



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Mecanismos reguladores de adquisición de plasticidad  
tumoral: papel de los macrófagos asociados a tumor

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Duro Vizcaíno, Alba

Tutor/a: Murguía Ibáñez, José Ramón

Cotutor/a externo: RODRIGUEZ VITA, JUAN

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

**Autora:** Alba Duro Vizcaíno

**Tutor:** José Ramón Murguía Ibáñez

**Cotutor externo:** Juan Rodríguez Vita

Valencia, julio de 2022

**Título:** Mecanismos reguladores de adquisición de plasticidad tumoral: papel de los macrófagos asociados a tumor

**Resumen:**

El cáncer ginecológico con peor pronóstico es el cáncer de ovario. Esto es debido a que, cuando las mujeres son diagnosticadas con cáncer de ovario, una gran parte ya presenta metástasis. Esta metástasis es resultado de la plasticidad tumoral, que se define como la capacidad que presentan las células tumorales para adaptarse a las circunstancias ambientales. Por este motivo, además, los tratamientos convencionales dejan de dar efecto con el paso del tiempo, debido a que generan resistencias frente a las quimioterapias. Esta plasticidad es adquirida, entre otros factores, gracias a los macrófagos asociados al tumor (TAMs). En este proyecto se estudiarán los mecanismos que regulan dicha plasticidad en las células de cáncer de ovario y cómo contribuyen los TAMs durante su adquisición. Para ello, se usarán cultivos primarios de macrófagos procedentes de ratones transgénicos. Con los cultivos, se estudiará el efecto de rutas de señalización que, según los datos preliminares, están relacionadas con el proceso de adquisición de la plasticidad, estudiando los cambios producidos al someter a los macrófagos a microambientes generados por células tumorales. Así, la finalidad del proyecto será comprender la acción de los TAMs y los mecanismos implicados en la adquisición de la plasticidad tumoral, que es un factor clave en el desarrollo de la metástasis.

**Palabras clave:** Macrófagos asociados a tumor; Cáncer de ovario; Plasticidad celular; Semaforinas; Metástasis

**Author:** Alba Duro Vizcaíno

**Tutor:** José Ramón Murguía Ibáñez

**External tutor:** Juan Rodríguez Vita

Valencia, July 2022

**Title:** Regulatory mechanisms of tumor plasticity acquisition: role of tumor-associated macrophages

**Summary:**

The gynecological cancer with the worst prognosis is ovary cancer. The main reason is that a great part of women present metastasis in the peritoneum by the time they are diagnosed. This metastasis is the result of tumor plasticity, defined as the cells' capacity of adapting to different environmental circumstances. This is also the reason why conventional treatments become less effective over time, due to the appearance of resistances to chemotherapies. The interaction with tumor-associated macrophages (TAMs) is one of the components that help acquiring said plasticity. In this project, the mechanisms that regulate tumor plasticity in ovary cancer and how do TAMs contribute to its acquisition will be studied. For this purpose, primary cultures from transgenic mice will be used. With said cultures, the signaling pathways that, according to the preliminary data, are related to the acquisition of tumor plasticity, will be studied. This will be done evaluating the changes in the macrophages when cultured with tumorous environments generated by tumorous cells. Thus, the goal of this project is to understand the action of TAMs and the mechanisms involved in tumor plasticity acquisition, which is a key process in the development of metastasis.

**Keywords:** Tumor-associated macrophages; Ovary cancer; Cell plasticity; Semaphorin; Metastasis

## Índice de contenidos

1. Introducción.....	1
1.1. Macrófagos y sus polarizaciones .....	1
1.2. Microambiente tumoral y matriz extracelular .....	2
1.3. Macrófagos asociados a tumor y su efecto en el TME .....	2
1.4. Cáncer de ovario epitelial y metástasis peritoneal.....	4
1.5. Adenocarcinoma pancreático ductal.....	6
1.6. Estudios del proyecto .....	6
2. Objetivos .....	6
3. Materiales y métodos .....	7
3.1. Líneas celulares.....	7
3.2. Generación de medios condicionados .....	7
3.3. Cultivo de J774 en medios condicionados.....	7
3.4. Extracción y cuantificación de RNA .....	8
3.5. Síntesis de cDNA.....	9
3.6. PCR cuantitativa a tiempo real .....	9
3.7. Análisis estadístico.....	10
4. Resultados.....	11
4.1. Observación morfológica de las células tras cultivarse en medios condicionados.....	11
4.2. Análisis de expresión de mRNA .....	11
4.2.1. Genes inducidos por IFN- $\gamma$ .....	11
4.2.2. Genes inducidos por IL-4.....	13
4.2.3. Gen inducido por IFN- $\gamma$ e IL-4.....	14
4.2.4. Variabilidad de los resultados .....	15
5. Discusión .....	15
5.1. TAMs pueden ser inducidos a expresar genes asociados a los fenotipos M1 y M2 en el TME. 15	
5.2. Los macrófagos se sobreactivan en medios condicionados de KPC.....	16
5.3. El TME es un factor determinante para la activación de TAMs en el PDAC.....	16
5.4. HAPLN1 potencia el fenotipo pro-tumoral en PDAC .....	16
5.5. El medio condicionado de ID8 no sobreactiva a los macrófagos .....	17
6. Conclusiones .....	18
Bibliografía citada .....	19

## Índice de tablas y figuras

**Tabla 1.** Secuencias de cebadores de los genes estudiados

**Figura 1.** Gradiente de polarización de los macrófagos

**Figura 2.** Actividades pro-tumorales de los macrófagos asociados a tumor en el microambiente tumoral

**Figura 3.** Metástasis en el cáncer de ovario epitelial

**Figura 4.** Observación morfológica de células J774 tras 24h en cultivo con medios condicionados (CM) de ID8, KPC, y KPC HAPLN1.

**Figura 5.** Gráficas de expresión de mRNA de los genes Cxcl9 y iNOS

**Figura 6.** Gráfica de expresión de mRNA de Arg1

**Figura 7.** Gráfica de expresión de mRNA de MCP1 en tratamiento con IFN- $\gamma$  e IL-4

## Listado de abreviaturas

**Arg1:** Arginasa1

**BMDMs:** macrófagos derivados de la médula ósea

**CAF:** fibroblasto asociado a cáncer

**CM:** medio condicionado

**CSF-1:** factor estimulante de colonias 1

**DMEM:** Dubelco's Modified Eagle Medium

**ECM:** matriz extracelular

**EGF:** factor de crecimiento epitelial

**EOC:** cáncer de ovario epitelial

**FALCs:** grupos linfoides asociados a grasa

**FBS:** suero fetal bovino

**HA:** ácido hialurónico

**HAPLN1:** proteína de enlace de hialuronano y proteoglicano-1

**IFN- $\gamma$ :** interferón gamma

**IL-4:** interleucina 4

**IL-6:** interleucina 6

**IL-10:** interleucina 10

**IL-12:** interleucina 12

**IL-13:** interleucina 13

**IL-23:** interleucina 23

**iNOS:** óxido nítrico sintasa

**LPS:** lipopolisacárido

**LPS:** lipopolisacárido

**MMPs:** metaloproteasas de matriz

**NO:** óxido nítrico

**PDAC:** adenocarcinoma pancreático ductal

**PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**SD:** desviación estándar

**TAM:** macrófago asociado a tumor

**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante beta

**TME:** microambiente tumoral

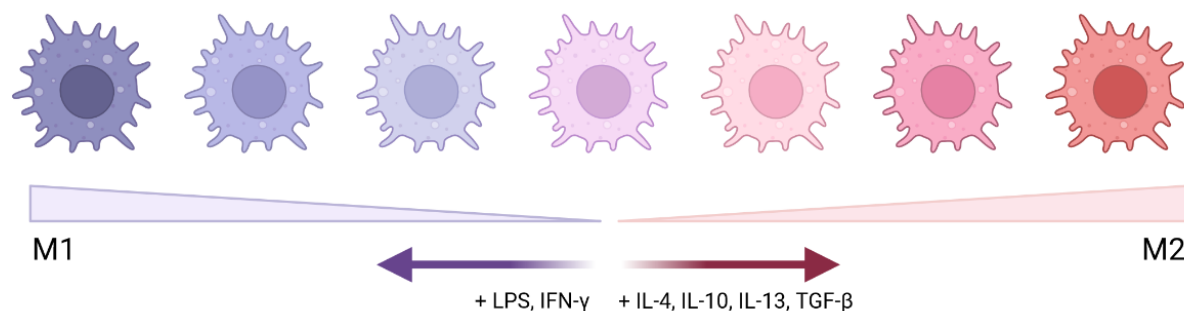
**TRMs:** macrófagos residentes en tejidos

**VEGF:** factor de crecimiento vascular endotelial

## 1. Introducción

### 1.1. Macrófagos y sus polarizaciones

Los macrófagos son células inmunitarias que juegan un papel crucial en la inmunidad tanto innata como adaptativa, y destacan por su heterogeneidad tanto fenotípica como funcional. Dentro de su amplio rango de funciones, se encuentran fagocitosis, presentación antigénica, citotoxicidad antimicrobiana, secreción de citocinas y componentes del complemento, entre otras. Además, estas funciones tienen características opuestas, pudiendo ser proinflamatorias o antiinflamatorias; o de destrucción y reparación de tejidos (Pan et al., 2020). En una visión simplificada, los macrófagos se dividen en dos extremos de polarización fenotípica dependiendo de qué tipo de estas funciones están realizando. Estos dos extremos definen el paradigma M1/M2, en el que los macrófagos M1 tienen una función proinflamatoria y antiinfecciosa; y los macrófagos M2 tienen una función antiinflamatoria y pro-tumoral (Schweer et al., 2022). Sin embargo, no son extremos completamente independientes entre sí, sino que se trata de un gradiente de varios estados intermedios entre los extremos M1 y M2, y los macrófagos pueden ser inducidos a adoptar estos estados mediante estímulos externos (Figura 1) (Boutillier & ElSawa, 2021). El extremo M1 es inducido por varios factores, entre los que se encuentran lipopolisacárido (LPS) y varias citocinas, entre las que se destaca IFN- $\gamma$ . Por otra parte, el fenotipo M2 se induce por exposición a otros factores, como citocinas TGF- $\beta$ , IL-10 o IL-13, destacando IL-4 (Schweer et al., 2022).



**Figura 1.** Gradiente de polarización de los macrófagos. Entre los extremos M1 y M2, los macrófagos pueden tener varios estados de polarización, pudiendo expresar características propias de ambos fenotipos a diferentes niveles. Los macrófagos son también células muy plásticas, capaces de moverse por este gradiente en función de los estímulos que reciben del entorno: con estímulo de LPS o IFN- $\gamma$ , entre otros, se polarizan hacia M1; con estímulo de IL-4, IL-10, IL-13 o TGF- $\beta$ , entre otros, polarizan hacia M2. Figura creada con BioRender.com

Las diferencias entre ambas polarizaciones radican en su expresión génica y en su metabolismo. Por ejemplo, los M1 expresan óxido nítrico sintasa (iNOS) y producen óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS), citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-12 o IL-23; o quimiocinas como Cxcl9 o Cxcl10. Por otra parte, el fenotipo M2 expresa, entre

otros, arginasa-1 (Arg1) y CCL17, y sobreexpresa el receptor de manosa CD206, que suele usarse como marcador de este tipo de macrófagos (Wu et al., 2020).

## 1.2. Microambiente tumoral y matriz extracelular

En un contexto tumoral, los macrófagos pasan a denominarse macrófagos asociados a tumor (TAM), y su polarización está fuertemente influenciada por el microambiente tumoral (TME). El TME se refiere a la estructura de tejido tumoral y sus células del estroma, incluyendo células inmunes, componentes vasculares y todos los componentes que forman la matriz extracelular (ECM), y resulta crucial para la progresión de un tumor y la metástasis (Schweer et al., 2022). En esta matriz, la proteína de enlace de hialuronano y proteoglicano-1 (HAPLN1) es un componente altamente expresado en muchos tejidos. HAPLN1 es una proteína perteneciente a la familia de proteínas de enlace, y su función consiste en estabilizar agregados de ácido hialurónico (HA) y de otros proteoglicanos de la ECM (Ivanova et al., 2009), como el versicano, que se sobreexpresa en tumores sólidos y promueve su crecimiento mejorando la proliferación de las células tumorales, la angiogénesis o estimulando macrófagos (Pappas et al., 2019). En ausencia de HAPLN1, los agregados de estos proteoglicanos son más pequeños y menos estables. El HA es una molécula abundante en muchos tumores, en ECM tumorales y en orina de pacientes con cáncer (Ivanova et al., 2009). Esta molécula puede promover la metástasis tumoral por sus efectos en la estructura de la ECM e interactuando con la superficie celular, permitiendo a las células tumorales migrar (Boregowda et al., 2006). Un TME rico en HA puede regular interacciones entre las células tumorales y su matriz, teniendo un efecto significativo sobre la iniciación del tumor; y pueden acelerar el reclutamiento de células inflamatorias, como macrófagos, otorgando al tumor citocinas y quimiocinas útiles para el crecimiento tumoral y la angiogénesis (Ivanova et al., 2009). Además, en los TME se ha observado también sobreexpresión de proteínas que interactúan con HA, como HAPLN1, que está relacionada con el crecimiento tumoral mediante regulación del ciclo celular, transcripción génica o modulación de señalización celular (Bourguignon et al., 2007).

## 1.3. Macrófagos asociados a tumor y su efecto en el TME

Dentro del TME, los TAMs pueden ser reclutados mediante diversos mecanismos (Schweer et al., 2022). El origen más común de los TAMs en el TME son monocitos reclutados de los vasos sanguíneos, que migran respondiendo a las señales de daño tisular. Por esta razón, estos TAMs se definen como originados de la médula ósea. Además de estos, hay estudios que han revelado la presencia de un grupo de macrófagos residente en tejidos (TRMs) desde la fase embrionaria. Estos macrófagos pueden infiltrarse en los tejidos tumorales, y su reclutamiento parece estar controlado por procesos inflamatorios, exhibiendo características específicas de cada tejido (Wu et al., 2020).

En este contexto tumoral, la polarización de los macrófagos cobra gran importancia. Aunque los TAMs ya no se definen como macrófagos M1 o M2, pueden mostrar fenotipos similares a

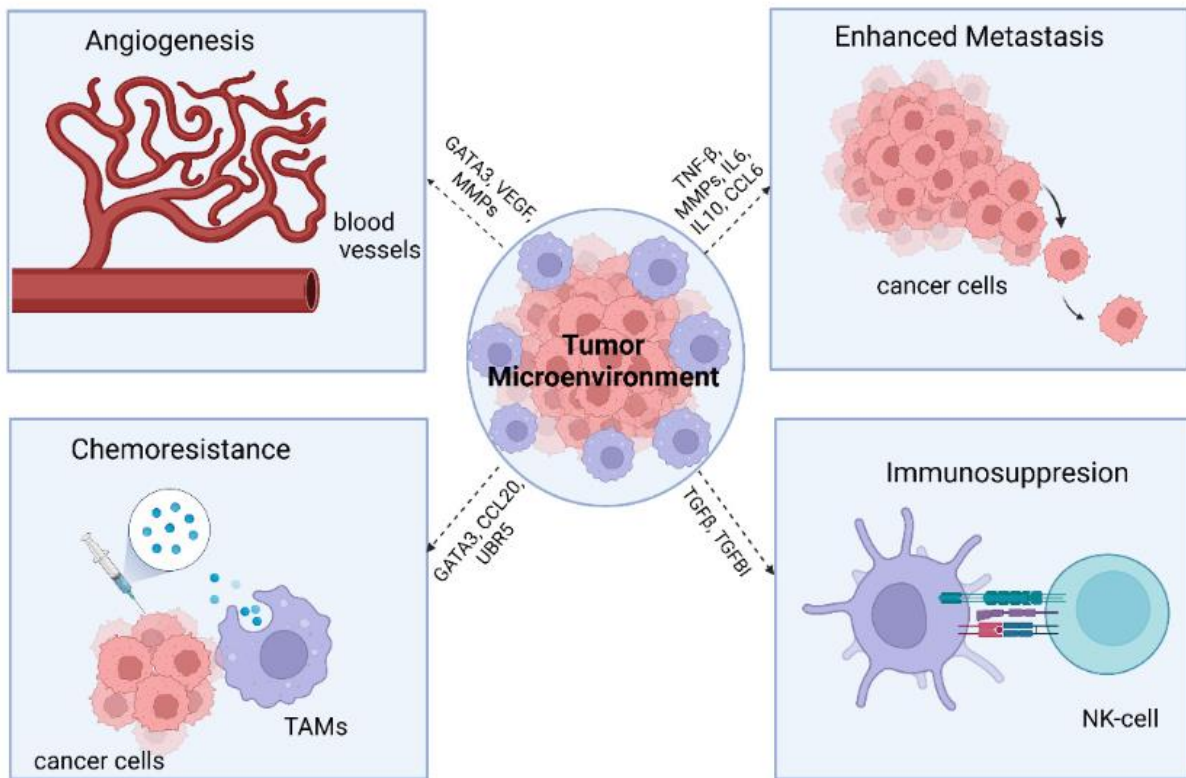


estos. Los TAMs que muestran características típicas de M1 tienen efectos antitumorales, siendo capaces de identificar a las células tumorales y distinguirlas de las células no tumorales. Estos TAMs tienen dos tipos de actividad antitumoral: por citotoxicidad o mediada por anticuerpos. La actividad citotóxica se ejerce directamente por el macrófago, y es un proceso lento que involucra múltiples mecanismos. Uno de ellos viene dado por la producción de ROS y NO característica de estos macrófagos, dado que son compuestos tóxicos para las células tumorales. La actividad mediada por anticuerpos es más rápida, y requiere la participación de anticuerpos antitumorales. En el TME, sin embargo, los TAMs se reprograman hacia un fenotipo más similar al de macrófagos M2, adquiriendo actividades pro-tumorales (Martinez et al., 2006; Schweer et al., 2022). Los mecanismos concretos mediante los cuales sucede la polarización de los TAMs hacia este fenotipo no son conocidos, aunque se han hecho estudios que relacionan la señalización por IL-4 con el crecimiento tumoral en un modelo de adenocarcinoma mamario de ratón (DeNardo et al., 2009), y una dependencia por parte de los TAMs del factor estimulante de colonias 1 (CSF-1) (Paulus et al., 2006).

La actividad pro-tumoral de los TAMs consta de varios factores (Figura 2). Son capaces de segregar moléculas señalizadoras y vesículas extracelulares, que contienen factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas que estimulan la supervivencia y proliferación tumorales, como factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), entre otros (Chen et al., 2019; Pan et al., 2020).

Los TAMs son capaces de aumentar la resistencia de las células tumorales frente a quimioterapia y radioterapia, segregando IL-6, que ha mostrado activar diferentes rutas metabólicas en diferentes tipos de cáncer que otorgan resistencia a la apoptosis en los tumores (Chen et al., 2019). Otra actividad pro-tumoral observada en los TAMs es promover la angiogénesis. En un tumor, la vascularización es un factor importante para su crecimiento debido al aumento de oxigenación que supone. La angiogénesis viene dada por la secreción de VEGF y otros factores de crecimiento por parte de los TAMs. De hecho, se han realizado estudios en los que la angiogénesis disminuye al reducir la cantidad de TAMs mediante inhibición de CSF-1 (Strachan et al., 2013).

Por otra parte, el TME juega un papel clave en la metástasis y migración del tumor, y los TAMs, al ser el principal componente del microambiente, influyen en su desarrollo. Los TAMs pueden facilitar la invasión de células tumorales secretando catepsinas, metaloproteinasas de matriz (MMPs) o serín proteasas, que promueven la metástasis mediante diversos mecanismos en diferentes tipos de cáncer (Chen et al., 2019; Pan et al., 2020). Finalmente, los TAMs también tienen actividad inmunosupresora, derivada de las propias características del fenotipo M2, que segrega una serie de quimiocinas y citocinas que reducen la activación de células inmunes (Chen et al., 2019).



**Figura 2.** Actividades pro-tumorales de los TAMs en el TME: promoción de angiogénesis, proliferación tumoral y metástasis, quimiorresistencia e inmunosupresión. Fuente: [Schweer et al., 2022](#).

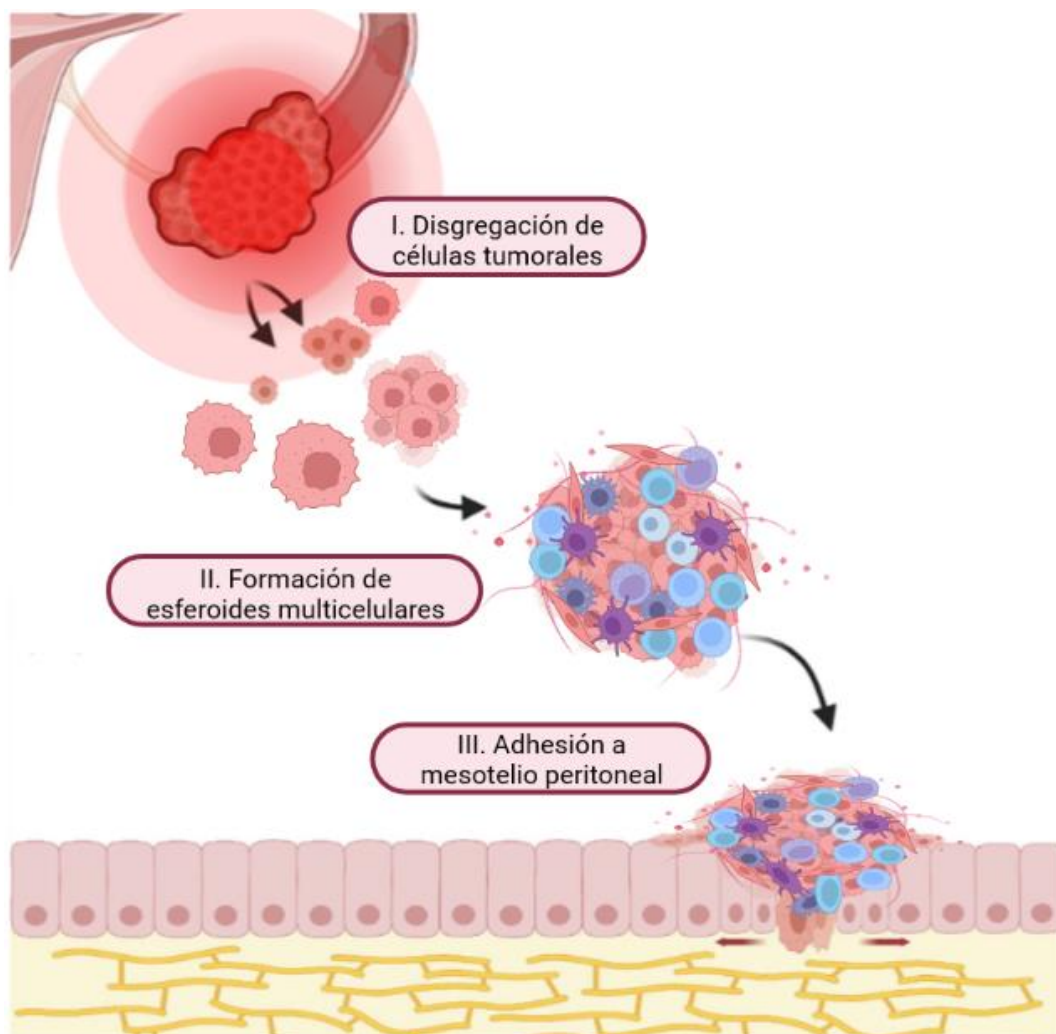
La actividad de los TAMs tiene un gran impacto en algunos tipos de cáncer. En este proyecto es de interés la función de los TAMs en dos cánceres abdominales: el cáncer de ovario epitelial (EOC) y el adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC).

#### 1.4. Cáncer de ovario epitelial y metástasis peritoneal

El cáncer de ovario epitelial es uno de los más letales, debido a que se suele diagnosticar cuando ya se encuentra en un estado muy avanzado y ha entrado en metástasis. La supervivencia a 5 años de las pacientes se encuentra alrededor de un 40% y, además, en muchos casos el tumor adquiere resistencia a la quimioterapia, lo que supone la principal causa para un mal pronóstico. Se ha comprobado que las células de cáncer de ovario son capaces de reclutar macrófagos e inducir su diferenciación al fenotipo pro-tumoral. Además, el TME de este cáncer consta de células neoplásicas, fibroblastos, matriz extracelular y diferentes tipos de células inmunes, entre las que los TAMs ocupan alrededor de un 30% de las células de este entorno ([Colvin, 2014](#)).

El TME del cáncer de ovario tiene una particularidad: las células tumorales migran hacia el peritoneo en etapas tempranas de la enfermedad, y, debido a la ausencia de barreras físicas, las células tumorales pueden viajar por toda la cavidad abdominal transportadas por el líquido peritoneal, moviéndose hacia el omento, el peritoneo parietal y visceral, y hacia otros órganos

adyacentes (Nowak & Klink, 2020). Por esta vía, denominada ruta transcelómica, se presenta una de las formas más agresivas del cáncer de ovario, el carcinoma ovárico seroso de alto grado, que se caracteriza por esta metástasis peritoneal y la formación de ascitis maligna. Esta ascitis es una acumulación de líquido peritoneal. La ascitis maligna derivada del cáncer de ovario se presenta como células aisladas que flotan en el líquido peritoneal o como esferoides multicelulares, que contienen células tumorales, mesoteliales e inmunes, adipocitos, fibroblastos, vesículas extracelulares, citocinas, factores de crecimiento y mediadores lipídicos (Figura 3). La formación exacta de la ascitis maligna no se conoce, pero la molécula más determinante en el proceso parece ser el VEGF (Etzerodt et al., 2020; Nowak & Klink, 2020; Xia et al., 2020). Otros estudios muestran la implicación de otras moléculas, como E-cadherinas y TGF- $\beta$  (Uno et al., 2022), además de la implicación de los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) (Gao et al., 2019).



**Figura 3.** Metástasis en cáncer de ovario epitelial. Las células tumorales se disgregan del epitelio ovárico y viajan por la cavidad peritoneal, pudiendo formar esferoides multicelulares formados por células tumorales, linfocitos, macrófagos, fibroblastos, adipocitos, citocinas, ácido hialurónico y otros componentes. Estas formaciones celulares son capaces de adherirse al mesotelio del peritoneo. Figura adaptada de Dhaliwal & Shepherd, 2022, con BioRender.com

En el peritoneo, sin embargo, no hay sangre, ganglios linfáticos o matriz que pueda nutrir a las células tumorales que han migrado a esta zona. Para sobrevivir, necesitan el apoyo de los TAMs. Mediante la secreción de EGF e IL-6, los TAMs permiten la supervivencia y diseminación de las células tumorales (Nowak & Klink, 2020). La metástasis peritoneal sucede principalmente en el omento. Este órgano contiene grupos linfoides asociados a grasa (FALCs), que contribuyen a la inmunidad peritoneal e intestinal. La densidad de macrófagos en el omento aumenta proporcionalmente con la gravedad del cáncer, con las células tumorales colonizando principalmente las zonas cercanas a los FALCs, donde reside la mayor cantidad de macrófagos (Etzerodt et al., 2020).

### 1.5. Adenocarcinoma pancreático ductal

En el caso del adenocarcinoma pancreático ductal, este tipo de cáncer está caracterizado por tener un estroma fibroso y que sufre mucha infiltración de células mieloides, entre las cuales los macrófagos son las más abundante (Yang et al., 2021; Zhu et al., 2017). En el TME de este cáncer se encuentran fibroblastos, células inmunes y células endoteliales embebidas en la ECM. En esta ECM se presenta también HA en cantidades abundantes. Este estroma fibroso, junto a la infiltración de TAMs, hacen del TME del PDAC un espacio protegido frente a agentes citotóxicos que limita el acceso de linfocitos T y promueve el crecimiento tumoral (Provenzano et al., 2012). En el PDAC, al igual que en EOC, se presenta metástasis peritoneal y formación de ascitis que puede causar obstrucción intestinal, empeorando las posibilidades de que un tratamiento por quimioterapia sea efectivo (Takahara et al., 2015; Yamada et al., 2021).

### 1.6. Estudios del proyecto

En este proyecto se analiza la relación entre macrófagos y el TME de EOC y PDAC. Para ello, se cultivan los macrófagos en medios condicionados (CM) provenientes de células tumorales de ambos tipos de cáncer, además de una línea celular de PDAC modificada para la sobreexpresión de HAPLN1 para visualizar también su importancia y efecto sobre los macrófagos. Los macrófagos serán inducidos a adoptar el fenotipo M1 o M2 mediante las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 respectivamente, y de esa forma se evalúa también la plasticidad de estos macrófagos para adoptar un fenotipo u otro. La reacción de los macrófagos frente a los medios condicionados se evalúa mediante un análisis de expresión de mRNA de genes característicos de ambas polarizaciones de macrófagos: iNOS y Cxcl9 para la polarización M1, Arg1 y CD206 para la polarización M2, y MCP1 para ambas polarizaciones; usando CpH como gen control.

## 2. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto es analizar los cambios producidos en la expresión génica de macrófagos que puedan estar relacionados con su transición a fenotipos pro-

tumorales propios de los TAMs al entrar en contacto con medios condicionados por células tumorales provenientes de EOC y PDAC.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Líneas celulares

La línea celular de macrófagos utilizada para los experimentos fue J774, una línea de macrófagos de ratón. Para generar los medios condicionados de células tumorales, se utilizaron células de las líneas celulares ID8 y KPC. La línea celular KPC son células de PDAC, generadas a partir de tumores primarios de ratones KPC (*Kras*<sup>G12D/+</sup>, *p53*<sup>R172H/+</sup>, *Elas*<sup>CreER/+</sup>) (Yang et al., 2019). Para estudiar el efecto de HAPLN1, se usó una línea celular de KPC transformada para obtener una sobreexpresión de HAPLN1. Por otra parte, la línea celular ID8 son células de la superficie epitelial ovárica de ratón, capaces de formar tumores extensos en la cavidad peritoneal y en ratones con sistemas inmunes intactos, haciendo de esta línea celular un buen modelo para estudiar interacciones inmunes en el desarrollo del cáncer de ovario (Roby et al., 2000).

Todas las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM, con 4.5 g/L de glucosa al 10% FBS, suplementados con piruvato, penicilina y estreptomycinina e incubadas a 37°C.

#### 3.2. Generación de medios condicionados

Se generaron medios condicionados de los tres tipos de células tumorales de interés: KPC, KPC HAPLN1 e ID8. Para obtener estos medios, se debe poner un número concreto de células en cultivo: para KPC y KPC HAPLN1 se cultivaron  $8 \cdot 10^6$  células por placa, con cuatro placas de 15 cm de diámetro de cada tipo celular. En el caso de ID8, se cultivaron  $5 \cdot 10^6$  células por placa, con cuatro placas. Se dejaron todas las placas en cultivo con medio DMEM 4.5 g/L de glucosa a un 4% de FBS en incubador a 37°C durante tres días. Al cuarto día, se recogieron los medios. Para ello, primero se recogieron los medios de cultivo en tubos falcon y se centrifugaron para precipitar las células muertas, y posteriormente se recogió el sobrenadante con una jeringa pasándolo por un filtro de 0.22 micras para obtener finalmente los medios condicionados de las distintas células tumorales. Una vez recogidos en alícuotas, se conservaron a -20°C.

#### 3.3. Cultivo de J774 en medios condicionados

Con las células J774 se realizó un experimento en el que se cultivaron las células en 12 condiciones diferentes: medio DMEM al 4% FBS, medio condicionado de KPC, medio condicionado de KPC HAPLN1, y medio condicionado de ID8. De cada medio se tuvo una condición sin estimular, una condición estimulada con IFN- $\gamma$  y una condición estimulada por IL-4. De cada condición se hizo un duplicado. Posteriormente se repitió el mismo experimento, utilizando medios condicionados recogidos en un día diferente, y añadiendo

una placa más, con dos réplicas del experimento en medio DMEM y otras dos en medio condicionado de ID8.

Se utilizaron placas multipocillo de 12 pocillos, realizando un conteo celular previo para cultivar  $5 \cdot 10^5$  células en cada pocillo. Una vez contadas las células y colocadas en los pocillos, se dejaron en incubador a 37°C con medio DMEM 4.5 g/L glucosa al 10% FBS, 1 mL por pocillo.

El día después, se cambió el medio DMEM por los medios condicionados. Se retiró el medio mediante aspiración, y se añadieron a los pocillos 0.5 mL de los diferentes medios ya mencionados, llenando 3 pocillos por cada medio. Se dejaron las placas a 37°C durante un día, y pasado ese tiempo se tomaron fotos desde un microscopio para observar el crecimiento celular y la activación de los macrófagos.

Posteriormente, se añadieron los estímulos de IFN- $\gamma$  e IL-4. Se utilizaron ambas citocinas recombinantes de ratón de Tebu Bio Spain. Cada citocina se añadió a un pocillo de cada medio de cultivo diferente, a una concentración de 100  $\mu$ g/mL para IFN- $\gamma$  y 20 ng/mL de IL-4. Una vez añadido el estímulo de citocina, se dejaron las células a 37°C durante 8 horas.

Pasado este tiempo, se retiraron los medios de cultivo de cada pocillo mediante aspiración, y se añadió 1 mL de TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) a cada uno de los pocillos. Una vez las células se encuentran con Trizol, se pueden congelar a -80°C hasta que se realice la extracción de RNA.

### **3.4. Extracción y cuantificación de RNA**

Para la extracción de RNA, se siguió el protocolo de TRI Reagent® de Sigma Aldrich. Tras descongelar las muestras, se dejaron 5 min a temperatura ambiente, y posteriormente se recogió el trizol de los pocillos en eppendorfs, a los que se añadieron 0.2 mL de cloroformo a cada uno. Se agitaron las muestras, se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 8 min y se centrifugaron a 12000 rcf por 15 min a 4°C. Tras la centrifugación, se recogió la fase acuosa superior, que se corresponde con la parte que contiene RNA. Con la fase acuosa recogida en nuevos eppendorfs, se le añadieron 0.5 mL de 2-propanol y se agitaron, dejándolos reposar posteriormente 5 min a temperatura ambiente. Tras ello, se volvió a centrifugar a 12000 rcf durante 10 minutos, a 4°C. Tras centrifugar, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de etanol al 70%. Tras agitar, se centrifugó a 7500 rcf, 5 min a 4°C. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet alrededor de 5 min, usando aspiración a vacío para eliminar por completo las gotas de etanol restantes. Los pellets, una vez secos, se resuspendieron en 14  $\mu$ L de agua destilada y se conservaron a -80°C hasta que se realizó la cuantificación.

La cuantificación del RNA extraído se realizó mediante ThermoScientific nanodrop Spectrophotometer. Se midió la absorbancia y se obtuvieron los ratios 280/260 y 260/230 para comprobar la pureza del RNA obtenido.

### 3.5. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se usaron los reactivos y protocolo de *NZY First-Strand cDNA Synthesis Flexible Pack*. De los componentes que incluye el pack, se utilizaron como cebadores el mix de cebadores de oligo(dT)<sub>12-18</sub> y el mix de hexámeros aleatorios, para aumentar la sensibilidad de la síntesis y obtener todo el cDNA posible a partir del mRNA.

Antes de llevar a cabo la síntesis, se ajustaron las concentraciones del RNA extraído según los datos obtenidos en la cuantificación para obtener la misma concentración en todas las muestras, con una cantidad total de RNA entre 500 y 2000 ng. Se prepararon un total de 10 µL de RNA a la misma concentración.

Siguiendo las concentraciones especificadas en el protocolo, para la síntesis de cDNA se preparó un mix con 1 µL de Oligo(dT)<sub>12-18</sub>, 2.5 µL de random hexamer mix, 1 µL de mix de dNTPs, 2 µL de 10X reaction buffer, 1 µL de NZY inhibidor de ribonucleasa, y 1 µL de NZY transcriptasa reversa. Al mix se le añadieron los 10 µL de RNA preparado. Se centrifugaron las muestras brevemente, y se llevaron a un termociclador para incubarlas a 25°C durante 10 min, luego a 50°C 30 min y posteriormente a 85°C durante 5 min para inactivar la reacción. Finalmente, se añadió 1 µL de RNAsa H y se incubó a 37°C durante 20 min para eliminar por completo los restos de RNA. Las muestras de cDNA se conservaron a 4°C hasta su futuro uso.

### 3.6. PCR cuantitativa a tiempo real

Para analizar los cambios en la expresión génica de las células J774 en el experimento se realizaron PCRs cuantitativas a tiempo real (qPCR) a partir de las muestras de cDNA sintetizadas. Se hicieron qPCRs comparativas, que se realizaron utilizando los reactivos de *Vazyme AceQ SYBR® qPCR Master Mix* y el equipo Applied BioSystems StepOnePlus.

Primero se diluyeron las muestras de cDNA para obtener una concentración final de 1.25 ng/µL, la necesaria para realizar la qPCR. Para cada reacción se preparó un mix con 0.25 µL de cebador forward (10 µM), otros 0.25 µL de cebador reverse (10 µM), 6 µL de mix SYBR Green, y 1.5 µL de H<sub>2</sub>O. Para cada reacción se utilizaron 4 µL de cDNA y 8 µL del mix, con un total de 12 µL por pocillo. Las reacciones de las qPCR se realizaron por duplicado o triplicado. El programa de qPCR consistió en 5 min a 95°C, 40 ciclos de 10 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C, y un paso final de obtención de la curva de melting, pasando lentamente desde los 60°C hasta 95°C.

Se estudiaron los genes CpH, Arg1, CD206, iNOS, Cxcl9 y MCP1. Los cebadores utilizados se pueden ver en la tabla inferior (Tabla 1).

Gen	Cebador	Secuencia 5' → 3'
CpH	Fw	TTAGAGTTGTCCACAGTCGGAGATG
	Rev	GGCAAATGCTGGACCAAACAC
Arg1	Fw	CAGAAGAATGGAAGAGTCAG
	Rev	CAGATATGCAGGGAGTCACC
CD206	Fw	ATGCCAAGTGGGAAAATCTG
	Rev	TGTAGCAGTGGCCTGCATAG
iNOS	Fw	CCCTCCTGATCTTGTGTTGGA
	Rev	CCACCCGAGCTCCTGGAAC
Cxcl9	Fw	TTCCCCCTCTTTTGCTTTTT
	Rev	TCCTTTTGGGCATCATCTTC
MCP1	Fw	GCCAGCTCTCTCTCCTCCA
	Rev	CCAAGAAGCATGACAGGGAC

**Tabla 1.** Secuencias de cebadores de los genes estudiados

Se utilizó el gen CpH como control, por lo que los valores de Ct obtenidos para cada gen de interés se normalizaron con los valores obtenidos para CpH. La cuantificación relativa de la expresión génica se calculó como  $2^{-(Ct \text{ gen control} - Ct \text{ gen de interés})}$ .

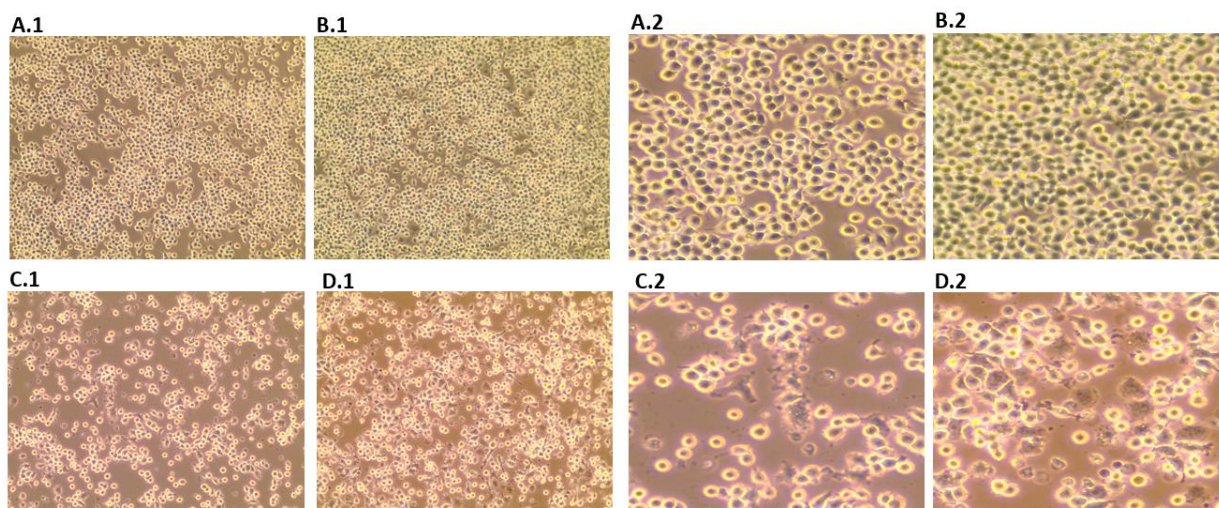
### 3.7. Análisis estadístico

Las gráficas y análisis estadísticos se realizaron mediante el software Graphpad Prism 9.0. Los resultados se presentan como media  $\pm$  desviación estándar (SD). Para comprobar si las diferencias entre los resultados de las diversas condiciones eran estadísticamente significativas, se realizó un test ANOVA de un factor seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnet, con GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).



## 4. Resultados

### 4.1. Observación morfológica de las células tras cultivarse en medios condicionados



**Figura 4.** Observación morfológica de células J774 tras 24h en cultivo con medios condicionados (CM) de ID8, KPC, y KPC HAPLN1. **A.** sin CM, **B.** ID8 CM, **C.** KPC CM, **D.** KPC HAPLN1 CM; las imágenes 1 muestran la foto completa vista a un aumento 10X, las imágenes 2 corresponden a una visión ampliada de las mismas con el fin de observar con más detalle la morfología celular.

En una primera observación de las células tras 24h en cultivo con los CM (Figura 4), se observó que los macrófagos que habían crecido en medios condicionados por KPC y KPC HAPLN1 no se encontraban en fase de expansión, sino que las células se estaban activando. Los macrófagos activados presentan una morfología más amplia y alargada. En el caso de las cultivadas con CM de KPC HAPLN1, se observa un mayor número de macrófagos activados en comparación a las células crecidas con CM de KPC. Por otra parte, en las células crecidas con CM de ID8 no se observa presencia de macrófagos activados, sino que se encuentran en fase de expansión, al igual que las células control crecidas sin medios condicionados. Estos resultados indican que el CM de células ID8 no surtió el efecto esperado, dado que los macrófagos no parecen haber respondido al medio. Aun así, estos resultados se confirmaron con el análisis de expresión de mRNA.

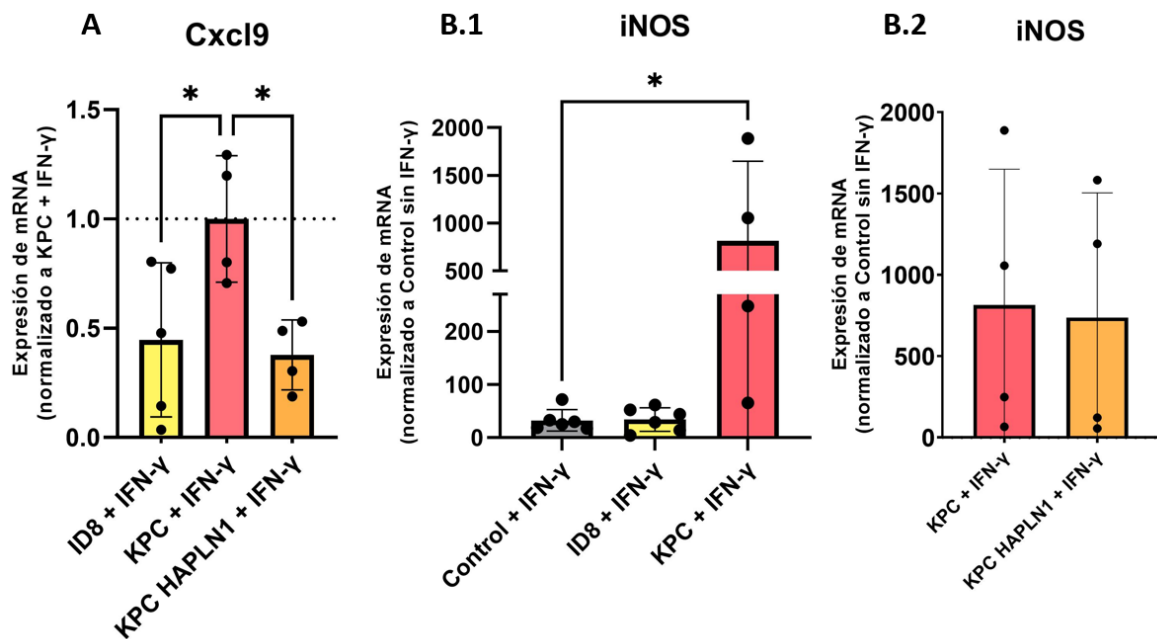
### 4.2. Análisis de expresión de mRNA

En todos los genes estudiados, en las muestras tratadas con CM pero sin estimular por citocinas no se obtuvieron valores de expresión significativamente más elevados en comparación a las muestras control sin CM, por lo que se analizan los resultados de las muestras estimuladas por IFN- $\gamma$  o IL-4 según convenga.

#### 4.2.1. Genes inducidos por IFN- $\gamma$

En las células estimuladas por IFN- $\gamma$  se estudiaron los genes iNOS y Cxcl9 que se expresan normalmente en macrófagos tras recibir este estímulo. En el caso de Cxcl9, en los controles

estimulados con IFN- $\gamma$  hubo muestras en que los resultados indicados por la qPCR fueron indeterminados, indicando que o bien no había expresión o bien estaban tan poco expresados que no llegaron a aparecer en 40 ciclos. Debido a esto, para analizar los resultados, los valores de Cxcl9 se normalizaron con los valores del gen control de las muestras tratadas con KPC + IFN- $\gamma$ . Para iNOS sí que se obtuvo expresión en las muestras control, y por tanto los valores se normalizaron con las muestras control sin estímulo de IFN- $\gamma$ .



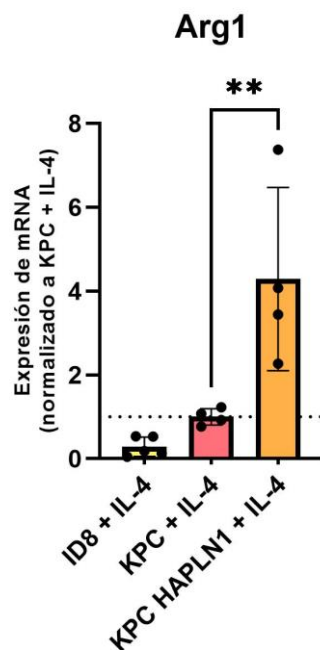
**Figura 5.** Gráficas de expresión de mRNA de los genes Cxcl9 y iNOS. En el eje X se muestra la condición experimental; en el eje Y se muestran los niveles de expresión de mRNA. Los resultados están expuestos con la media de los valores y su desviación estándar. Se muestran con asterisco las diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). **(A)** Expresión de mRNA de Cxcl9 en muestras ID8 + IFN- $\gamma$ , KPC + IFN- $\gamma$  y KPC HAPLN1 + IFN- $\gamma$ ; normalizados por KPC + IFN- $\gamma$  **(B.1)** Expresión de mRNA de iNOS de las muestras control + IFN- $\gamma$ , ID8 + IFN- $\gamma$  y KPC + IFN- $\gamma$ ; normalizada por control sin estímulo **(B.2)** Expresión de mRNA de iNOS de las muestras KPC + IFN- $\gamma$  y KPC HAPLN1 + IFN- $\gamma$ ; normalizadas por control sin estímulo.

Para el gen Cxcl9 (Figura 5.A) se observa una mayor expresión en las células tratadas con CM de KPC, teniendo diferencias significativas con los CM de ID8 y KPC HAPLN1, las cuales muestran niveles de expresión similares entre ellas. Para este gen, dado que los controles dieron valores indeterminados, los medios condicionados tienen un efecto estimulante. Este efecto es más destacado en el caso de KPC, en el que los macrófagos tuvieron una expresión de Cxcl9 mucho mayor que en los otros medios condicionados. En el CM de KPC HAPLN1, la expresión de Cxcl9 aumenta con respecto a los controles, pero es más reducida en comparación al CM de KPC, indicando que HAPLN1 tiene un efecto reductor de la inducción que proporciona el CM de KPC.

En el caso de iNOS (Figura 5.B.1), el CM de ID8 no ha parecido tener un efecto sobre la expresión, dado que presenta valores similares al control. En cambio, el CM de KPC muestra un efecto notable de estimulación con respecto al control. La diferencia estadística es significativa, a pesar de la variabilidad de los valores obtenidos. Al analizar las diferencias entre los CM de KPC y KPC HAPLN1 (Figura 5.B.2), en este caso se ve que los resultados son muy similares, de forma que para la expresión de este gen HAPLN1 no tiene ningún efecto aparente.

#### 4.2.2. Genes inducidos por IL-4

En el caso de las células estimuladas por IL-4, se analizaron los genes Arg1 y CD206. Para Arg1, al igual que ocurrió con Cxcl9, los valores para las muestras control fueron indeterminados, de modo que se normalizaron los datos de este gen usando las muestras tratadas con CM de KPC + IL-4.

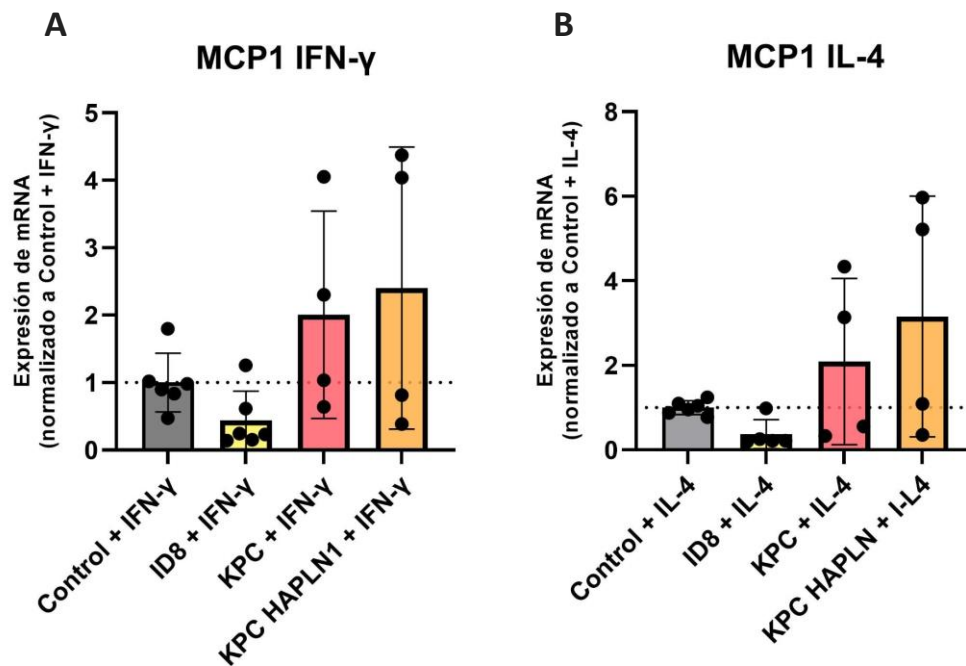


**Figura 6.** Gráfica de expresión de mRNA de Arg1. En el eje X se muestra la condición experimental; en el eje Y se muestran los niveles de expresión de mRNA normalizados por KPC + IL-4. Los resultados se muestran con la media de los valores y su desviación estándar. Se muestran con dos asteriscos las diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ).

Para Arg1 (Figura 6), se observa una expresión mucho mayor en el CM de KPC HAPLN1, siendo significativamente muy diferente con respecto a KPC. Esto implica que para este gen HAPLN1 tiene un gran efecto estimulante. Entre los valores con CM de ID8 y KPC, aunque se ven superiores en KPC, estas diferencias no son estadísticamente significativas, y para confirmarlo sería necesario aumentar el número de experimentos.

En el caso de CD206, se obtuvieron resultados de expresión elevada en las muestras control. Sin embargo, en las muestras tratadas con medios condicionados hubo valores de Ct muy bajos e incluso indeterminados. Esto puede deberse a múltiples factores. El más probable es que los medios condicionados pueden haber afectado a la cinética de expresión de CD206, la cual habría alcanzado su pico de expresión mucho antes de las 8 horas en las que se realizó el experimento y, a la hora de recoger las muestras, CD206 ya no estaría expresándose. Para comprobar esta hipótesis, sería necesario repetir el experimento recogiendo las muestras a horas diferentes tras la estimulación por IL-4 y comprobar de nuevo los niveles de expresión de los genes estudiados. Otras opciones menos probables consisten en que la expresión de CD206, frente a la exposición a los medios condicionados, se vea reducida en condiciones *in vitro*, de forma que las células estarían favoreciendo la expresión de otros genes que no se han estudiado en este proyecto; y otra posibilidad es que los medios condicionados puedan estar inhibiendo por completo la expresión de CD206 debido a algún factor desconocido.

#### 4.2.3. Gen inducido por IFN- $\gamma$ e IL-4



**Figura 7.** Gráfica de expresión de mRNA de MCP1 en tratamiento con IFN- $\gamma$  e IL-4. En el eje X se muestra la condición experimental; en el eje Y se muestran los niveles de expresión de mRNA. Los resultados mostrados con la media de los valores y su desviación estándar. **(A)** Expresión de mRNA de MCP1 en las muestras de las muestras control + IFN- $\gamma$ , ID8 + IFN- $\gamma$ , KPC + IFN- $\gamma$  y KPC HAPLN1 + IFN- $\gamma$ ; normalizadas por control + IFN- $\gamma$  **(B)** Expresión de mRNA de MCP1 de las muestras control + IL-4, ID8 + IL-4, KPC + IL-4 y KPC HAPLN1 + IL-4; normalizadas por control + IL-4

MCP1 es un gen que se puede expresar tanto frente a la estimulación por IFN- $\gamma$  como por IL-4. Se observa en ambos casos una tendencia a una mayor expresión con los CM de KPC y KPC HAPLN1, mientras que en ID8 se observa una menor expresión. Sin embargo, debido a la variabilidad de los resultados, las diferencias no son significativas (Figura 7).

#### 4.2.4. Variabilidad de los resultados

En general, se puede observar en todos los genes estudiados mucha variabilidad de las muestras. Esto surge debido a que, de los dos experimentos realizados, en uno de ellos se obtuvieron valores de expresión de mRNA más elevados. Esta diferencia puede surgir debido a que los CM utilizados en cada experimento fueron recogidos en días diferentes, de forma que pudo haber alguna diferencia entre ambos, y que en uno de los experimentos los CM no resultasen tan eficaces y la expresión no aumentase tanto como en el otro experimento realizado. Debido a esto, sería necesario realizar otra réplica del experimento para confirmar los resultados.

## 5. Discusión

### 5.1. TAMs pueden ser inducidos a expresar genes asociados a los fenotipos M1 y M2 en el TME

En los resultados obtenidos, se muestra que ha habido expresión de mRNA tanto en los macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  como en los tratados por IL-4. Al estimular con IFN- $\gamma$  se muestra alta expresión de Cxcl9 y de iNOS, dos genes característicos del fenotipo M1; mientras que al estimular con IL-4 se obtuvo expresión de Arg1 y CD206, característicos de M2. Observando más de cerca los resultados de MCP1, este es un caso más particular. Este gen normalmente tiene una mayor expresión bajo inducción a M1, y puede también contribuir a la polarización de los macrófagos hacia este fenotipo ([Carson et al., 2017](#)). Sin embargo, también se ha asociado la expresión de MCP1 al fenotipo M2. En los resultados obtenidos, MCP1 se expresa bajo estímulo tanto de IFN- $\gamma$  como de IL-4 con unos valores similares. Dado que genes característicos de ambos fenotipos han podido ser inducidos, esto podría implicar que los TAMs son células con una alta plasticidad que, dentro del ambiente condicionado por células tumorales, son capaces de cambiar sus características fenotípicas si se someten a un estímulo adecuado.

Otros estudios han mostrado que la polarización de macrófagos hacia un fenotipo u otro no se trata de dos estados independientes entre ellos, sino que muestran varios grados de polarización ([Boutillier & Elsawa, 2021](#); [Orecchioni et al., 2019](#)). De hecho, debido a esto, se han reportado casos en que los macrófagos expresan simultáneamente genes asociados al fenotipo M1 o al fenotipo M2 ([Kratochvill et al., 2015](#)).

Con todo esto en cuenta, los resultados indican que los TAMs o bien son capaces de co-expresar genes asociados a M1 y M2, caso en el cual se encontrarían en un punto intermedio entre M1 y M2; o bien son susceptibles a cambiar entre fenotipos.

## 5.2. Los macrófagos se sobreactivan en medios condicionados de KPC

Los macrófagos estudiados han mostrado un alto grado de activación en el CM de KPC. Dado que en un contexto tumoral *in vivo* los macrófagos adquieren características pro-tumorales, la sobre activación de los mismos resulta beneficiosa para el tumor y por tanto las células tumorales estarían potenciando este fenómeno.

De la misma forma en que la sobreactivación de los macrófagos beneficia al tumor, esta podría volverse en su contra si los TAMs expresasen sus características antitumorales. Dado que los macrófagos han mostrado ser células con una alta plasticidad, la reprogramación de los TAMs hacia un fenotipo M1 podría ser objeto de terapias para el tratamiento contra el EOC y PDAC.

## 5.3. El TME es un factor determinante para la activación de TAMs en el PDAC

En las muestras únicamente tratadas con los CM de KPC, sin estímulo de citocinas, se observó la activación de macrófagos morfológicamente, pero esto no se tradujo de igual forma al analizar la expresión de mRNA de los genes estudiados, en los cuales apenas hubo un aumento de expresión. Sin embargo, al combinarse el CM con los estímulos por citocinas, se observa un aumento considerable de la expresión. Los macrófagos reaccionan inicialmente ante la composición de los medios, mostrándose activos, y, al ser inducidos posteriormente con IFN- $\gamma$  e IL-4 muestran una alta expresión de los genes más característicos. Por tanto, es la combinación de estos dos factores la que consigue la sobreactivación de los macrófagos.

En este modelo *in vitro*, los CM solo contienen los factores secretados por las propias células tumorales. En un contexto tumoral *in vivo*, en el TME se encuentran muchos más componentes y tipos celulares que interactúan entre ellos y con las células tumorales. Traduciendo los resultados *in vitro* a las condiciones *in vivo*, el TME sería un factor determinante en la activación de los TAMs y en la expresión de sus genes pro-tumorales más característicos.

En este modelo se ha comprobado que los macrófagos pueden expresar genes asociados tanto a M1 como a M2 al recibir los estímulos adecuados. En vista de que los CMs por sí mismos no aumentaron significativamente la activación de los macrófagos hacia ninguno de los dos fenotipos, los factores más determinantes para la transición de los TAMs hacia la expresión de genes pro-tumorales deben encontrarse también en el TME y en su relación e interacciones con las células tumorales.

## 5.4. HAPLN1 potencia el fenotipo pro-tumoral en PDAC

El HA es uno de los componentes con mayor impacto en la ECM, y promueve la progresión del tumor (Boregowda et al., 2006; Schweer et al., 2022). Dada la interacción entre HAPLN1 y HA, esta molécula puede estar relacionada de igual forma con la progresión del PDAC.

Además, según la información previa de la que disponía el laboratorio, en los CM de KPC HAPLN1 se encuentra una mayor concentración de HA.

Se han observado efectos variables de HAPLN1 sobre la expresión de los genes analizados. En Cxcl9, HAPLN1 ha influido negativamente en su expresión. Al ser Cxcl9 un gen característico de un fenotipo antitumoral, que HAPLN1 reduzca su expresión relaciona a la molécula con un efecto pro-tumoral. En el caso de iNOS, también característico de un fenotipo antitumoral, no causa diferencias significativas con el CM de KPC, indicando un efecto neutral de HAPLN1 sobre este gen. Sobre MCP1 también tiene un efecto neutral, al no causar diferencias significativas con respecto al CM de KPC.

En el caso de Arg1 se observa la mayor diferencia provocada por HAPLN1. Arg1 es inducido por IL-4 y por tanto proviene de un fenotipo más orientado a funcionalidad pro-tumoral. El aumento significativo que produce HAPLN1 sobre este gen implica de nuevo que HAPLN1 tiene una acción pro-tumoral.

Por tanto, en este modelo *in vitro* utilizando medios condicionados, HAPLN1 tiene un efecto directo sobre los macrófagos y potencia la activación de las características pro-tumorales de estas células y, además, es capaz de inhibir algunas características antitumorales de los mismos.

### **5.5. El medio condicionado de ID8 no sobreactiva a los macrófagos**

En los resultados obtenidos, el CM de ID8 no ha mostrado una sobreactivación de los macrófagos en comparación con el control. La excepción es la expresión de Cxcl9, inducido por IFN- $\gamma$ , en el que el CM ID8 muestra valores más próximos al CM de KPC HAPLN1. Sin embargo, en todos los demás genes estudiados, ID8 muestra valores de expresión mucho más reducidos que en el CM de KPC y más similares al control sin CM.

Sin embargo, estos resultados no se corresponden con la información previa disponible de la reacción de los macrófagos al entrar en contacto con un CM de ID8. En estudios previos, se observó una sobreexpresión de Arg1 y una baja expresión de iNOS, indicando que un CM de ID8 induce un fenotipo más próximo a M2 en los macrófagos (Goossens et al., 2019). En otro estudio se comprobó que las células ID8 crecidas en CM de TAMs proliferan a mayor velocidad (Liu et al., 2017), por lo que existe una relación entre las células ID8 y los macrófagos. En este caso no se ha presentado esta inducción, por lo que se presentan dos posibilidades: que el CM generado en este modelo no induzca cambios fenotípicos en los macrófagos debido a sus componentes, o que el CM no haya funcionado. En el primer caso, el estudio previo mencionado utilizaba macrófagos derivados de la médula ósea (BMDMs) de ratones. Es posible que las células J774 no respondan de igual forma que los BMDMs y por ello hayan surgido estas diferencias. Dado que las J774 sí que responden al CM de KPC, esta opción parece menos probable.

En cuanto a la segunda posibilidad, que los CM no hayan funcionado, puede deberse a múltiples factores. El experimento se realizó dos veces, en la segunda ocasión con más duplicados muestras con medios condicionados de ID8, y los CM utilizados en cada experimento se recogieron en días diferentes. A pesar de ello, los resultados entre ambos coincidían en los bajos niveles de expresión. Los CM de ID8 se generaron de la misma forma que los CM de KPC y KPC HAPLN1, con la única diferencia de que para ID8 se cultivaron inicialmente menos células debido a su crecimiento más acelerado. El problema puede encontrarse en este apartado: las células ID8 crecen a un ritmo muy acelerado, y es posible que el CM recogido de ellas estuviera más gastado y tuviera más carencias nutricionales, de forma que los macrófagos cultivados en ellas no tuvieron la capacidad de activarse correctamente.

## 6. Conclusiones

En este proyecto, se han evaluado los cambios de expresión génica producidos en macrófagos al entrar en contacto con medios condicionados provenientes de células tumorales y al ser estimulados por citocinas. Los ambientes tumorales, junto a la estimulación externa por citocinas, provocan una sobreactivación de los macrófagos, los cuales han mostrado ser capaces de adoptar tanto características antitumorales como pro-tumorales en este ambiente, estando este último fenotipo potenciado por la acción de HAPLN1.

En conclusión, en este modelo *in vitro* las células tumorales producen factores que contribuyen a la sobreactivación de los macrófagos en un microambiente tumoral, pero no suponen un factor determinante en cuanto al fenotipo expresado por los mismos, el cual depende de las interacciones entre los macrófagos, los componentes y células del TME, y las propias células tumorales.



## Bibliografía citada

- BOREGOWDA, R., APPAIAH, H., SIDDAIAH, M., KUMARSWAMY, S., SUNILA, S., KN, T., MORTHA, K., TOOLE, B., & BANERJEE, S. (2006). Expression of hyaluronan in human tumor progression. *Journal of Carcinogenesis*, 5(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1477-3163-5-2>
- BOURGUIGNON, L. Y. W., PEYROLIER, K., GILAD, E., & BRIGHTMAN, A. (2007). Hyaluronan-CD44 Interaction with Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) Promotes Actin Polymerization and ErbB2 Activation Leading to  $\beta$ -Catenin Nuclear Translocation, Transcriptional Up-regulation, and Cell Migration in Ovarian Tumor Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 1265–1280. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604672200>
- BOUTILIER, A. J., & ELSAWA, S. F. (2021). Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6995. <https://doi.org/10.3390/ijms22136995>
- CARSON, W. F., SALTER-GREEN, S. E., SCOLA, M. M., JOSHI, A., GALLAGHER, K. A., & KUNKEL, S. L. (2017). Enhancement of macrophage inflammatory responses by CCL2 is correlated with increased miR-9 expression and downregulation of the ERK1/2 phosphatase Dusp6. *Cellular Immunology*, 314, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.02.005>
- CHEN, Y., SONG, Y., DU, W., GONG, L., CHANG, H., & ZOU, Z. (2019). Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0568-z>
- COLVIN, E. K. (2014). Tumor-Associated Macrophages Contribute to Tumor Progression in Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00137>
- DENARDO, D. G., BARRETO, J. B., ANDREU, P., VASQUEZ, L., TAWFIK, D., KOLHATKAR, N., & COUSSENS, L. M. (2009). CD4+ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. *Cancer Cell*, 16(2), 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.018>
- DHALIWAL, D., & SHEPHERD, T. G. (2022). Molecular and cellular mechanisms controlling integrin-mediated cell adhesion and tumor progression in ovarian cancer metastasis: a review. *Clinical & Experimental Metastasis*, 39(2), 291–301. <https://doi.org/10.1007/s10585-021-10136-5>
- ETZERODT, A., MOULIN, M., DOKTOR, T. K., DELFINI, M., MOSSADEGH-KELLER, N., BAJENOFF, M., SIEWEKE, M. H., MOESTRUP, S. K., AUPHAN-ANEZIN, N., & LAWRENCE, T. (2020). Tissue-resident macrophages in omentum promote metastatic spread of ovarian cancer. *Journal of Experimental Medicine*, 217(4). <https://doi.org/10.1084/jem.20191869>
- GAO, Q., YANG, Z., XU, S., LI, X., YANG, X., JIN, P., LIU, Y., ZHOU, X., ZHANG, T., GONG, C., WEI, X., LIU, D., SUN, C., CHEN, G., HU, J., MENG, L., ZHOU, J., SAWADA, K., FRUSCIO, R., ... COLEMAN, R. L. (2019). Heterotypic CAF-tumor spheroids promote early peritoneal metastasis of ovarian cancer. *Journal of Experimental Medicine*, 216(3), 688–703. <https://doi.org/10.1084/jem.20180765>
- GOOSSENS, P., RODRIGUEZ-VITA, J., ETZERODT, A., MASSE, M., RASTOIN, O., GOUIRAND, V., ULAS, T., PAPANTONOPOULOU, O., VAN ECK, M., AUPHAN-ANEZIN, N., BEBIEN, M.,

- VERTHUY, C., VU MANH, T. P., TURNER, M., DALOD, M., SCHULTZE, J. L., & LAWRENCE, T. (2019). Membrane Cholesterol Efflux Drives Tumor-Associated Macrophage Reprogramming and Tumor Progression. *Cell Metabolism*, 29(6), 1376-1389.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.02.016>
- IVANOVA, A. V., GOPARAJU, C. M. V., IVANOV, S. V., NONAKA, D., CRUZ, C., BECK, A., LONARDO, F., WALI, A., & PASS, H. I. (2009). Protumorigenic Role of HAPLN1 and Its IgV Domain in Malignant Pleural Mesothelioma. *Clinical Cancer Research*, 15(8), 2602–2611. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2755>
- KRATOCHVILL, F., NEALE, G., HAVERKAMP, J. M., VAN DE VELDE, L.-A., SMITH, A. M., KAWAUCHI, D., MCEVOY, J., ROUSSEL, M. F., DYER, M. A., QUALLS, J. E., & MURRAY, P. J. (2015). TNF Counterbalances the Emergence of M2 Tumor Macrophages. *Cell Reports*, 12(11), 1902–1914. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.033>
- LIU, L., WANG, X., LI, X., WU, X., TANG, M., & WANG, X. (2017). Upregulation of IGF1 by tumor-associated macrophages promotes the proliferation and migration of epithelial ovarian cancer cells. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6148>
- MARTINEZ, F. O., GORDON, S., LOCATI, M., & MANTOVANI, A. (2006). Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *The Journal of Immunology*, 177(10), 7303–7311. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7303>
- NOWAK, M., & KLINK, M. (2020). The Role of Tumor-Associated Macrophages in the Progression and Chemoresistance of Ovarian Cancer. In *Cells* (Vol. 9, Issue 5). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9051299>
- ORECCHIONI, M., GHOSHEH, Y., PRAMOD, A. B., & LEY, K. (2019). Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS–) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>
- PAN, Y., YU, Y., WANG, X., & ZHANG, T. (2020). Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583084>
- PAPPAS, A. G., MAGKOUTA, S., PATERAS, I. S., SKIANIS, I., MOSCHOS, C., VAZAKIDOU, M. E., PSARRA, K., GORGOULIS, V. G., & KALOMENIDIS, I. (2019). Versican modulates tumor-associated macrophage properties to stimulate mesothelioma growth. *Oncol Immunology*, 8(2), e1537427. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1537427>
- PAULUS, P., STANLEY, E. R., SCHÄFER, R., ABRAHAM, D., & AHARINEJAD, S. (2006). Colony-Stimulating Factor-1 Antibody Reverses Chemoresistance in Human MCF-7 Breast Cancer Xenografts. *Cancer Research*, 66(8), 4349–4356. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3523>
- PROVENZANO, P. P., CUEVAS, C., CHANG, A. E., GOEL, V. K., VON HOFF, D. D., & HINGORANI, S. R. (2012). Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 21(3), 418–429. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.007>

- ROBY, K. F., TAYLOR, C. C., SWEETWOOD, J. P., CHENG, Y., PACE, J. L., TAWFIK, O., PERSONS, D. L., SMITH, P. G., & TERRANOVA, P. F. (2000). Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer. *Carcinogenesis*, *21*(4), 585–591. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.4.585>
- SCHWEER, D., MCATEE, A., NEUPANE, K., RICHARDS, C., UELAND, F., & KOLESAR, J. (2022). Tumor-Associated Macrophages and Ovarian Cancer: Implications for Therapy. In *Cancers* (Vol. 14, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers14092220>
- STRACHAN, D. C., RUFFELL, B., OEI, Y., BISSELL, M. J., COUSSENS, L. M., PRYER, N., & DANIEL, D. (2013). CSF1R inhibition delays cervical and mammary tumor growth in murine models by attenuating the turnover of tumor-associated macrophages and enhancing infiltration by CD8<sup>+</sup> T cells. *Oncotarget*, *2*(12), e26968. <https://doi.org/10.4161/onci.26968>
- TAKAHARA, N., ISAYAMA, H., NAKAI, Y., SASAKI, T., SAITO, K., HAMADA, T., MIZUNO, S., MIYABAYASHI, K., MOHRI, D., KOGURE, H., MATSUBARA, S., YAMAMOTO, N., HIRANO, K., IJICHI, H., TATEISHI, K., TADA, M., & KOIKE, K. (2015). Pancreatic Cancer With Malignant Ascites. *Pancreas*, *44*(3), 380–385. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000290>
- UNO, K., IYOSHI, S., YOSHIHARA, M., KITAMI, K., MOGI, K., FUJIMOTO, H., SUGIYAMA, M., KOYA, Y., YAMAKITA, Y., NAWA, A., KANAYAMA, T., TOMITA, H., ENOMOTO, A., & KAJIYAMA, H. (2022). Metastatic Voyage of Ovarian Cancer Cells in Ascites with the Assistance of Various Cellular Components. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(8), 4383. <https://doi.org/10.3390/ijms23084383>
- WU, K., LIN, K., LI, X., YUAN, X., XU, P., NI, P., & XU, D. (2020). Redefining Tumor-Associated Macrophage Subpopulations and Functions in the Tumor Microenvironment. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11, p. 1731). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01731>
- XIA, H., LI, S., LI, X., WANG, W., BIAN, Y., WEI, S., GROVE, S., WANG, W., VATAN, L., REBECCA LIU, J., MCLEAN, K., RATTAN, R., MUNKARAH, A., GUAN, J. L., KRYCZEK, I., & ZOU, W. (2020). Autophagic adaptation to oxidative stress alters peritoneal residential macrophage survival and ovarian cancer metastasis. *JCI Insight*, *5*(18). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.141115>
- YAMADA, S., FUJII, T., YAMAMOTO, T., TAKAMI, H., YOSHIOKA, I., YAMAKI, S., SONOHARA, F., SHIBUYA, K., MOTOI, F., HIRANO, S., MURAKAMI, Y., INOUE, H., HAYASHI, M., HASHIMOTO, D., MUROTANI, K., KITAYAMA, J., ISHIKAWA, H., KODERA, Y., SEKIMOTO, M., & SATOI, S. (2021). Conversion surgery in patients with pancreatic cancer and peritoneal metastasis. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, *12*(S1), S110–S117. <https://doi.org/10.21037/jgo-20-243>
- YANG, Y., GUO, Z., CHEN, W., WANG, X., CAO, M., HAN, X., ZHANG, K., TENG, B., CAO, J., WU, W., CAO, P., HUANG, C., & QIU, Z. (2021). M2 Macrophage-Derived Exosomes Promote Angiogenesis and Growth of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by Targeting E2F2. *Molecular Therapy*, *29*(3), 1226–1238. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.11.024>

- YANG, Y., STANG, A., SCHWEICKERT, P. G., LANMAN, N. A., PAUL, E. N., MONIA, B. P., REVENKO, A. S., PALUMBO, J. S., MULLINS, E. S., ELZEY, B. D., JANSSEN, E. M., KONIECZNY, S. F., & FLICK, M. J. (2019). Thrombin Signaling Promotes Pancreatic Adenocarcinoma through PAR-1–Dependent Immune Evasion. *Cancer Research*, *79*(13), 3417–3430. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3206>
- ZHU, Y., HERNDON, J. M., SOJKA, D. K., KIM, K.-W., KNOLHOFF, B. L., ZUO, C., CULLINAN, D. R., LUO, J., BEARDEN, A. R., LAVINE, K. J., YOKOYAMA, W. M., HAWKINS, W. G., FIELDS, R. C., RANDOLPH, G. J., & DENARDO, D. G. (2017). Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. *Immunity*, *47*(2), 323-338.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.07.014>