 60.
- Marzo, V. D., & Petrocellis, L. D. (2006). Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu. Rev. Med.*, *57*, 553-574.
- Massagué, J. (2008). TGF $\beta$  in cancer. *Cell*, *134*(2), 215-230.
- Medina, L. (2019). *Diseño y aplicación de hidrogeles basados en polisacáridos para ingeniería de tejidos* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Milian, L., Mata, M., Alcacer, J., Oliver, M., Sancho-Tello, M., Martín de Llano, J. J., ... & Carda, C. (2020). Cannabinoid receptor expression in non-small cell lung cancer. Effectiveness of tetrahydrocannabinol and cannabidiol inhibiting cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in vitro. *Plos one*, *15*(2), e0228909.
- Naranjo, T. Á., Noguera-Salvá, R., & Guerrero, F. F. (2009). La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad (parte I). *Revista Española de Patología*, *42*(4), 249-261.
- National Cancer Institute. (2020). Cancer stat facts: lung and bronchus cancer. SEER. Recuperado de: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>.
- Nisticò, P., Bissell, M. J., & Radisky, D. C. (2012). Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *4*(2), a011908.
- Parks, W. C., Wilson, C. L., & López-Boado, Y. S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, *4*(8), 617-629.
- Pisanti, S., Picardi, P., D'Alessandro, A., Laezza, C., & Bifulco, M. (2013). The endocannabinoid signaling system in cancer. *Trends in pharmacological sciences*, *34*(5), 273-282.

- Ramirez-Montagut, T., Blachere, N. E., Sviderskaya, E. V., Bennett, D. C., Rettig, W. J., Garin-Chesa, P., & Houghton, A. N. (2004). FAP  $\alpha$ , a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor. *Oncogene*, *23*(32), 5435-5446.
- Remon, J. (2019, 19 diciembre). Cáncer de pulmón - Mesotelioma. (SEOM). Recuperado de: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/tumores-toracicos-mesotelioma>.
- Rucci, N., Sanitã, P., & Angelucci, A. (2011). Expanding view of the role of matrix metalloproteases in metastatic growth. *Curr Mol Med*, *11*, 609-22.
- Stetler-Stevenson, W. G. (2008). The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Cancer and Metastasis Reviews*, *27*(1), 57-66.
- Strutz, F. (1995). The fibroblast—a (trans-) differentiated cell?. *Nephrol Dial Transplant*, *10*(9), 1504-6.
- Suárez, A. I. T., Sánchez, A. I. F., & Fernández-Carballido, A. (2014, October). Cannabinoides: una prometedora herramienta para el desarrollo de nuevas terapias. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 80, No. 3).
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, *2*(6), 442-454.
- Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, *147*(2), 275-292.
- Wang, J. J., Lei, K. F., & Han, F. (2018). Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*, *22*, 3855-3864.
- Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, *21*(3), 497-503.
- Zeisberg, E. M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., & Kalluri, R. (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer research*, *67*(21), 10123-10128.

Zijlstra, P. (2013, 2 octubre). MORFOLOGIA DE LOS PRINCIPALES CARCINOMAS DE PULMÓN.

Priscila Zijlstra, PATOLOGÍA. <https://pzijlstrapatob.wordpress.com/2013/08/23/43/>

## **DOCUMENTO 2: PRESUPUESTO**

## ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

1. INTRODUCCIÓN DEL PRESUPUESTO .....	1
2. CUADROS DE LA MANO DE OBRA, MATERIALES Y MAQUINARIA.....	1
3. CUADROS DE PRESUPUESTOS PARCIALES Y PRECIOS DESCOMPUESTOS .....	4
4. PRESUPUESTO EJECUCIÓN MATERIAL, POR CONTRATA Y BASE DE LICITACIÓN.....	5

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CÓDIGOS DE LOS RECURSOS EMPLEADOS.....	1
TABLA 2. CUADRO DE LA MANO DE OBRA.....	1
TABLA 3. CUADRO DE LOS MATERIALES.....	1
TABLA 4. CUADRO DE LA MAQUINARIA.....	3
TABLA 5. CUADRO DE PRESUPUESTOS PARCIALES Y PRECIOS DESCOMPUESTOS.....	4
TABLA 6. CUADRO DE PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO.....	11

## 1. INTRODUCCIÓN DEL PRESUPUESTO

A la hora de realizar un trabajo como este se debe realizar una valoración económica de su conjunto y así poder estudiar su viabilidad. A continuación, se detallan las consideraciones y cálculos que se han tenido en cuenta para la realización del presupuesto basado en los procedimientos del capítulo 3. MATERIALES Y MÉTODOS del documento anterior. En la Tabla 1 se muestran los códigos de los recursos empleados.

*Tabla 1. Códigos de los recursos empleados.*

Código	Descripción
P	Personal
MQ	Maquinaria
MAT	Materiales

## 2. CUADROS DE LA MANO DE OBRA, MATERIALES Y MAQUINARIA

En este apartado se muestran los diferentes cuadros correspondientes a los recursos empleados para la realización del presupuesto: mano de obra (Tabla 2), materiales (Tabla 3) y maquinaria (Tabla 4).

Las personas que se han considerado mano de obra se encuentran recogidas en la Tabla 2. El autor del presente TFM lo ha realizado en calidad de ingeniero biomédico. No obstante, no se ha recibido ningún tipo de retribución al respecto.

*Tabla 2. Cuadro de la mano de obra.*

Código	Descripción	Coste unitario(€/h)	Horas de trabajo (h)	Coste (€)
P.1	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	270,00	3240,00
P.2	Primer tutor/a del proyecto de investigación	45,00	30,00	1350,00
P.3	Segundo tutor/a del proyecto de investigación	45,00	20,00	900,00
P.4	Estudiante predoctoral	15,43	40,00	617,20
			<b>Coste total de personal (€)</b>	<b>6107,20</b>

Los materiales empleados para la realización de este trabajo se recogen en la Tabla 3.

*Tabla 3. Cuadro de los materiales.*

Código	Unidad	Descripción	Coste unitario (€/u)	Cantidad	Coste (€)
MAT.1	ud	Kit XTT	34,44	9,00	310,00
MAT.2	ud	A549	595,00	1,00	595,00
MAT.3	L	Agua mQ	0,20	0,016	0,00
MAT.4	mg	Anfotericina B	0,52	10,31	5,40
MAT.5	µL	ASMA	4,10	0,01	0,04
MAT.6	ud	Bata de laboratorio	19,90	1,00	19,90
MAT.7	mL	BSA	6,84	19,20	131,33
MAT.8	ud	Caja de RNasa inhibitor	124,00	1,00	124,00
MAT.9	ud	Caja puntas para micropipeta de 10 µL	60,20	1,00	60,20

MAT.10	ud	Caja puntas para micropipeta de 1000 µL	65,25	1,00	65,25
MAT.11	ud	Caja puntas para micropipeta de 200 µL	39,11	1,00	39,11
MAT.12	mg	CBD	3,49	0,01	0,03
MAT.13	ud	CDH1 250 µL	213,00	1,00	213,00
MAT.14	ud	CDH2 250 µL	213,00	1,00	213,00
MAT.15	ud	Criovirales de 2mL	0,66	5,00	3,30
MAT.16	mg	DAPI	6,96	1,00	6,96
MAT.17	L	Dicloro metanol	30,90	0,06	1,85
MAT.18	L	Dimetil sulfóxido (DMSO)	23,00	0,50	11,50
MAT.19	mL	DMEM	0,06	87,00	5,10
MAT.20	L	Etanol	17,96	0,10	1,80
MAT.21	mL	Faloidina-Rodamina	48,60	0,02	0,97
MAT.22	ud	FAP 250 µL	213,00	0,20	42,60
MAT.23	L	Formol	6,32	0,05	0,32
MAT.24	ud	Frascos T25 de 5 mL	0,09	10,00	0,88
MAT.25	ud	Frascos T75 de 15 mL	0,28	5,00	1,42
MAT.26	ud	FSP1 250 µL	213,00	0,20	42,60
MAT.27	µL	GAPDH	3,60	2,00	7,20
MAT.28	mL	Glucógeno calidad ARN	430,00	0,10	43,00
MAT.29	ud	Guantes de látex	0,12	160,00	19,68
MAT.30	ud	High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit	399,00	1,00	399,00
MAT.31	L	Isopropanol	4,21	0,10	0,42
MAT.32	L	L-Glutamina	150,59	0,01	1,51
MAT.33	ud	Mascarilla quirúrgica	0,62	24,00	14,88
MAT.34	ud	Master mix de Applied Biosystems	413,00	0,50	206,50
MAT.35	ud	Micropipeta de 10 µL	107,38	1,00	107,38
MAT.36	ud	Micropipeta de 200 µL	191,08	1,00	191,08
MAT.37	ud	Micropipeta de de 1000 µL	269,93	1,00	269,93
MAT.38	ud	Microtubos de 1,5 mL	0,05	100,00	5,18
MAT.39	ud	Microtubos de 200 µL	0,04	50,00	1,95
MAT.40	ud	Microtubos de 500 µL	0,08	20,00	1,50
MAT.41	ud	NCI-H1792	805,00	0,01	8,05
MAT.42	ud	NCI-H460	595,00	0,01	5,95
MAT.43	mL	PBS	0,02	10,00	0,16
MAT.44	mL	Penicilina estreptomina	0,39	15,00	5,88
MAT.45	ud	Pipeta multicanal	859,00	1,00	859,00
MAT.46	ud	Pipeta plastica Pasteur de 3 ml	0,09	10,00	0,86
MAT.47	ud	Pipeta serológica 5 mL	54,00	1,00	54,00
MAT.48	ud	Pipeta serológica 10 mL	27,27	1,00	27,27
MAT.49	ud	Placa de 12 pocillos	3,22	8,00	25,76
MAT.50	ud	Placa de 384 pocillos	8,52	1,00	8,52
MAT.51	ud	Placa de 8 pocillos	0,61	5,00	3,05
MAT.52	ud	Placa de 96 pocillos	3,26	5,00	16,30
MAT.53	nm	Random hexamers	14,60	0,10	1,46
MAT.54	mL	RPMI 1640	0,12	179,00	20,94
MAT.55	mL	Suero fetal bovino	0,40	60,00	24,12

MAT.56	mL	Tampón HEPES	0,79	8,00	6,28
MAT.57	µg	TGFB	12,80	0,10	1,28
MAT.58	mg	THC	5,56	0,01	0,06
MAT.59	L	Tripsina	71,80	0,01	0,72
MAT.60	mL	Tritón X-100	0,11	0,50	0,06
MAT.61	mL	TRIzol	2,62	5,00	13,10
MAT.62	mL	Trypan blue	0,32	0,40	0,13
MAT.63	ud	Tubo falcon de 15ml	0,23	5,00	1,17
MAT.64	ud	Tubo falcon de 50ml	0,35	5,00	1,75
MAT.65	ud	VIM 250 µL	213,00	1,00	213,00
MAT.66	ud	S100A4 Antibody FSP1 (15 mg)	402,00	0,01	4,02
MAT.67	ud	Pipeta serológica 25 mL	43,50	1,00	43,50
MAT.68	mg	FITC	1,18	0,01	0,01
				<b>Precio total de materiales (€)</b>	<b>4467,65</b>

La estimación de los costes de la maquinaria requerida para llevar a cabo los diferentes ensayos se recoge en la Tabla 4. Los costes se han estimado mediante la amortización de los equipos, su precio y las horas que se han utilizado aplicando la Ecuación 1:

*Ecuación 1. Cálculo de coste de maquinaria.*

$$A = \frac{\text{Coste del equipo} * \text{Horas de uso}}{\text{Periodo de amortización}}$$

**Tabla 4. Cuadro de la maquinaria.**

Código	Unidad	Maquinaria	Precio unitario (€/h)	Cantidad	Coste (€)
MQ.1	h	Incubador con atmósfera humidificada de CO2	0,52	1821,00	942,93
MQ.2	h	Contador de células	0,25	4,00	0,99
MQ.3	h	Espectrofotómetro de masas	8,24	6,50	53,59
MQ.4	h	Centrífuga de la serie Sorvall Legend Micro 17R	0,52	11,00	5,73
MQ.5	h	Termobloque Thermomixer C	0,30	21,00	6,28
MQ.6	h	Agitador de mezclas Vortex Top	0,05	9,00	0,44
MQ.7	h	Espectrofotómetro NanoDrop 2000	1,01	12,00	12,14
MQ.8	h	Campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI	0,53	265,00	139,76
MQ.9	h	Termociclador LifePro Thermal Cycler	0,44	48,00	21,32
MQ.10	h	Termociclador QuantStudio 5	4,64	21,00	97,53
MQ.11	h	Microscopio óptico Leica DM 2500	0,41	49,00	20,14
MQ.12	h	Microscopio de fluorescencia	1,44	15,00	21,66
MQ.13	h	Baño termostatizado	0,21	56,00	11,67
				<b>Coste total de maquinaria (€)</b>	<b>1334,17</b>

### 3. CUADROS DE PRESUPUESTOS PARCIALES Y PRECIOS DESCOMPUESTOS

Los procedimientos considerados de mayor importancia durante la realización de este trabajo se representan en la Tabla 5. Estos procedimientos se han agrupado de acuerdo a los subapartados descritos en el apartado 3 del documento anterior y se han calculado los presupuestos parciales. También se incluyen los materiales de protección utilizados en todos los procedimientos.

*Tabla 5. Cuadro de presupuestos parciales y precios descompuestos.*

#### 1. CULTIVO DE CÉLULAS

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
1.1	ud	Medio cultivo fibroblastos (100 mL)	15,26	5,81	88,64
1.2	ud	Medio cultivo H460/A549 (100 mL)	18,91	3,00	56,73
1.3	ud	Medio cultivo H1792 (100 mL)	20,28	1,50	30,43
1.4	ud	Pase celular fibroblastos	10,85	6,00	65,11
1.5	ud	Pase celular H460/A549	11,84	10,00	118,41
1.6	ud	Pase celular H1792	11,95	5,00	59,76
<b>Coste total de capítulo (€)</b>					<b>419,08</b>

#### 1.1 Medio cultivo fibroblastos (100 mL)

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	0,25	3,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	0,08	1,29
MAT.19	mL	DMEM	0,06	87,00	5,10
MAT.55	mL	Suero fetal bovino	0,40	10,00	4,02
MAT.56	mL	Tampón HEPES	0,79	1,00	0,79
MAT.4	mg	Anfotericina B	0,52	1,00	0,52
MAT.44	mL	Penicilina estreptomina	0,39	1,00	0,39
MAT.32	L	L-Glutamina	150,59	0,001	0,15
<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>					<b>15,26</b>

#### 1.2 Medio cultivo H460/A549 (100 mL)

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	0,25	3,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	0,08	1,29
MAT.54	mL	RPMI 1640	0,12	92,00	10,76
MAT.55	mL	Suero fetal bovino	0,40	5,00	2,01
MAT.56	mL	Tampón HEPES	0,79	1,00	0,79
MAT.4	mg	Anfotericina B	0,52	1,00	0,52
MAT.44	mL	Penicilina estreptomina	0,39	1,00	0,39
MAT.32	L	L-Glutamina	150,59	0,001	0,15
<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>					<b>18,91</b>

#### 1.3 Medio cultivo H1792 (100 mL)

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	0,25	3,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	0,08	1,23

MAT.54	mL	RPMI 1640	0,12	87,00	10,18
MAT.55	mL	Suero fetal bovino	0,40	10,00	4,02
MAT.56	mL	Tampón HEPES	0,79	1,00	0,79
MAT.4	mg	Anfotericina B	0,52	1,00	0,52
MAT.44	mL	Penicilina estreptomina	0,39	1,00	0,39
MAT.32	L	L-Glutamina	150,59	0,001	0,15
				<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>	<b>20,28</b>

#### 1.4 Pase celular fibroblastos

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	0,50	6,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	0,25	3,86
MQ.8	h	Campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI	0,05	0,75	0,04
MAT.59	L	Tripsina	71,80	0,001	0,07
MAT.43	mL	PBS	0,02	1,00	0,02
MQ.1	h	Incubador con atmósfera humidificada de CO2	0,05	0,05	0,00
MAT.63	ud	Tubo falcon de 15ml	0,23	1,00	0,23
MAT.62	mL	Trypan blue	0,32	0,01	0,00
MQ.2	h	Contador de células	0,025	0,05	0,001
1.1	ud	Medio cultivo fibroblastos (100 mL)	15,26	0,04	0,61
MQ.13	h	Baño termostatizado	0,02	0,75	0,02
				<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>	<b>10,85</b>

#### 1.5 Pase celular H460/A549

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	0,50	6,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	0,25	3,86
MQ.8	h	Campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI	0,05	0,75	0,04
MAT.59	L	Tripsina	71,80	0,002	0,14
MAT.43	mL	PBS	0,02	2,00	0,03
MQ.1	h	Incubador con atmósfera humidificada de CO2	0,05	0,05	0,00
MAT.63	ud	Tubo falcon de 15ml	0,23	1,00	0,23
MAT.62	mL	Trypan blue	0,32	0,01	0,00
MQ.2	h	Contador de células	0,02	0,05	0,00
1.2	ud	Medio cultivo H460/A549 (100 mL)	18,91	0,08	1,51
MQ.13	h	Baño termostatizado	0,02	0,75	0,02
				<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>	<b>11,84</b>

#### 1.6 Pase celular H1792

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	0,50	6,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	0,25	3,86
MQ.8	h	Campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI	0,05	0,75	0,04
MAT.59	L	Tripsina	71,80	0,002	0,14
MAT.43	mL	PBS	0,02	2,00	0,03
MQ.1	h	Incubador con atmósfera humidificada de CO2	0,05	0,05	0,00

MAT.63	ud	Tubo falcon de 15ml	0,23	1,00	0,23
MAT.62	mL	Trypan blue	0,32	0,01	0,00
MQ.2	h	Contador de células	0,02	0,05	0,00
1.3	ud	Medio cultivo H1792 (100 mL)	20,28	0,08	1,62
MQ.13	h	Baño termostatzado	0,02	0,75	0,02
				<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>	<b>11,95</b>

## 2. TRATAMIENTO PARA FIBROBLASTOS

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	0,25	3,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	0,25	3,86
MAT.58	mg	THC	5,56	0,01	0,03
MAT.12	mg	CBD	3,49	0,01	0,02
MQ.8	h	Campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI	0,05	0,17	0,01
MAT.57	µg	TGFB	12,80	0,08	0,96
				<b>Coste total de capítulo (€)</b>	<b>7,88</b>

## 3. SOBRENADANTES

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	0,30	3,60
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	0,30	4,63
1.1	ud	Medio cultivo fibroblastos (100 mL)	15,26	0,80	12,20
2	ud	Tratamiento para Fibroblastos	7,88	2,00	15,76
MQ.8	h	Campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI	0,05	0,30	0,02
				<b>Coste total de capítulo (€)</b>	<b>36,21</b>

## 4. XTT

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
4.1	ud	XTT de Fibroblastos	112,82	3,00	338,46
4.2	ud	XTT de H460/A549	142,26	4,00	569,04
4.3	ud	XTT de H1792	130,49	2,00	260,98
				<b>Coste total de capítulo (€)</b>	<b>1168,48</b>

### 4.1 XTT de Fibroblastos

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	3,00	36,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	1,00	15,43
1.1	ud	Medio cultivo fibroblastos (100 mL)	15,26	0,05	0,82
MQ.1	h	Incubador con atmósfera humidificada de CO2	0,05	74,00	3,83
2	ud	Tratamiento para Fibroblastos	7,88	1,00	7,88
1.4	ud	Pase celular fibroblastos	10,85	1,00	10,85
MQ.8	h	Campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI	0,05	1,00	0,05
MQ.13	h	Baño termostatzado	0,02	2,00	0,04
MAT.52	ud	Placa de 96 pocillos	3,26	1,00	3,26
MAT.1	ud	Kit XTT	34,44	1,00	34,44
MQ.3	h	Espectrofotómetro de masas	0,82	0,25	0,21
				<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>	<b>112,82</b>

#### 4.2 XTT de H460/A549

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	3,00	36,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	1,00	15,43
1.2	ud	Medio cultivo H460/A549 (100 mL)	18,91	0,05	0,95
MQ.1	h	Incubador con atmósfera humidificada de CO2	0,05	74,00	3,83
1.5	ud	Pase celular H460/A549	11,84	1,00	11,84
3	ud	Sobrenadantes	36,21	1,00	36,21
MQ.8	h	Campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI	0,05	1,00	0,05
MQ.13	h	Baño termostatzado	0,02	2,00	0,04
MAT.52	ud	Placa de 96 pocillos	3,26	1,00	3,26
MAT.1	ud	Kit XTT	34,44	1,00	34,44
MQ.3	h	Espectrofotómetro de masas	0,82	0,25	0,21
<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>					<b>142,26</b>

#### 4.3 XTT de H1792

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	3,00	36,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	1,00	15,43
1.3	ud	Medio cultivo H1792 (100 mL)	20,285	0,05	1,01
MQ.1	h	Incubador con atmósfera humidificada de CO2	0,05	74,00	3,83
3	ud	Sobrenadantes	36,21	1,00	36,21
MQ.8	h	Campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI	0,05	1,00	0,05
1.6	ud	Pase celular H1792	11,95	1,00	0,00
MQ.13	h	Baño termostatzado	0,02	2,00	0,04
MAT.52	ud	Placa de 96 pocillos	3,26	1,00	3,26
MAT.1	ud	Kit XTT	34,44	1,00	34,44
MQ.3	h	Espectrofotómetro de masas	0,82	0,25	0,21
<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>					<b>130,49</b>

### 5. EXPRESIÓN RELATIVA DE GENES

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
5.1	ud	Protocolo de extracción de RNA de Fibroblastos	168,44	1,00	168,44
5.2	ud	Protocolo de extracción de RNA de H460	189,41	1,00	189,41
5.3	ud	Protocolo de retrotranscripción inversa	241,09	2,00	482,17
5.4	ud	qPCR	266,77	2,00	533,55
<b>Coste total de capítulo (€)</b>					<b>1373,57</b>

#### 5.1 Protocolo de extracción de RNA y cuantificación de Fibroblastos

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	5,00	60,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	2,00	30,86
MAT.17	L	Dicloro metanol	30,90	0,03	0,93
MQ.13	h	Baño termostatzado	0,02	4,00	0,08
MQ.4	h	Centrífuga de la serie Sorvall Legend Micro 17R	0,05	1,00	0,05
MAT.28	mL	Glucógeno calidad ARN	430,00	0,05	20,64

MAT.31	L	Isopropanol	4,21	0,03	0,13
MAT.20	L	Etanol	17,96	0,10	1,80
1.4	ud	Pase celular fibroblastos	10,85	1,00	10,85
MQ.5	h	Termobloque Thermomixer C	0,03	0,50	0,01
MAT.3	L	Agua mQ	0,20	0,001	0,0003
MQ.6	h	Agitador de mezclas Vortex Top	0,00	0,17	0,00
MAT.49	ud	Placa de 12 pocillos	3,22	4,00	12,88
MQ.1	h	Incubador con atmósfera humidificada de CO2	0,05	120,00	6,21
MAT.38	ud	Microtubos de 1,5 mL	0,05	96,00	4,98
MQ.8	h	Campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI	0,05	1,00	0,05
2	ud	Tratamiento para Fibroblastos	7,88	1,00	7,88
1.1	ud	Medio cultivo fibroblastos (100 mL)	15,26	0,72	10,98
MQ.7	h	Espectrofotómetro NanoDrop 2000	0,10	1,00	0,10
				<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>	<b>168,44</b>

## 5.2 Protocolo de extracción de RNA y cuantificación de H460

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	5,00	60,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	2,00	30,86
MAT.17	L	Dicloro metanol	30,90	0,03	0,93
MQ.13	h	Baño termostatizado	0,02	4,00	0,08
MQ.4	h	Centrífuga de la serie Sorvall Legend Micro 17R	0,05	1,00	0,05
MAT.28	mL	Glucógeno calidad ARN	430,00	0,05	21,50
MAT.31	L	Isopropanol	4,21	0,03	0,13
MAT.20	L	Etanol	17,96	0,10	1,80
MQ.5	h	Termobloque Thermomixer C	0,03	0,50	0,01
MAT.3	L	Agua mQ	0,20	0,001	0,0003
MQ.6	h	Agitador de mezclas Vortex Top	0,00	0,17	0,00
MAT.49	ud	Placa de 12 pocillos	3,22	4,00	12,88
MQ.1	h	Incubador con atmósfera humidificada de CO2	0,05	120,00	6,21
MAT.38	ud	Microtubos de 1,5 mL	0,05	96,00	4,98
MQ.8	h	Campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI	0,05	1,00	0,05
3	ud	Sobrenadantes	36,21	1,00	36,21
1.2	ud	Medio cultivo H460/A549 (100 mL)	18,91	0,72	13,62
MQ.7	h	Espectrofotómetro NanoDrop 2000	0,10	1,00	0,10
				<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>	<b>189,41</b>

## 5.3 Protocolo de retrotranscripción inversa

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	2,00	24,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	1,00	15,43
MQ.8	h	Campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI	0,05	2,00	0,11
MAT.3	L	Agua mQ	0,20	0,0005	0,0001
MAT.39	ud	Microtubos de 200 µL	0,04	49,00	1,91
MQ.9	h	Termociclador LifePro Thermal Cycler	0,04	3,00	0,13
MAT.30	ud	High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit	399,00	0,50	199,50
MQ.4	h	Centrífuga de la serie Sorvall Legend Micro 17R	0,05	0,08	0,0043

MQ.6	h	Agitador de mezclas Vortex Top	0,005	0,08	0,0004
				<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>	<b>241,09</b>

#### 5.4 qPCR

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	2,00	24,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	1,00	15,43
MAT.3	L	Agua mQ	0,20	0,0002	0,00003
MAT.34	ud	Master mix de Applied Biosystems	413,00	0,25	101,19
MAT.50	ud	Placa de 384 pocillos	8,52	2,00	17,04
MAT.40	ud	Microtubos de 500 µL	0,08	6,00	0,45
MQ.6	h	Agitador de mezclas Vortex Top	0,00	0,08	0,00
MQ.10	h	Termociclador QuantStudio 5	0,46	1,50	0,70
MAT.22	ud	FAP 250 µL	213,00	0,10	20,87
MAT.13	ud	CDH1 250 µL	213,00	0,10	20,87
MAT.14	ud	CDH2 250 µL	213,00	0,10	20,87
MAT.65	ud	VIM 250 µL	213,00	0,10	20,87
MAT.26	ud	FSP1 250 µL	213,00	0,10	20,87
MAT.27	µL	GAPDH	3,60	1,00	3,60
				<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>	<b>266,77</b>

### 6. INMUNOFLUORESCENCIA

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
6.1	ud	Tinción con Faloidina-rodamina	132,44	2,00	264,88
6.2	ud	Inmunofluorescencia con ASMA	159,33	1,00	159,33
6.3	ud	Inmunofluorescencia con FSP1	191,55	1,00	191,55
6.4	ud	Obtención de imágenes	52,01	2,00	104,02
				<b>Coste total de capítulo (€)</b>	<b>719,78</b>

#### 6.1 Tinción con Faloidina-rodamina

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	3,00	36,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	1,50	23,15
MAT.51	ud	Placa de 8 pocillos	0,61	3,00	1,83
MAT.21	mL	Faloidina-Rodamina	48,60	0,01	0,58
MAT.23	L	Formol	6,32	0,01	0,06
MAT.43	mL	PBS	0,02	57,60	0,90
MAT.60	mL	Tritón X-100	0,11	0,10	0,01
1.1	ud	Medio cultivo fibroblastos (100 mL)	15,26	0,20	3,05
1.2	ud	Medio cultivo H460/A549 (100 mL)	18,91	0,20	3,78
1.4	ud	Pase celular fibroblastos	10,85	1,00	10,85
1.5	ud	Pase celular H460/A549	11,84	1,00	11,84
MAT.7	mL	BSA	6,84	4,80	32,83
MQ.8	h	Campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI	0,05	1,00	0,05
MQ.13	h	Baño termostaticado	0,02	2,00	0,04
MQ.1	h	Incubador con atmósfera humidificada de CO2	0,05	144,00	7,46
				<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>	<b>132,44</b>

## 6.2 Inmunofluorescencia con ASMA

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	4,00	48,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	2,50	38,58
MAT.51	ud	Placa de 8 pocillos	0,61	3,00	1,83
MAT.5	µL	ASMA	4,10	0,01	0,05
MAT.23	L	Formol	6,32	0,01	0,06
MAT.43	mL	PBS	0,02	57,60	0,90
MAT.60	mL	Tritón X-100	0,11	0,10	0,01
1.1	ud	Medio cultivo fibroblastos (100 mL)	15,26	0,20	3,05
1.2	ud	Medio cultivo H460/A549 (100 mL)	18,91	0,20	3,78
1.4	ud	Pase celular fibroblastos	10,85	1,00	10,85
1.5	ud	Pase celular H460/A549	11,84	1,00	11,84
MAT.7	mL	BSA	6,84	4,80	32,83
MQ.8	h	Campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI	0,05	1,00	0,05
MQ.13	h	Baño termostatzado	0,02	2,00	0,04
MQ.1	h	Incubador con atmósfera humidificada de CO2	0,05	144,00	7,46
				<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>	<b>159,33</b>

## 6.3 Inmunofluorescencia con FSP1

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	5,00	60,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	3,50	54,01
MAT.51	ud	Placa de 8 pocillos	0,61	3,00	1,83
MAT.66	ud	S100A4 Antibody FSP1 (15 mg)	402,00	0,01	4,82
MAT.68	mg	FITC	1,18	0,01	0,01
MAT.23	L	Formol	6,32	0,01	0,06
MAT.43	mL	PBS	0,02	57,60	0,90
MAT.60	mL	Tritón X-100	0,11	0,10	0,01
1.1	ud	Medio cultivo fibroblastos (100 mL)	15,26	0,20	3,05
1.2	ud	Medio cultivo H460/A549 (100 mL)	18,91	0,20	3,78
1.4	ud	Pase celular fibroblastos	10,85	1,00	10,85
1.5	ud	Pase celular H460/A549	11,84	1,00	11,84
MAT.7	mL	BSA	6,84	4,80	32,83
MQ.8	h	Campana biológica de flujo laminar Steril-GEMINI	0,05	1,00	0,05
MQ.13	h	Baño termostatzado	0,02	2,00	0,04
MQ.1	h	Incubador con atmósfera humidificada de CO2	0,05	144,00	7,46
				<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>	<b>191,55</b>

## 6.4 Obtención de imágenes

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
P.1	h	Graduado/a en Ingeniería biomédica	12,00	3,00	36,00
P.4	h	Estudiante predoctoral	15,43	1,00	15,43
MQ.12	h	Microscopio de fluorescencia	0,14	4,00	0,58
				<b>Coste total de subcapítulo (€)</b>	<b>52,01</b>

#### 7. MATERIAL PERSONAL DE PROTECCIÓN

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
MAT.6	ud	Bata de laboratorio	19,90	1,00	19,90
MAT.33	ud	Mascarilla quirúrgica	0,62	24,00	14,88
MAT.29	ud	Guantes de látex	0,12	160,00	19,68
				<b>Coste total de capítulo (€)</b>	<b>54,46</b>

#### 8. REUNIONES DE PROYECTO

Código	Unidad (u)	Descripción	Coste unidad (€/u)	Cantidad	Coste (€)
8.1	ud	Reuniones de planificación	735,59	5,00	3677,96
8.2	ud	Reuniones de resultados	1225,98	2,00	2451,98
8.3	ud	Redacción y correcciones	1225,99	1,00	1225,99
				<b>Coste total de capítulo (€)</b>	<b>7355,93</b>

#### 4. PRESUPUESTO EJECUCIÓN MATERIAL, POR CONTRATA Y BASE DE LICITACIÓN

El presupuesto para la ejecución material ha sido calculado como la suma de los costes parciales. Por otro lado, el presupuesto para la ejecución del proyecto ha sido obtenido a partir del presupuesto de ejecución material y de los gastos generales (13%). Finalmente ha sido necesario añadir el IVA (21%) antes de calcular el coste total (Tabla 6).

*Tabla 6. Cuadro de presupuesto de ejecución del proyecto.*

Capítulo	Descripción	Coste (€)
1.	Cultivo de células	430,23
2.	Tratamiento para fibroblastos	7,96
3.	Sobrenadantes	36,51
4.	XTT	1508,95
5.	Expresión relativa de genes	1508,75
6.	Inmunofluorescencia	1006,25
7.	Material personal de protección	54,46
8.	Reuniones de proyecto	7355,93
<b>Presupuesto de ejecución material</b>		<b>11909,02</b>
<b>Gastos generales (13%)</b>		<b>1548,17</b>
<b>Presupuesto para la ejecución del proyecto</b>		<b>13457,20</b>
<b>IVA (21%)</b>		<b>2826,01</b>
<b>Total</b>		<b>16283,21</b>

El presupuesto de ejecución del proyecto asciende a la cantidad de **DIECISEIS MIL DOSCIENTOS OCHENTA Y TRES EUROS CON VEINTIÚN CÉNTIMOS.**



