



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 fibroblastos asociados al cáncer.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Rubio Navarro, Raúl

Tutor/a: Murguía Ibáñez, José Ramón

Cotutor/a externo: RODRIGUEZ VITA, JUAN

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL (ETSIAMN)



Mecanismos reguladores de adquisición de plasticidad tumoral: papel de los fibroblastos asociados al cáncer

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Autor: Raúl Rubio Navarro

Tutor: Murguía Ibáñez, José Ramon

Cotutor/a externo: Rodríguez Vita, Juan

Curso académico 2021-2022

Valencia, Julio 2022



Mecanismos reguladores de adquisición de plasticidad tumoral: papel de los fibroblastos asociados al cáncer.

Autor: Raúl Rubio Navarro

Localidad y fecha: Valencia, Julio de 2022

Tutor académico: Prof. D. José Ramon Murguía Ibáñez

Cotutor externo: D. Juan Rodríguez Vita

Resumen: El cáncer de ovario es el cáncer ginecológico con peor pronóstico. La razón principal para ello es que una gran parte de las mujeres presentan ya metástasis en el peritoneo al ser diagnosticadas con este tipo de cáncer. Las recidivas peritoneales son muy frecuentes en el cáncer de ovario lo que provoca que los pacientes acaben desarrollando resistencias a la quimioterapia. Una de las razones por las que estos tumores son tan difíciles de tratar es la plasticidad que tienen las células tumorales en estas metástasis. La plasticidad se define por la capacidad de las células de adoptar distintos estados dependiendo de las circunstancias ambientales para mejorar la supervivencia. Uno de los componentes que ayuda a conseguir esa plasticidad es la interacción con los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs). En este proyecto se van a explorar los mecanismos que regulan la adquisición de plasticidad en las células de cáncer de ovario y la contribución de los CAFs en dicha plasticidad. Mediante la obtención de cultivos primarios procedentes de ratones transgénicos se determinará la contribución de algunas de las rutas de señalización que los datos preliminares del laboratorio indican que podrían estar relacionadas. Este proyecto ayudará a descifrar los mecanismos bidireccionales implicados en la adquisición de plasticidad celular, necesaria para la metástasis.

Palabras clave: Fibroblastos asociados al cáncer, Cáncer de ovario, Plasticidad, Metástasis.

Abstract: Ovarian cancer is the gynecological cancer with the worst prognosis. The main reason for this is that a large proportion of women already have metastases in the peritoneum when they are diagnosed with this type of cancer. Peritoneal recurrences are very frequent in ovarian cancer, which causes patients to develop resistance to chemotherapy. One of the reasons why these tumors are so difficult to treat is due to the plasticity of the tumor cells in these metastases. Plasticity is defined by the ability of cells to adopt different states depending on environmental circumstances to improve survival. One of the components that helps to achieve this plasticity is the interaction with cancer-associated fibroblasts (CAFs). In this project it is intended to explore the mechanisms that regulate the acquisition of plasticity in ovarian cancer cells and the contribution of CAFs in this plasticity. By obtaining primary cultures from transgenic mice, the contribution of some of the signaling pathways that preliminary data from the laboratory indicate may be related will be determined. This project will help to decipher the bi-directional mechanisms involved in the acquisition of cellular plasticity necessary for metastasis.

Keywords: Cancer-associated fibroblasts; Ovarian cancer; Plasticity; Metastasis.

Lista de abreviaturas

CAFs = Fibroblastos asociados al cáncer

TAMs = Macrófagos asociados al tumor

TME = Microambiente tumoral

ECM = Matriz extracelular

DMEM = Medio eagle modificado de dulbecco

FBS = Suero bovino fetal

PDAC = Adenocarcinoma ductal pancreático

MOSEC = Células epiteliales de superficie de ovario de ratón

TGF- β = Factor de crecimiento transformante β

PDGF = Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

VEGF = Factor de crecimiento del endotelio vascular

α -SMA = Alfa actina de músculo liso

BSA = Albúmina de suero bovino

EOC = Cáncer de ovario epitelial

FAP = Proteína de activación del fibroblasto

IL-1 = Interleuquina 1

EMT = Transición epitelio-mesénquima

HAPLN1 = Proteína de enlace de hialuronano y proteoglicano-1

HA = Ácido hialurónico

NaCl = Cloruro sódico

SDS = Dodecil sulfato sódico

Doc = Sodio desoxicolato

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento a Juan Rodríguez y Francesca de Angelis por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, he aprendido mucho bajo su tutela y creo que he salido de allí como mejor profesional y lo que es más importante como mejor persona. En especial quiero agradecer a Francesca por su paciencia ya que no ha sido para nada fácil llevar un laboratorio nuevo de cero y a la vez tener tiempo para enseñar a los alumnos, darnos tiempo cuando era necesario y poder disfrutar de la estancia en el laboratorio. También quiero agradecer a mis compañeras de laboratorio, Alba, Cristina y Raquel por ayudarme todo este tiempo y hacer del laboratorio mi segundo hogar. En especial a Raquel, que ha sido una de las mejores cosas que me ha pasado este año y una compañera que nunca olvidaré.

Y sobre todo agradecer a mi familia, principalmente a mi madre y hermana, por escucharme decir tonterías todo el día y el apoyo que me dan constantemente.

Índice de apartados:

1.	Introducción	1
1.1.	El microambiente tumoral	1
1.2.	Fibroblastos asociados al cáncer	1
1.2.1.	Tipos de CAFs.....	3
1.2.2.	Biología y función de los CAFs en el contexto tumoral	3
1.3.	Función de la matriz extracelular dentro del microambiente tumoral.....	4
1.3.1.	HAPLN1 y su implicación en el cáncer	4
1.4.	Cáncer de páncreas.....	5
1.5.	Cáncer de ovario.....	5
1.6.	Importancia de la plasticidad en el desarrollo del tumor.....	5
2.	Objetivos.....	7
3.	Materiales y métodos.....	7
3.1.	Líneas celulares y medios de cultivo.....	7
3.2.	Preparación de los medios condicionados.....	8
3.3.	Contaje y viabilidad celular.....	8
3.4.	Citometría de flujo	8
3.4.1.	Preparación de las muestras	8
3.4.2.	Análisis de las muestras	9
3.5.	Análisis de RNA.....	10
3.5.1.	Extracción de RNA	10
3.5.2.	Cuantificación del RNA	10
3.6.	PCR cuantitativa (qPCR)	10
3.6.1.	Retrotranscripción a cDNA	10
3.6.2.	qPCR	11
3.7.	Análisis de proteínas	12
3.7.1.	BCA.....	12
3.7.2.	Inmunoblot	12
3.8.	Análisis estadístico de los datos	13
4.	Resultados y discusión.....	14
4.1.	Características morfológicas de las líneas celulares utilizadas	14
4.2.	Los medios condicionados inducen cambios visibles	14
4.3.	En condiciones de 1 g/L glucosa hay mucha muerte celular.....	15
4.4.	Influencia de los medios condicionados sobre el estadio celular	16
4.5.	Expresión de genes asociados a los CAFs mediante qPCR	18

4.6.	Análisis <i>in silico</i> de la supervivencia global según los niveles de expresión de LIF y FN.	19
4.7.	Análisis de Actina, Akt y P-AKT mediante Inmunoblot.	20
5.	Conclusión.....	21
6.	Bibliografía	22

Índice de figuras:

Figura 1.	Tipos celulares que contribuyen a los CAFs y sus principales factores que se encuentran involucrados en la transición hacia un fenotipo CAF	2
Figura 2.	Factores relacionados en la reprogramación de los fibroblastos en un contexto de inflamación y cáncer	2
Figura 3.	Análisis de la citometría de flujo mediante el programa FlowJo 10.0	9
Figura 4.	Líneas celulares ID8, KPC y KPC + HAPLN1 en cultivo con condiciones de 10% FBS + 4,5 g/L de glucosa.....	14
Figura 5.	Línea celular GRX después de utilizar medios condicionados para ver la diferencia en su estadio y crecimiento	15
Figura 6.	Citometría de flujo, las células han sido cultivadas en las siguientes condiciones: 4% suero y 4,5 g/L de glucosa.....	17
Figura 7.	Expresión de los genes LIF y FN cuando son sometidos a los diferentes medios condicionados respecto del grupo control	18
Figura 8.	Supervivencia global de pacientes para la expresión de mRNA de los genes estudiados por qPCR.....	19
Figura 9.	Western blot realizado sobre las GRX después de una incubación de 15 minutos a 37°C los medios condicionados, en condiciones de 4,5 g/L de glucosa y sin suero.	20

Índice de tablas:

Tabla 1.	Cebadores de los genes empleados en la qPCR	11
Tabla 2.	Conteo y viabilidad celular sobre las GRX que se encuentran en la Figura 5	16
Tabla 3.	Conteo y viabilidad celular sobre las GRX de forma previa al análisis por citometría de flujo	18

1. Introducción

1.1. El microambiente tumoral

El cáncer es una enfermedad ligada a cambios genéticos, por ello, muchas de las publicaciones e investigaciones en oncología se realizan sobre las propias células tumorales. Aunque estas amplían de forma significativa el conocimiento que se tiene sobre el cáncer, al observar más allá de las propias células neoplásicas se puede encontrar una gran cantidad de información que ayuda a comprender los mecanismos fisiopatológicos de esta enfermedad (4). Esta información reside en el entorno de elevada complejidad conocido como microambiente tumoral (TME). El TME es una estructura compleja compuesta por una gran variedad de tipos celulares embebidos en una matriz extracelular (ECM) (5). En los primeros estadios de la progresión tumoral, se origina una interacción entre las células cancerosas y los componentes del TME para favorecer la supervivencia, invasión local y diseminación metastásica de las células tumorales (5). Debido a la elevada tasa de oxígeno que está consumiéndose de forma local en el tumor, los vasos sanguíneos no son capaces de hacer frente a esta demanda, generando una respuesta en el TME, con cambios que promueven la angiogénesis para restaurar el suministro de oxígeno/nutrientes y eliminar los residuos metabólicos, que son perjudiciales para las células tumorales (5). Se han identificado cuatro componentes principales que forman el TME: las células inmunitarias, las células del estroma, los vasos sanguíneos y la matriz extracelular (3).

1.2. Fibroblastos asociados al cáncer

Entre todas las células del estroma que constituyen el microambiente tumoral, los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) son una de las poblaciones más importantes y presentan un papel clave en la progresión del tumor (1,2). En condiciones fisiológicas, los fibroblastos son esenciales para la homeostasis epitelial, interaccionando directamente con las células epiteliales o secretando al medio factores de crecimiento (7). Si se busca el origen de los CAFs se pueden encontrar varias fuentes de procedencia (Figura 1). Sin embargo, normalmente surgen a partir de los fibroblastos residentes del tejido, con los que suelen compartir marcadores en común, como la proteína de activación del fibroblasto (FAP) (4). Existen una gran variedad de factores que contribuyen a la reprogramación de los CAFs o la activación de fibroblastos durante los procesos inflamatorios y las condiciones fibróticas. Entre estos factores se encuentran señales epiteliales, como Interleucina 1 (IL-1), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). También una reprogramación del metabolismo, el estrés oxidativo, señales del estroma, microRNAs, cambios epigenéticos y otros ligandos secretados por los CAFs son capaces de activarlos hacia este fenotipo (Figura 2).

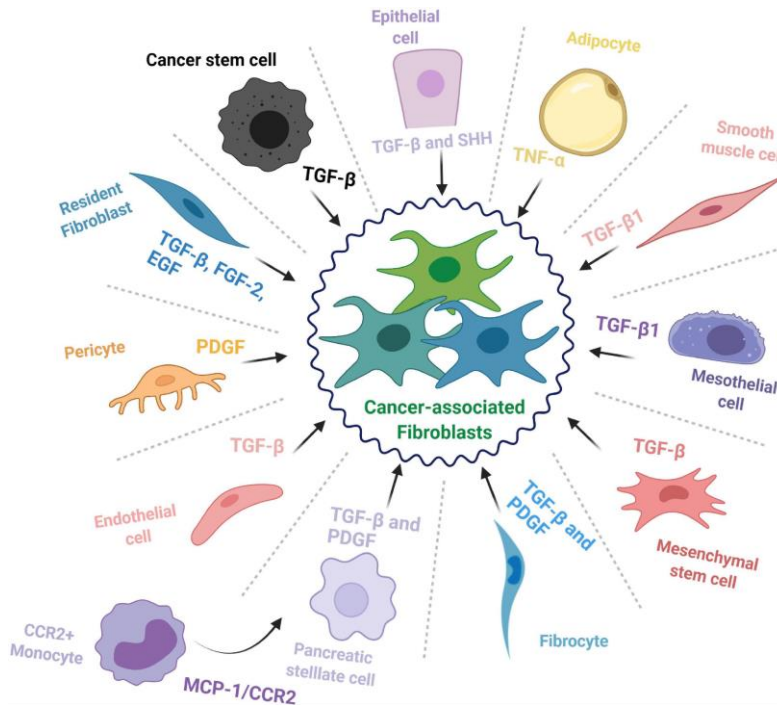


Figura 1. Tipos celulares que contribuyen a los CAFs y sus principales factores que se encuentran involucrados en la transición hacia un fenotipo CAF (40).

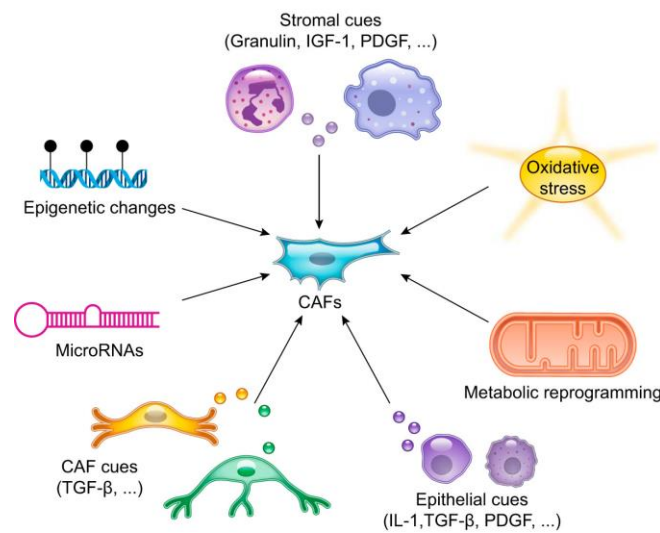


Figura 2. Factores relacionados en la reprogramación de los fibroblastos en un contexto de inflamación y cáncer (16).

1.2.1. Tipos de CAFs

Como se ha visto en las figuras anteriormente mencionadas, los CAFs pueden originarse de formas muy diversas y por multitud de factores, por esta razón no es difícil pensar que están representados por población de gran heterogeneidad (3). Normalmente, se ha observado que de forma continuada en los distintos tumores existe una subpoblación con un fenotipo contráctil productor de ECM (myoCAF) y, por otra parte, una subpoblación caracterizada por su secreción inmunomoduladora (iCAF) (48). Durante el proceso de curación de heridas, los macrófagos producen TGF- β y PDGF (7), los cuales inducen la transformación de los fibroblastos que residen en el tejido hacia miofibroblastos, caracterizados por la expresión de alfa actina de músculo liso (α -SMA) (7). Del mismo modo los myoCAF son activados y presentan la capacidad de remodelar la ECM y promover la proliferación de las células epiteliales, características que en condiciones normales ayudan durante el proceso de curación de heridas, pero en el contexto del TME promueve la progresión del cáncer (55). Por otra parte, los iCAF presentan un fenotipo secretor con una elevada producción de interleuquinas y citoquinas, como LIF, Il-6 e Il-1. A diferencia de los myoCAF, estos se activan a partir de IL-1/JAK/STAT (49,50). Otra diferencia entre ambos tipos de CAFs es la localización, mientras que los myoCAF se encuentran de forma proximal al tumor, los iCAF están ubicados de forma distal, secretando factores inmunomoduladores, esto es debido a que el TGF- β secretado por el tumor inhibe la formación de los iCAF alrededor del mismo (50).

1.2.2. Biología y función de los CAFs en el contexto tumoral

Los CAFs presentan la capacidad de regular la biología de los tumores de varias formas, a través de la remodelación de la ECM, las células tumorales pueden desplazarse libremente por el TME, además mediante la secreción de factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas, los CAFs son capaces de interactuar con otras células y promover un microambiente inmunosupresor y un reclutamiento de células endoteliales (3). Contribuyendo así al desarrollo del cáncer, el proceso metastásico, la angiogénesis e incluso la aparición de resistencias a las terapias disponibles en la práctica clínica (3). Una forma de regular el proceso metastásico es mediante la secreción de TGF- β , una citoquina requerida para la transición epitelio-mesénquima (EMT) (1). Además, la secreción de metaloproteasas permite degradar componentes de la matriz, que junto con la secreción de ácido hialurónico (HA), pueden promover la invasión de las células tumorales (3). Debido a estos factores, la presencia de CAFs normalmente está asociada a un peor pronóstico en muchos tipos de cáncer, como por ejemplo en colon (1). Pero no por ello tiene que ser así ya que no se conoce con exactitud el papel de estos en el cáncer debido a su gran heterogeneidad, esto es debido a que son capaces de promover y restringir el crecimiento del tumor dependiendo de las características del TME y del origen de las células neoplásicas (1). Por tanto, el estudio de

esta heterogeneidad en el contexto de la inflamación y cicatrización de heridas puede abrir la puerta a nuevas opciones terapéuticas ya que los cánceres comparten muchas características con estos procesos.

1.3. Función de la ECM dentro del TME

La ECM tiene importantes funciones dentro del TME; no sólo proporciona un soporte estructural para las células, sino que también es un factor clave para promover la diseminación de las propias células tumorales (13). Representa alrededor del 60% de la masa tumoral en los tumores sólidos y junto con la infiltración de fibroblastos es capaz de producir desmoplasia, una alteración que se caracteriza por una producción excesiva de tejido conectivo y su presencia es un marcador de mal pronóstico en los procesos tumorales ya que induce angiogénesis, hipoxia y compromete la inmunidad antitumoral (56). La ECM está compuesta por proteínas fibrosas, glicoproteínas, proteoglicanos y polisacáridos (HA). Estos componentes deben estar en unos niveles equilibrados para mantener un microambiente normal en el tejido donde se encuentren (5). Un componente importante que aporta estabilidad a las uniones entre estas proteínas es la proteína de enlace del hialuronano y proteoglicano-1 (HAPLN1) (13,14,30).

1.3.1. HAPLN1 y su implicación en el cáncer

HAPLN1 es una proteína que interactúa con los dominios globulares del HA y los proteoglicanos, lo que produce una mayor resistencia a la compresión en los tejidos (30). Existe evidencia que correlaciona la sobreexpresión de HAPLN1 con un aumento de la agresividad tumoral en el mesotelioma (25). De forma similar, en el carcinoma hepatocelular, un aumento en los niveles de HAPLN1 tiene como consecuencia una menor tasa de supervivencia después de realizar una resección quirúrgica (26). En cáncer gástrico también hay evidencia del papel protumoral de este gen y sus niveles se correlacionan positivamente con el sistema de estadificación del cáncer TNM (28,29). De forma contraria, en cáncer colorrectal (CRC) un aumento en los niveles de HAPLN1 está asociado con un mejor pronóstico (13). Esta proteína es producida por los fibroblastos con el objetivo de reestructurar la ECM (30-32), permitiendo de este modo la invasión a tejidos externos (28). Además, el grupo de investigación tiene datos acerca de los efectos de la expresión de HAPLN1 en tumores abdominales, como el cáncer de páncreas y de ovario, siendo en el primero el causante de la plasticidad tumoral que lo hace tan resistente ante una enorme cantidad de situaciones hostiles para cualquier tipo celular. La propagación del cáncer de ovario en el peritoneo se ha modelado en ratones utilizando la línea celular epitelial inmortalizada de ovario ID8, para el estudio del cáncer de páncreas, se ha utilizado la línea celular KPC.

1.4. Cáncer de páncreas

El cáncer de páncreas es uno de los neoplasmas malignos más letales, puede ser de dos tipos, el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) y el endocrino. El PDAC es el mayoritario y presenta una tasa de supervivencia a los 5 años alrededor del 6% (33). A lo largo de la vida de una persona el riesgo de padecerlo es de 1 en 64. Este riesgo puede verse incrementado ante la presencia de ciertos factores como la edad, el tabaquismo, la diabetes y el sobrepeso (34). El tratamiento estándar en la mayoría de los casos es una resección quirúrgica, sin embargo, el 85% de los pacientes sufre una recurrencia de la enfermedad (35). Debido a esto, la mayoría de los pacientes diagnosticados tiene que someterse a sesiones intensivas de quimioterápicos combinados en un compuesto llamado Folfirinox (ácido folínico, fluorouracilo, irinotecano y oxaliplatina), sin conseguir buenos resultados (36-38). Un paso clave para el desarrollo de metástasis en el PDAC es la EMT, permitiendo a las células cancerosas aumentar su motilidad y adquirir características invasivas (53).

1.5. Cáncer de ovario

El cáncer de ovario epitelial (EOC) es el cáncer ginecológico que más muertes origina. A lo largo de la vida de una mujer el riesgo de padecer EOC es de 1 en 78. Este riesgo empeora con la edad, aumentando su incidencia en mujeres mayores de 60 años (22). Además, la presencia de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 incrementa este riesgo un 40% y 20% respectivamente (20). De todos los cánceres de ovario, la forma más frecuente y agresiva es el carcinoma seroso de ovario de alto grado (HGSOC), el cual se caracteriza por la formación de ascitis maligna junto con metástasis peritoneales, lo que conlleva un pronóstico desastroso. El HGSOC se origina a partir de la transformación de las células epiteliales de la superficie del ovario que se propagan hacia el peritoneo, donde el fluido peritoneal esparce estas células por la cavidad abdominal, principalmente hacia el omento, un tejido adiposo visceral que cubre todo el peritoneo. En el omento, las células sufren transformaciones enfocadas en la plasticidad celular (51). Esta plasticidad es una de las razones por la que este tipo de tumores es tan difícil de tratar (19,27).

1.6. Importancia de la plasticidad en el desarrollo de un tumor

Se puede definir la plasticidad, como la capacidad celular de adquirir diferentes identidades a lo largo de un espectro fenotípico. A pesar de que es un rasgo característico que ocurre durante el desarrollo embrionario, también se ha observado en células adultas diferenciadas que se encuentran en un estado de estrés fisiopatológico como una herida o un proceso inflamatorio. La plasticidad celular, en condiciones normales, interviene en la fase de adaptación o regeneración tisular como respuesta al estrés. Cuando esta plasticidad ocurre a nivel de tejido,

se le denomina metaplasia, la cual se encuentra asociada a grandes cambios epigenéticos y transcripcionales que normalmente ocurren durante la progresión de una herida, pero, al mismo tiempo, son capaces de sobreexpresar oncogenes o disminuir la expresión de los genes supresores de tumores (TSG) (24). Si se combinan estos cambios de expresión con un contexto celular protumoral, los oncogenes tienen a su disposición las herramientas necesarias para llevar a cabo el desarrollo del cáncer. Datos previos del grupo de investigación muestran que HAPLN1 es un promotor de la plasticidad celular en PDAC. En este proyecto se va a estudiar la adquisición de esta plasticidad para entender en mayor profundidad la función de HAPLN1 en el proceso metastásico ya que la metástasis en el peritoneo suele presentar patrones similares en tumores con distintos orígenes (52).

2. Objetivos:

Los objetivos de este trabajo son diseñar y ajustar las condiciones necesarias para estudiar cómo el cáncer de ovario y páncreas son capaces de modificar a los fibroblastos. De forma adicional, se va a estudiar el papel de HAPLN1 sobre los fibroblastos *in vitro*, para compararlo con los resultados obtenidos por el grupo de investigación.

3. Materiales y métodos:

3.1. Líneas celulares y medios de cultivo

En este estudio se empleó la línea celular GRX. Esta línea celular se estableció a partir de cultivos primarios obtenidos por migración espontánea de células procedentes de granulomas inducidos en el hígado de ratones C3H/HeJ infectados con *Schistosoma mansoni* (10). Estas células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) + glutamax, con 1 g/L de glucosa, 10% de suero bovino fetal (FBS), 1% de Penicilina/Streptomycin y 1% de piruvato sódico (100 mM). Una vez alcanzada la confluencia se eliminó el medio, se añadió PBS para eliminar los restos de suero y posteriormente se adicionaron 0,8 mL de tripsina-EDTA en una placa de 10 cm² para despegar los fibroblastos, dejando incubar durante 3 minutos a 37°C. Una vez incubado, se inactivó la tripsina con el suero del DMEM, después se centrifugaron las células a 300 rcf durante 3 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con DMEM, se realizó una dilución 1:6 de las mismas, depositando las células en una placa de cultivo de 10 cm² tratada para que se adhieran a la placa.

Para la preparación de los medios condicionados se utilizaron dos líneas celulares adicionales: KPC e ID8. Estas líneas celulares fueron cultivadas del mismo modo que las GRX, con la diferencia de la cantidad de glucosa en el medio, utilizando en este caso 4,5 g/L de glucosa. La línea celular KPC proviene de tumores primarios de cáncer de páncreas derivados de ratones KPC (*Kras*^{G12D/+}, *p53*^{R172H/+}, *Elas*^{CreER/+}) (41). La línea celular ID8 está formada por células epiteliales de superficie de ovario de ratón (MOSEC) (42). A partir de la línea celular KPC se realizó una modificación en el laboratorio para que sobreexpresara HAPLN1.

3.2. Preparación de los medios condicionados

En este proyecto se utilizaron 3 medios condicionados distintos: Un medio con poca glucosa (1 g/L) sin suero, otro medio con mucha glucosa (4,5 g/L) sin suero y un tercer medio al 4% de suero con mucha glucosa.

Para la preparación de los medios condicionados se utilizaron $2,5 \times 10^5$ células por mL para ID8 y 4×10^5 células por mL para KPC. El medio condicionado al 4% de suero se preparó resuspendiendo las células en DMEM con mucha glucosa al 4% de suero y se recogió el medio después de 72 horas de cultivo. Para los medios condicionados sin suero, se cultivaron las células en medio completo y a las 24 horas se cambió por medio sin suero, posteriormente, se recogió el medio a las 72 horas de cultivo. Los medios fueron recogidos después de una centrifugación a 300 rcf durante 5 minutos y con un filtro de 0,2 μ m, para eliminar restos celulares.

3.3. Contaje y viabilidad celular

Se realizó el contaje de las células en una cámara Neubauer, siguiendo la fórmula de la Ecuación 1:

$$\frac{\text{Número de células contadas} \times \text{Inversa de la dilución}}{\text{Número de cuadros contados}} \times 10^4 = \text{Concentración celular/mL}$$

Ecuación 1. Fórmula del contaje celular en la cámara de Neubauer.

Para la viabilidad celular se utilizó el colorante azul de tripano al 10%, al fin de marcar las células muertas. La tasa de supervivencia se ha calculado siguiendo la fórmula de la Ecuación 2:

$$\frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número de células vivas} + \text{Número de células muertas}} \times 100 = \text{Tasa de supervivencia (\%)}$$

Ecuación 2. Tasa de supervivencia celular

3.4. Citometría de flujo

Para la realización de la citometría de flujo se utilizaron 4×10^5 células GRX por pocillo, en una placa de 6 pocillos. Estas células fueron cultivadas durante 48 horas en los medios condicionados antes de ser procesadas para su análisis.

3.4.1. Preparación de las muestras

La preparación de muestras en citometría de flujo se realiza siempre en hielo. Primero se extrajo el medio y se depositó en un eppendorf. Después se lavó con 500 μ L de PBS para eliminar el suero, el cual pueda inhibir a la tripsina y se tripsinizó la muestra con 200 μ L de Tripsina al

0,05%, después se incubó a 37°C durante 3 minutos. Se recogieron las células en el mismo eppendorf con el medio y se centrifugó a 300 rcf durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 250 µL de PBS. Se volvió a centrifugar a 300 rcf durante 5 minutos a 4°C y después de eliminar el sobrenadante se resuspendió en 500 µL de etanol frío para fijar las células. Se dejó reposar 30 minutos para fijar las células. Se volvió a centrifugar a 300 rcf durante 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 150 µL de una disolución de DAPI o PI) + Tritón al 0,1 %. Si se utiliza PI hay que tener en cuenta que éste es capaz de reconocer también RNA, por lo que necesita un paso adicional con RNAsa para evitar errores en la medida.

3.4.2. Análisis de las muestras

El análisis de las muestras se realizó en el citómetro CytoFLEX S (Beckman Coulter, CA, USA). El citómetro detecta el DAPI o el PI de la muestra y según la intensidad de fluorescencia da un valor indicativo de la cantidad de DNA que tiene esa célula. Con el programa FlowJo 10.0 se estudiaron los resultados obtenidos en el citómetro.

Los datos analizados se han obtenido a partir del total de partículas presentes en la muestra, las células totales, descartando en la medida de lo posible artefactos que puedan interferir en la correcta visualización de los resultados (Figura 3. A). Después se eliminaron los dobletes de células y se dejaron aquellas que se encuentran como células simples (Figura 3. B)

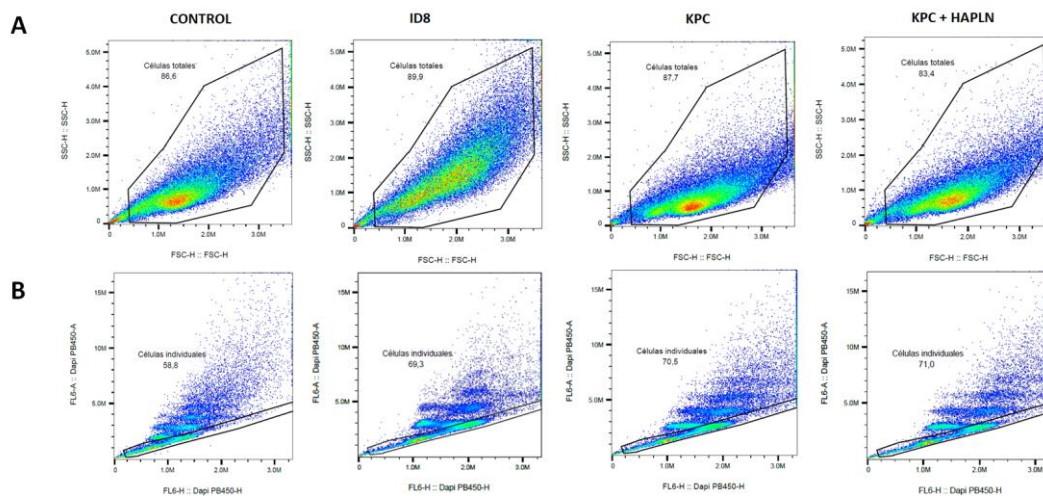


Figura 3. Análisis de la citometría de flujo mediante el programa FlowJo 10.0. Las condiciones de cultivo son 4% de FCS y 4,5 g/L de glucosa. **A** Representación de las células totales. **B** Representación de las células después de excluir los dobletes de células.

3.5. Análisis de RNA

3.5.1. Extracción de RNA

Para la extracción de RNA se han utilizado 2×10^5 células por pocillo, en una placa de 6 pocillos. Las células fueron cultivadas con los medios condicionados durante 48 horas. Primero se depositó 1 mL del reactivo Trizol (TRI) en cada pocillo de la placa de cultivo para empezar el lisado celular y de este modo poder acceder al RNA. Se dejó en un agitador orbital durante 5 minutos y su contenido se transfirió a un eppendorf. Se añadieron 200 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Después se dejó en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 rcf por 15 minutos a 2-8°C. Al acabar la centrifugación se obtienen 3 fases, una fase superficial incolora que corresponde al RNA, un halo de color blanco y viscoso que corresponde al DNA y una fase roja en la parte inferior del tubo que corresponde a las proteínas. Se extrajo la fase incolora evitando de no arrastrar las otras fases. Una vez se ha aislado esta fase se añadieron 500 μ L de 2-propanol, se mezcló y se dejó reposar durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000 rcf por 10 minutos a 2-8°C. Se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75%. Después se centrifugó a 12.000 rcf durante 5 minutos a 2-8°C. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se secó el pellet.

3.5.2. Cuantificación del RNA

Para la cuantificación del RNA primero se resuspendió el pellet del paso anterior en 13 μ L de agua esterilizada y se puso 1 μ L de cada muestra en el Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometer y se analizaron las cantidades de RNA que había en las muestras, así como los ratios que nos indican si ha habido algún tipo de contaminación. En principio se busca un ratio 260/280 cercano a 2 ya que valores más bajos son indicativos de la presencia de proteínas. En cuanto al ratio 260/230 también se busca un valor cercano a 2 ya que valores más bajos son indicadores de la presencia de contaminantes de naturaleza química.

3.6. PCR cuantitativa (qPCR)

3.6.1. Retrotranscripción a cDNA

Antes de realizar la qPCR se hace una retrotranscripción del RNA a cDNA, el primer paso es una dilución de las muestras cuantificadas hasta obtener una concentración final similar para todas las muestras ya que de este modo se podrán comparar posteriormente. En este caso se busca igualar la cantidad de RNA en las muestras, siendo 1000 ng la cantidad deseada. Para el paso de RNA a cDNA, se ha utilizado el kit NZY First-Strand cDNA Synthesis Flexible Pack, de

la compañía nzytech. La síntesis de cDNA se realizó con una incubación a 25°C durante 10 minutos, después se incubó a 50°C durante 50 minutos, a continuación a 85°C durante 5 minutos y finalmente se dejó enfriar en hielo a 4°C.

3.6.2. qPCR

Para la realización de la qPCR se ha utilizado el kit Vazyme AceQ SYBR® qPCR Master Mix, junto al equipo Applied Biosystem Step One Plus. Esta se realizó en una placa de 96 pocillos, donde se añadió en cada pocillo 4 µL de muestra a analizar y después una mix compuesta por Ace 2x Sbyr green master mix, los cebadores específicos del gen a estudiar y agua esterilizada. Los cebadores se utilizaron a una concentración de 0,4 µM. Se depositó la mix en cada pocillo según el protocolo del fabricante. Después en el termociclador se realizó la qPCR utilizando: Primero un paso previo a la desnaturalización, incubando a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente se hace la fase de desnaturalización y anillamiento + extensión durante 40 ciclos que constan de dos etapas, una primera de 10 segundos a 95°C y una segunda etapa de 30 segundos 60°C. Finalmente se lleva a cabo la curva de fusión, la cual consta de 3 fases: Una fase inicial de 95°C durante 15 segundos. Una segunda fase de 60°C durante 60 segundos y una fase final de 95°C durante 15 segundos. Los cebadores de los genes utilizados para la realización de las qPCR están recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores de los genes empleados en la qPCR.

Gen		Secuencia 5' → 3'
CpH	Forward	TTA GAG TTG TCC ACA GTC GGA GAT G
	Reverse	GGC AAA TGC TGG ACC AAA CAC
SMA	Forward	GAG AAG CCC AGC CAG TCG
	Reverse	CTC TTG CTC TGG GCT TCA
FN	Forward	ATC CGG GAG CTT TTC CCT G
	Reverse	TGC AAG GCA ACC ACA CTG AC
LIF	Forward	GCC CCA GAA GTA AAA CCT TCA G
	Reverse	CCT TCC ATT TCT CTC CAT TCC AA
CXCL16	Forward	CCT TGT CTC TTG CGT TCT TCC
	Reverse	TCC AAA GTA CCC TGC GGT ATC
IFN-B1	Forward	CAG CTC CAA GAA AGG ACG AAC
	Reverse	GGC AGT GTA ACT CTT CTG CAT

CpH se ha elegido como gen control para referenciar los niveles de expresión del resto de genes. Se ha identificado LIF como un activador de fibroblastos invasivos hacia un fenotipo protumoral mediante la señalización por TGF-β (44) y también como un marcador de iCAF. Existe evidencia en PDAC acerca de la producción de una ECM rica en

Fibronectina (Fn) por parte de los CAFs, cuya consecuencia es un aumento en la malignidad del tumor (45), además de que junto a SMA es un marcador de myoCAFs (4). CXCL16 se ha seleccionado debido a que es una citoquina expresada por los CAFs para atraer monocitos y activar en mayor medida a los CAFs (46). Después de un tratamiento quimioterápico la exposición de IFN β 1 a los fibroblastos, induce señales proinflamatorias, que al final conducen hacia un estado protumoral donde el cáncer se recupera del tratamiento que reciben los pacientes y promueve las recidivas (47). Además, tanto CXCL16 como IFN β 1 se han encontrado in vivo por parte del grupo de investigación.

3.7. Análisis de proteínas

Para analizar proteínas se van a utilizar 2×10^6 células por placa de 10 cm². Se sembraron las células con DMEM y FBS al 10% para permitir que las células se adhieran a la placa, a las 24 horas se eliminó el medio y se lavó con PBS el pocillo. Posteriormente se añadieron 8 ml de medio sin suero con 1 g/L de glucosa y otra vez a las 24 horas se repitió el mismo procedimiento, pero añadiendo 5 ml de los medios condicionado y control sin suero y poca glucosa a su respectiva placa y se dejó incubar por 15 minutos. Debido a la elevada inestabilidad que presentan las proteínas, el resto de procedimiento se va a realizar en hielo. Posteriormente se lisaron las células, mediante el uso del Ripa buffer (NaCl 150 mM, Igepal al 1%, SDS al 0,1%, Tris 7,4 pH, Doc y H₂O) durante 20 minutos en el agitador orbital. Con la ayuda de un cell scraper se recolectaron los lisados celulares. Se centrifugó a 20.817 rcf durante 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante.

3.7.1. BCA

Para cuantificar las proteínas se empleó el Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher). Se realizó una curva patrón a partir del estándar de albúmina de suero Bovino (BSA), como indica el protocolo. Una vez preparada la placa con las muestras y sus respectivos reactivos, se incubó durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Posteriormente se analizó con el Perkin Elmer Wallac Victor 2 Spectrophotometer a 570 nm.

3.7.2. Inmunoblot

Las muestras de proteínas fueron separadas por un SDS/PAGE al 10% en condiciones de 45 amperios de forma constante durante 2 horas y media, llegando a un máximo de 110 voltios. Posteriormente se transfirieron las proteínas a membranas PVDF en condiciones de 100 amperios durante toda la noche a 4°C. Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche en Tris Buffer Saline + 1x Tween (TBST). Después del bloqueo se incubó con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche y posteriormente 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizaron los anticuerpos de AKT (2920S, Cell signaling) y Phospho-Akt

(4060S, Cell signaling) y también β -actina (3700S, Cell signaling). Las membranas fueron lavadas con TBST y luego incubadas con los anticuerpos secundarios apropiados por 1 hora a temperatura ambiente. Para el revelado de las muestras se utilizó el kit quimioluminiscente (Amersham™ ECL™ Prime Western blotting detection reagent) siguiendo el protocolo del fabricante y utilizando como sistema de análisis de imagen el dispositivo Alliance Q9 Advanced (Uvitec). Las imágenes obtenidas se cuantificaron con el programa ImageJ (54).

3.8. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico de los datos se han realizado one-way ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Tukey, para la comparación del grupo control con los medios condicionados. Para la comparación de los medios condicionados de KPC (con y sin HAPLN1) se realizó otro análisis con el t-test de Wilcoxon, usando la versión 9.3.1 de GraphPad Prism para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.

4. Resultados y discusión:

4.1. Características morfológicas de las líneas celulares utilizadas:

Se han utilizado las líneas celulares de KPC e ID8 y una variación de la línea de KPC que sobreexpresa HAPLN1, por tanto, el primer paso es visualizar estas líneas celulares para ver cómo se comportan en cultivo y que características morfológicas presentan. Estas líneas van a ser las productoras de los medios condicionados, los cuales nos van a permitir comprobar el papel de los factores secretados por los tumores sobre la actividad de los fibroblastos.

Se puede apreciar en la Figura 4 que la línea celular ID8 crece de forma homogénea por toda la placa, dejando pocos huecos y las células crecen muy juntas, siendo células pequeñas y redondeadas. Por otro lado, la línea celular KPC presenta una gran cantidad de interacciones célula-célula, dejando diversas zonas de la placa sin cubrir, son células que se encuentran agrupadas entre los huecos que van dejando en la placa y presentan unas prolongaciones poco notorias características de los fibroblastos. Si vemos la línea celular de KPC + HAPLN1 se puede ver un cambio drástico con respecto a KPC ya que son células con más prolongaciones y de mayor longitud, no forman agrupaciones si no que se extienden por la placa y se puede ver como forman una red intercelular.

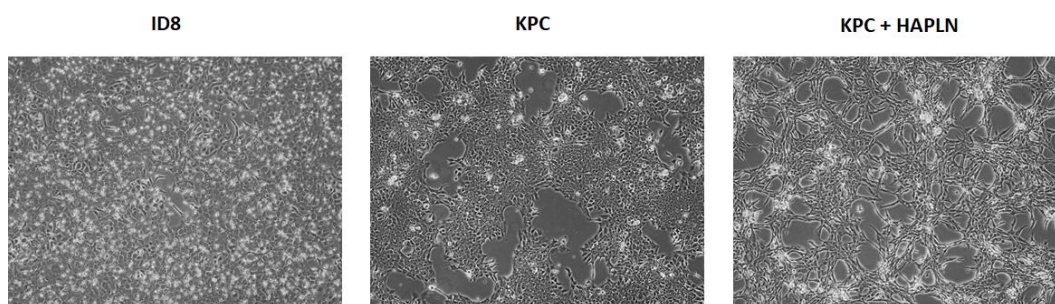


Figura 4. Líneas celulares ID8, KPC y KPC + HAPLN1 en cultivo con condiciones de 10% FBS + 4,5 g/L de glucosa. Las imágenes han sido obtenidas después de 48 horas de cultivo a 37°C con el microscopio digital invertido de la marca EVOS y después retocadas con el software ImageJ.

4.2. Los medios condicionados inducen cambios visibles

Una vez visualizadas las líneas celulares que van a ser usadas como medio condicionado, el siguiente paso es observar los posibles cambios que pueden sufrir las GRX, cuando son sometidas a medio sin suero para evitar su activación por el TGF- β presente en el suero, para ello se realizó un primer experimento donde se observan las GRX a las 48 horas de la adición de los distintos medios condicionados.

Se observó que el grupo control presenta una mayor cantidad de células vivas y éstas se expanden de forma homogénea por la placa de cultivo, como se puede apreciar en la Figura 5. Por contrapartida, las células tratadas con el medio condicionado ID8 presentan muchas células muertas como puede apreciarse en la segunda columna de la Figura 5. Los medios condicionados KPC y KPC+HAPLN1 no presentan diferencias entre sí cuando son visualizados con el microscopio óptico en estas condiciones, aunque sí hay diferencias respecto del grupo control ya que presentan una morfología más alargada y un menor número de células.

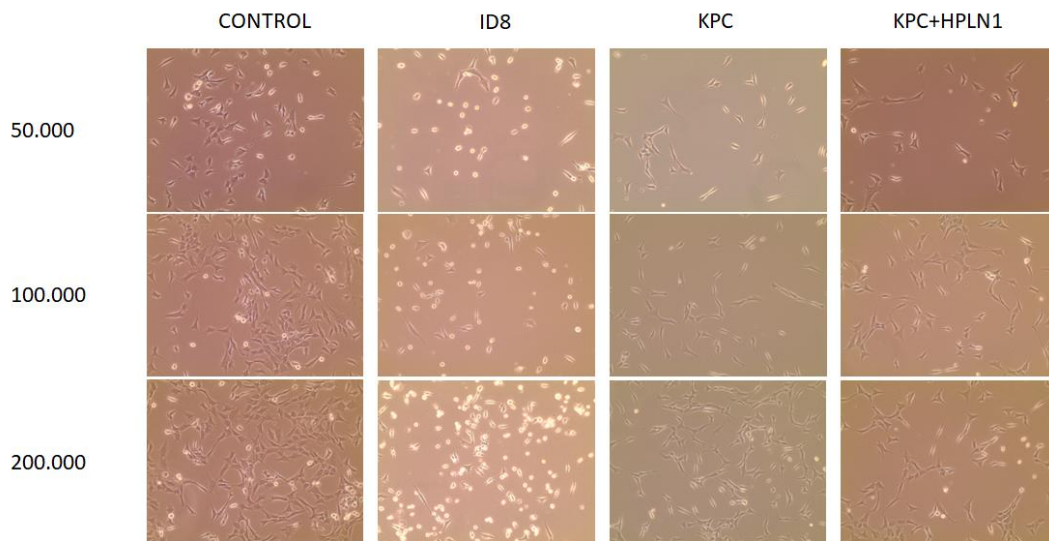


Figura 5. Línea celular GRX después de utilizar medios condicionados para ver la diferencia en su estadio y crecimiento. Se ha utilizado medio sin suero y con 1 g/L de glucosa para la realización de este experimento. Las imágenes han sido obtenidas desde el microscopio digital invertido de la marca EVOS.

4.3. En condiciones de 1 g/L glucosa hay mucha muerte celular

Para entender en mayor medida el estado en el que se encuentran las células, se realizó un conteo de viabilidad celular y así comprender en mayor medida que les está ocurriendo a las GRX a parte del cambio morfológico. Como resultado del conteo, se encontró que en ambas condiciones experimentales teníamos un patrón similar de tasa de supervivencia, siendo el medio condicionado obtenido a partir de la línea celular ID8 el que menor tasa de supervivencia presentaba, seguido de KPC, Tanto el control como KPC+HPLN1 presentaban los niveles más altos, como se puede observar en la Tabla 2. A pesar de esto, el grupo control presentaba un mayor número de células totales.

Tabla 2. Conteo y viabilidad celular sobre las GRX que se encuentran en la Figura 5. La tasa de supervivencia se ha obtenido a partir del conteo del número de células vivas y muertas y el número de células totales se ha obtenido como medida indirecta a partir de las células vivas y las diluciones realizadas a cada muestra.

Condición experimental	100.000 células		200.000 células	
	Número de células	Tasa de supervivencia (%)	Número de células	Tasa de supervivencia (%)
Control	1,43E+05	95,33	3,45E+05	89,61
ID8	1,00E+03	16,67	7,70E+04	48,94
KPC	1,25E+04	62,5	1,10E+05	85,71
KPC+HAPLN1	6,55E+04	89,12	2,27E+05	91,28

La condición experimental de 100.000 células ha dado problemas durante el análisis de resultados, esto se debe por una parte, al factor de dilución de 10^4 de la cámara de Neubauer, por lo que hay mucho margen de error en el análisis y se refleja notablemente en los resultados. Además, en la condición de 100.000 células hay muchas menos células que están en contacto, se acumulan menos señales de supervivencia y todo esto se refleja en tasas de supervivencia muy bajas. Del mismo modo, la condición experimental de 50.000 células también ha dado problemas y no se ha incluido en el análisis. A partir de la tabla 2, podemos plantearnos si los medios condicionados son efectivos sin suero y con niveles bajos de glucosa ya que la diferencia en el número de células y tasa de supervivencia respecto del control puede ser debida a un medio empobrecido en nutrientes y otros compuestos necesarios para el desarrollo de las GRX en cultivo.

4.4. Influencia de los medios condicionados sobre el estadio celular

Después de haber visto que en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes los medios condicionados disminuyen la supervivencia de los fibroblastos respecto del grupo control (Tabla 2), surgió la pregunta de si estos medios condicionados pueden generar cambios sobre el ciclo celular. Para ello, se pusieron en cultivo las células con 4% de suero ya que en condiciones de cultivo sin suero las células se quedan detenidas en fase G1 y no se verían diferencias entre las condiciones. Antes del análisis se volvió a contabilizar las células y así ver los efectos de la presencia de suero en la muestra y se vio que las GRX control presentaban el doble de células que el resto de medios condicionados, este hecho reafirma esa duda inicial respecto al consumo de los nutrientes por parte de los medios condicionados.

Como resultado de la citometría, el grupo control presenta una mayor tasa de apoptosis que los medios condicionados (Figura 6.A), en cuanto a la fase G1 sólo se han

visto diferencias significativas entre KPC y KPC+HAPLN1 (Figura 6. B2), pero no hay diferencias entre los medios condicionados (Figura 6. B1). En la fase S el grupo control se encuentra más aumentado que ID8 (Figura 6. C) y en G2 hay menos en el grupo control que el resto de las condiciones (Figura 6. D1) y además KPC+HAPLN1 se encuentra en menor proporción que KPC (Figura 6. D2). En base a los resultados observados, se puede decir que, en estas condiciones, la expresión de HAPLN1 frena el ciclo celular, aumentando el tiempo que se encuentran las células en G1.

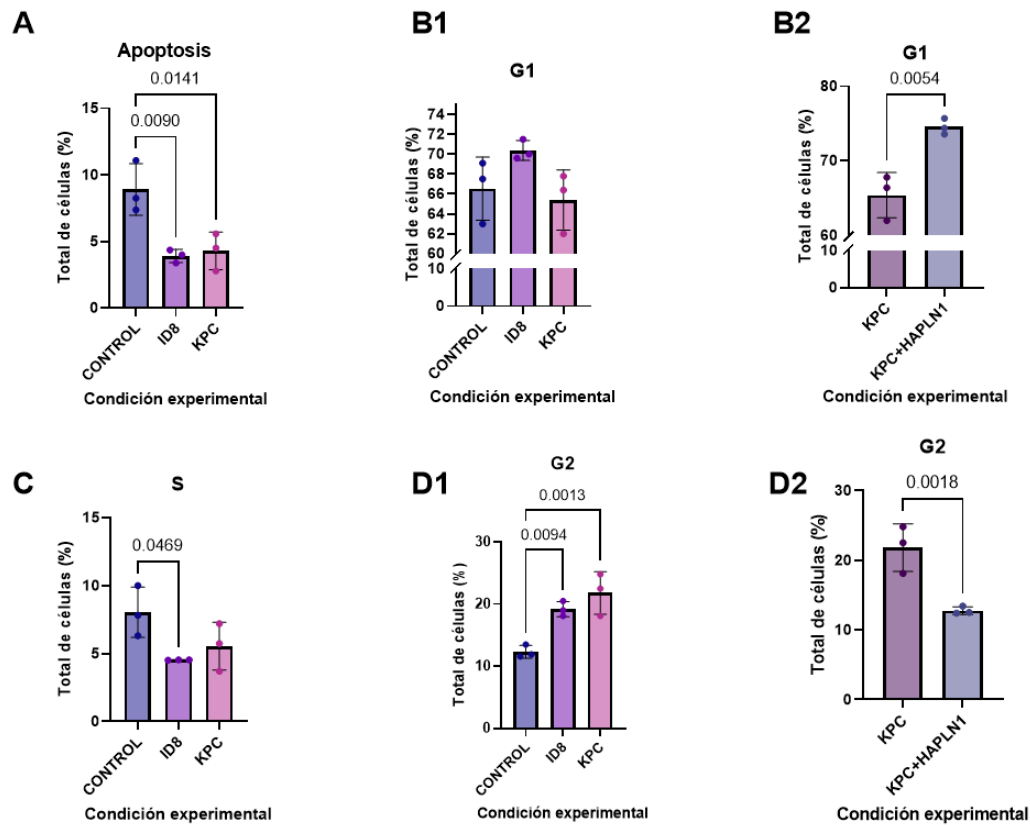


Figura 6. Citometría de flujo, las células han sido cultivadas en las siguientes condiciones: 4% suero y 4,5 g/L de glucosa. **(A)** Células en apoptosis. **(B)** Células en fase G1. **(C)** Células en fase S. **(D)** Células en fase G2.

4.5. Expresión de genes asociados a los CAFs mediante qPCR

Debido a que las células tumorales afectan a la expresión génica de las células de su entorno (1), se quiere observar si los medios condicionados pueden mostrar estos cambios de expresión. Para ello, se han realizado varias qPCR para ver cómo cambia la expresión de ciertos genes expresados por los fibroblastos y que están relacionados con el proceso de reparación de heridas o involucrados en alguna vía inflamatoria. Se ha decidido realizar las qPCR sin suero debido al hecho que en el suero hay TGF- β , lo que puede interferir con los resultados ya que esta citoquina es capaz de activar a los fibroblastos (43) y no se verían diferencias en la activación por parte de los medios condicionados. Además, se han utilizado 4,5 g/L de glucosa debido a que en la Tabla 2 se observa que 1 g/L de glucosa presenta una elevada tasa de muerte celular ya que las células sufrían mucho en estas condiciones. Para ver este efecto del aumento de la glucosa sobre las células, se repitió el experimento de viabilidad celular y la mejoría que se encuentra es abismal, como se puede observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Conteo y viabilidad celular sobre las GRX de forma previa al análisis por citometría de flujo.

Condición experimental	Número de células	Tasa de supervivencia (%)
Control	8,33E+05	83,61%
ID8	8,97E+05	80,42%
KPC	8,15E+05	85,34%
KPC+HALPN1	5,55E+05	74,33%

Como resultado de la qPCR se puede observar una disminución de ID8 en ambos genes (Figura 7.A1 y 7.B1), pero no se han encontrado diferencias entre KPC y KPC+HALPN1 (Figura 7.A2 y 7.B2). LIF es un marcador de iCAFs mientras que FN es un marcador de myoCAFs y teniendo en cuenta la falta de expresión por parte de ID8 de ambos genes (Figura 7.A1 y 7.B1), es posible que ID8 esté promoviendo un estado de dediferenciación sobre las GRX, pero habría que seguir haciendo pruebas para poder confirmarlo,

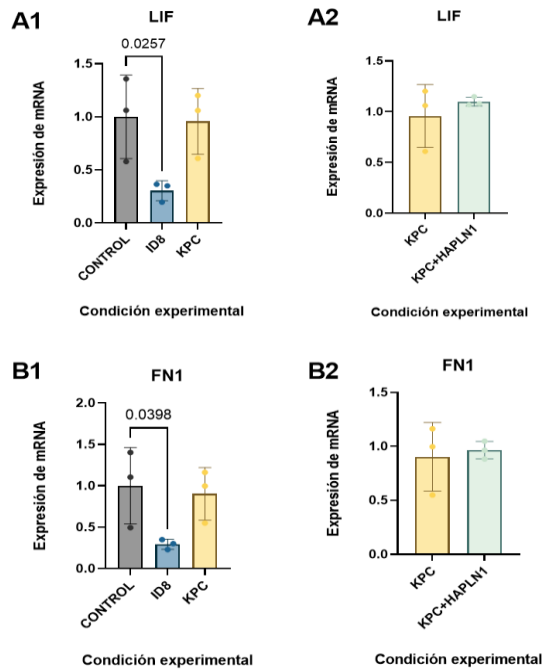


Figura 7. Expresión de los genes LIF y FN cuando son sometidos a los diferentes medios condicionados respecto del grupo control. Han sido normalizados con el control y se ha utilizado el gen CpH como referencia de expresión, en condiciones de 4,5 g/L de glucosa y sin suero.

Hay genes que no se han incluido en la Figura 7 debido a los resultados inconcluyentes que se han obtenido en las qPCR, siendo IFN β 1, CXCL16 y SMA imposibles de analizar estadísticamente.

4.6. Análisis *in silico* de la supervivencia global según los niveles de expresión de LIF y FN.

Utilizando la herramienta Kaplan-Meier plotter, la cual toma información de diversas bases de datos, como por ejemplo, Gene Expression Omnibus (GEO), o The Cancer Genome Atlas (TCGA), se van a buscar los genes analizados en la qPCR. Se puede ver que en el EOC no hay una diferencia clara de si LIF es un gen de peor pronóstico ya que el p valor es del 0.2 y tampoco se ve una clara tendencia que los diferencie (Figura 8. A). Pero claramente se ve que en ambos tipos de cáncer un aumento en los niveles de FN es siempre marcador de mal pronóstico (Figura 8).

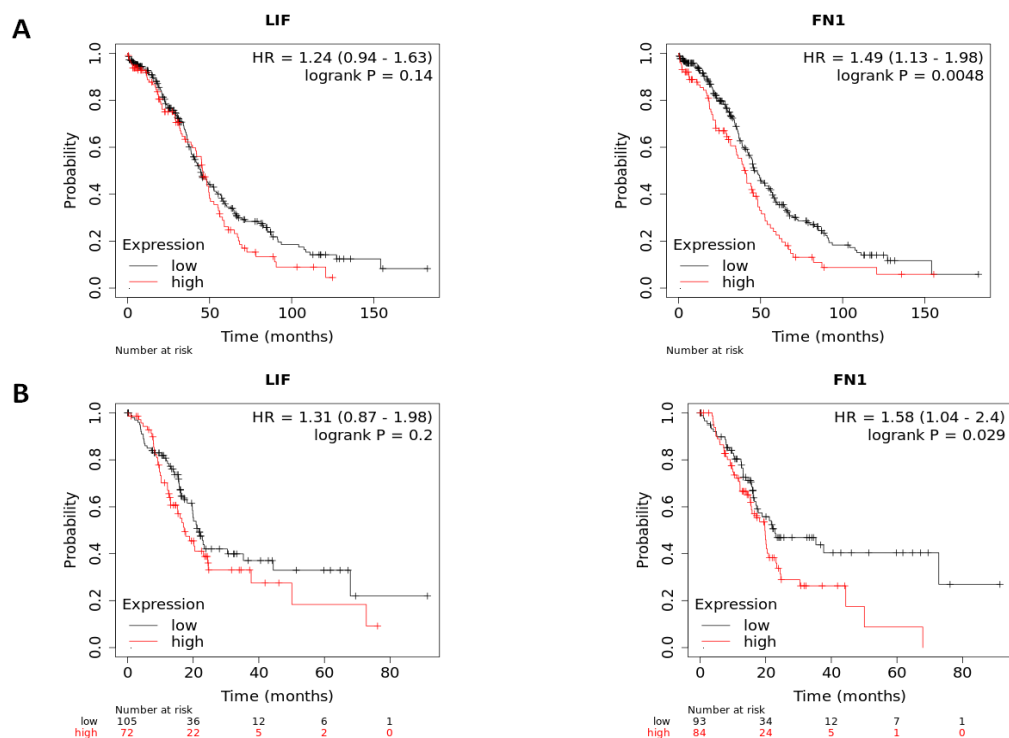


Figura 8. Supervivencia global de pacientes para la expresión de mRNA de los genes estudiados por qPCR. **(A)** Supervivencia global en EOC (n= 374). **(B)** Supervivencia global en PDAC (n = 177) a lo largo del tiempo.

4.7. Análisis de Actina, AKT y P-AKT mediante Inmunoblot

Dado que se ha mostrado en los datos preliminares del grupo de investigación que el modelo ID8 está asociado a una elevada producción de HA y que en KPC, HAPLN1 induce plasticidad tumoral también a través de la síntesis de HA, se cree que podría ser uno de los factores liberados por los medios condicionados. Por esta razón se va a evaluar la fosforilación de AKT como lectura de la señal del HA. Como resultado del Inmunoblot se vio que, como se esperaba, hay una expresión homogénea en los niveles de AKT comparados con los de β -Actina, pero hay diferencias en la fosforilación de AKT (Figura 9 A). Normalizando los niveles de fosforilación de AKT por su expresión total, se puede observar un aumento general de la fosforilación en ambos medios condicionados, siendo ID8 estadísticamente significativo (Figura 9. B1). Sin embargo, a pesar de que no se han encontrado diferencias significativas entre las condiciones KPC y KPC+HAPLN1, hay una tendencia de niveles de P-AKT más altos para KPC+HAPLN1 (Figura 9. B2). Además, no se puede confirmar que la fosforilación de AKT sea debida únicamente a la presencia de HA, por lo que es necesario seguir haciendo más ensayos para confirmar o desmentir esta afirmación.

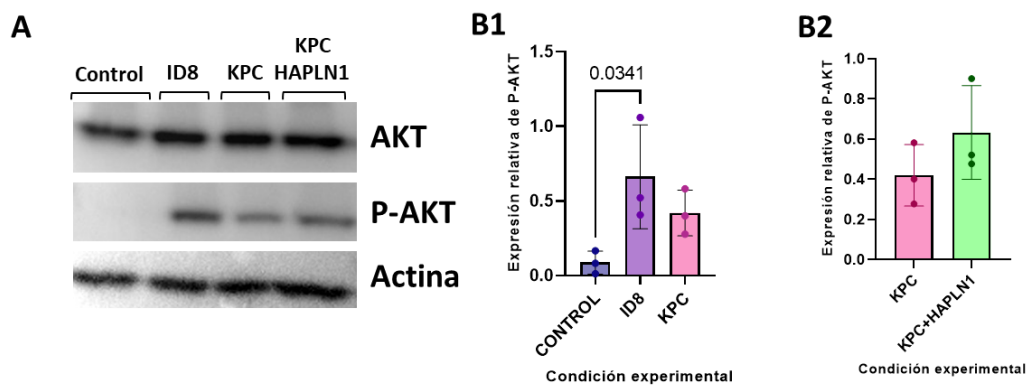


Figura 9. Western blot realizado sobre las GRX después de una incubación de 15 minutos a 37°C los medios condicionados, en condiciones de 4,5 g/L de glucosa y sin suero. (A) Expresión de proteínas asociadas a AKT, incluyendo AKT, P-AKT y β -Actina. (B) Expresión de P-AKT relativa a los niveles de AKT presentes en las muestras. Se utilizó la expresión de AKT y β -Actina como control.

5. Conclusiones

En medio sin suero y con 1g/L de glucosa, las células se encuentran en un estado de estrés tal que imposibilita estudiar los efectos de los medios condicionados ya que las diferencias encontradas principalmente son debidas a una insuficiencia de nutrientes. Al usar medio con suero, hemos observado que las células crecen mejor y con tasas de supervivencia similares entre sí, además gracias al experimento de citometría de flujo se han podido apreciar diferencias en el ciclo celular, como que HAPLN1 retrasa en estas condiciones la división celular respecto a KPC. También se ha notado que ID8 puede promover en los fibroblastos un estado de dediferenciación, pero habría que seguir investigando en el futuro para poder confirmarlo. En cuanto a la línea KPC, no se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la expresión génica con respecto del grupo control, creemos que la causa de esto se debe a que los medios condicionados no representan fielmente el entorno del tumor, hay factores insolubles en estos medios que se pierden en la matriz, por lo que otra buena aproximación de cara al futuro sería cultivar las células directamente sobre una matriz de KPC e ID8. Finalmente, hemos visto en la fosforilación de AKT una gran diferencia de los medios condicionados respecto del grupo control, siendo ID8 el que más diferencia presenta y debido a la gran cantidad de HA presente en este tipo de tumores, se cree que esta proteína es la causante de la fosforilación, sin embargo, es necesario seguir investigando para confirmar que la fosforilación se deba al HA.

6. Bibliografía

1. Chen, X., & Song, E. (2019). Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 18(2), 99–115. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0004-1>
2. Affo, S., Nair, A., Brundu, F., Ravichandra, A., Bhattacharjee, S., Matsuda, M., Chin, L., Filliol, A., Wen, W., Song, X., Decker, A., Worley, J., Caviglia, J. M. yu, L. yin, D., Saito y., Savage, T., Wells, R. G., Mack, M., ... Schwabe, R. F. (2021). Promotion of cholangiocarcinoma growth by diverse cancer-associated fibroblast subpopulations. *Cancer Cell*, 39(6), 866-882.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.03.012>
3. Louault, K., Li, R.-R., & DeClerck y. A. (2020). Cancer-associated fibroblasts: Understanding their heterogeneity. *Cancers*, 12(11), 3108. <https://doi.org/10.3390/cancers12113108>
4. Nurmik, M., Ullmann, P., Rodriguez, F., Haan, S., & Letellier, E. (2020). In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers: In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 146(4), 895–905. <https://doi.org/10.1002/ijc.32193>
5. Brassart-Pasco, S., Brézillon, S., Brassart, B., Ramont, L., Oudart, J.-B., & Monboisse, J. C. (2020). Tumor microenvironment: Extracellular matrix alterations influence tumor progression. *Frontiers in Oncology*, 10, 397. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00397>
6. GRX. (s/f). Org.br. Recuperado el 12 de junio de 2022, de <http://bcrj.org.br/celula/grx-liver-schistomiasis-mouse-fibroblast>
7. Denton, A. E., Roberts, E. W., & Fearon, D. T. (2018). Stromal cells in the tumor microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1060, 99–114. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78127-3_6
8. Bejarano, L., Jordão, M. J. C., & Joyce, J. A. (2021). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Discovery*, 11(4), 933–959. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1808>
9. Nia, H. T., Munn, L. L., & Jain, R. K. (2020). Physical traits of cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 370(6516), eaaz0868. <https://doi.org/10.1126/science.aaz0868>
10. Silva, L. C., Borojevic, R., & Mourão, P. A. (1990). Identification of cells responsible for synthesis of sulphated glycosaminoglycans in schistosome-induced hepatic granulomas. *International Journal of Experimental Pathology*, 71(6), 845–856.
11. Wang, L., Cao, L., Wang, H., Liu, B., Zhang, Q., Meng, Z., Wu, X., Zhou, Q., & Xu, K. (2017). Cancer-associated fibroblasts enhance metastatic potential of lung cancer cells through IL-6/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*, 8(44), 76116–76128. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18814>

12. Shan, T., Chen, S., Chen, X., Lin, W. R., Li, W., Ma, J., Wu, T., Cui, X., Ji, H., Li y., & Kang y. (2017). Cancer-associated fibroblasts enhance pancreatic cancer cell invasion by remodeling the metabolic conversion mechanism. *Oncology Reports*, 37(4), 1971–1979. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5479>
13. Wang y., Xu, X., Marshall, J. E., Gong, M., Zhao y., Dua, K., Hansbro, P. M., Xu, J., & Liu, G. (2021). Loss of hyaluronan and proteoglycan link protein-1 induces tumorigenesis in colorectal cancer. *Frontiers in Oncology*, 11, 754240. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.754240>
14. Long, K. R., Newland, B., Florio, M., Kalebic, N., Langen, B., Kolterer, A., Wimberger, P., & Huttner, W. B. (2018). Extracellular matrix components HAPLN1, lumican, and collagen I cause hyaluronic acid-dependent folding of the developing human neocortex. *Neuron*, 99(4), 702-719.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.013>
15. Kaur, A., Ecker, B. L., Douglass, S. M., Kugel, C. H., 3rd, Webster, M. R., Almeida, F. V., Somasundaram, R., Hayden, J., Ban, E., Ahmadzadeh, H., Franco-Barraza, J., Shah, N., Mellis, I. A., Keeney, F., Kossenkov, A., Tang, H.-Y. yin, X., Liu, Q., Xu, X., ... Weeraratna, A. T. (2019). Remodeling of the collagen matrix in aging skin promotes melanoma metastasis and affects immune cell motility. *Cancer Discovery*, 9(1), 64–81. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0193>
16. Biffi, G., & Tuveson, D. A. (2021). Diversity and biology of cancer-associated fibroblasts. *Physiological Reviews*, 101(1), 147–176. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2019>
17. Chuckran, C. A., Liu, C., Bruno, T. C., Workman, C. J., & Vignali, D. A. (2020). Neuropilin-1: a checkpoint target with unique implications for cancer immunology and immunotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(2), e000967. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000967>
18. Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 16(9), 582–598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>
19. Kossai, M., Leary, A., Scoazec, J.-Y., & Genestie, C. (2017). Ovarian cancer: A heterogeneous disease. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 85(1–2), 41–49. <https://doi.org/10.1159/000479006>
20. Kuroki, L., & Guntupalli, S. R. (2020). Treatment of epithelial ovarian cancer. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 371, m3773. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3773>
21. Mercurio, A. M. (2019). VEGF/neuropilin signaling in cancer stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 490. <https://doi.org/10.3390/ijms20030490>
22. *Ovarian cancer statistics*. (s/f). Cancer.Org. Recuperado el 12 de junio de 2022, de <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/key-statistics.html>

23. *Tipos de oncólogos.* (2019, junio 25). Cancer.Net. <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atencion-del-cancer/conceptos-basicos-sobre-el-cancer/el-equipo-de-oncologia/tipos-de-onc%C3%B3logos>
24. Yuan, S., Norgard, R. J., & Stanger, B. Z. (2019). Cellular plasticity in cancer. *Cancer Discovery*, 9(7), 837–851. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0015>
25. 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: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(8), 2602–2611. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-2755>
26. Mebarki, S., Désert, R., Sulpice, L., Sicard, M., Desille, M., Canal, F., Schneider, H. D.-P., Bergeat, D., Turlin, B., Bellaud, P., Lavergne, E., Guével, R. L., Corlu, A., Perret, C., Coulouarn, C., Clément, B., & Musso, O. (2016). De novo HAPLN1 expression hallmarks Wnt-induced stem cell and fibrogenic networks leading to aggressive human hepatocellular carcinomas. *Oncotarget*, 7(26), 39026–39043. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.934>
27. Ghoneum, A., Gonzalez, D., Abdulfattah, A. Y., & Said, N. (2020). Metabolic plasticity in ovarian cancer stem cells. *Cancers*, 12(5), 1267. <https://doi.org/10.3390/cancers12051267>
28. Zhang, T., Li, X., He y., Wang y., Shen, J., Wang, S. you, Q., Zhai, J., & Shen, L. (2022). Cancer-associated fibroblasts-derived HAPLN1 promotes tumour invasion through extracellular matrix remodeling in gastric cancer. *Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, 25(2), 346–359. <https://doi.org/10.1007/s10120-021-01259-5>
29. *Estadificación del cáncer.* (2015, September 3). Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion/estadificacion>
30. Chen y., Qiu, F. yu, B., Chen y., Zuo, F., Zhu, X., Nandakumar, K. S., & Xiao, C. (2020). Metformin, an AMPK activator, inhibits activation of FLSs but promotes HAPLN1 secretion. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 17, 1202–1214. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.05.008>
31. Huynh, M., Pak, C., Markovina, S., Callander, N. S., Chng, K. S., Wuerzberger-Davis, S. M., Bakshi, D. D., Kink, J. A., Hematti, P., Hope, C., Asimakopoulos, F., Rui, L., & Miyamoto, S. (2018). Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1) activates bortezomib-resistant NF-κB activity and increases drug resistance in multiple myeloma. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(7), 2452–2465. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000667>
32. Kaur, A., Ecker, B. L., Douglass, S. M., Kugel, C. H., 3rd, Webster, M. R., Almeida, F. V., Somasundaram, R., Hayden, J., Ban, E., Ahmadzadeh, H., Franco-Barraza, J., Shah, N., Mellis, I. A., Keeney, F., Kossenkov, A., Tang, H.-Y. yin, X., Liu, Q., Xu, X., ... Weeraratna, A. T. (2019). Remodeling of the collagen matrix in aging skin promotes melanoma metastasis and

affects immune cell motility. *Cancer Discovery*, 9(1), 64–81. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0193>

33. Ilic, M., & Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 22(44), 9694–9705. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i44.9694>

34. *Pancreatic cancer risk factors*. (n.d.). Cancer.Org. Retrieved June 13, 2022, from <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>

35. Schnelldorfer, T., Adams, D. B., Warshaw, A. L., Lillemoe, K. D., & Sarr, M. G. (2008). Forgotten pioneers of pancreatic surgery: Beyond the favorite few. *Annals of Surgery*, 247(1), 191–202. <https://doi.org/10.1097/sla.0b013e3181559a97>

36. *FOLFIRINOX*. (2020, August 26). Pancreatic Cancer UK. <https://www.pancreaticcancer.org.uk/information/treatments-for-pancreatic-cancer/chemotherapy/folfirinox/>

37. Digiacoimo, G., Volta, F., Garajova, I., Balsano, R., & Cavazzoni, A. (2021). Biological hallmarks and new therapeutic approaches for the treatment of PDAC. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/life11080843>

38. Mizrahi, J. D., Surana, R., Valle, J. W., & Shroff, R. T. (2020). Pancreatic cancer. *Lancet*, 395(10242), 2008–2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30974-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30974-0)

39. Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 16(9), 582–598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>

40. Manoukian, P., Bijlsma, M., & van Laarhoven, H. (2021). The cellular origins of cancer-associated fibroblasts and their opposing contributions to pancreatic cancer growth. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 743907. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.743907>

41. 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>

42. 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>

43. Oida, T., & Weiner, H. L. (2010). Depletion of TGF- β from fetal bovine serum. *Journal of Immunological Methods*, 362(1–2), 195–198. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.09.008>

44. Albregues, J., Bourget, I., Pons, C., Butet, V., Hofman, P., Tartare-Deckert, S., Feral, C. C., Meneguzzi, G., & Gaggioli, C. (2014). LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Reports*, 7(5), 1664–1678. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.036>

45. Erdogan, B., Ao, M., White, L. M., Means, A. L., Brewer, B. M., Yang, L., Washington, M. K., Shi, C., Franco, O. E., Weaver, A. M., Hayward, S. W., Li, D., & Webb, D. J. (2017). Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *The Journal of Cell Biology*, 216(11), 3799–3816. <https://doi.org/10.1083/jcb.201704053>
46. Allaoui, R., Bergenfelz, C., Mohlin, S., Hagerling, C., Salari, K., Werb, Z., Anderson, R. L., Ethier, S. P., Jirström, K., Pählman, S., Bexell, D., Tahin, B., Johansson, M. E., Larsson, C., & Leandersson, K. (2016). Cancer-associated fibroblast-secreted CXCL16 attracts monocytes to promote stroma activation in triple-negative breast cancers. *Nature Communications*, 7(1), 13050. <https://doi.org/10.1038/ncomms13050>
47. Maia, A., Gu, Z., Koch, A., Berdiel-Acer, M., Will, R., Schlesner, M., & Wiemann, S. (2021). IFN β 1 secreted by breast cancer cells undergoing chemotherapy reprograms stromal fibroblasts to support tumour growth after treatment. *Molecular Oncology*, 15(5), 1308–1329. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12905>
48. Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D. G., Egeblad, M., Evans, R. M., Fearon, D., Greten, F. R., Hingorani, S. R., Hunter, T., Hynes, R. O., Jain, R. K., Janowitz, T., Jorgensen, C., Kimmelman, A. C., Kolonin, M. G., Maki, R. G., Powers, R. S., Puré, E., ... Werb, Z. (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nature Reviews. Cancer*, 20(3), 174–186. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>
49. Linares, J., Marín-Jiménez, J. A., Badia-Ramentol, J., & Calon, A. (2020). Determinants and functions of CAFs secretome during cancer progression and therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 621070. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.621070>
50. Biffi, G., Oni, T. E., Spielman, B., Hao, Y., Elyada, E., Park, Y., Preall, J., & Tuveson, D. A. (2019). IL1-induced JAK/STAT signaling is antagonized by TGF β to shape CAF heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discovery*, 9(2), 282–301. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0710>
51. 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. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(4). <https://doi.org/10.1084/jem.20191869>
52. Coccolini, F., Gheza, F., Lotti, M., Virzi, S., Iusco, D., Ghermandi, C., Melotti, R., Baiocchi, G., Giulini, S. M., Ansaloni, L., & Catena, F. (2013). Peritoneal carcinomatosis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(41), 6979–6994. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i41.6979>
53. Recouvreur, M. V., Moldenhauer, M. R., Galenkamp, K. M. O., Jung, M., James, B., Zhang, Y., Lowy, A., Bagchi, A., & Commisso, C. (2020). Glutamine depletion regulates Slug to promote EMT and metastasis in pancreatic cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(9). <https://doi.org/10.1084/jem.20200388>

54. Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
55. Peraldi, P., Ladoux, A., Giorgetti-Peraldi, S., & Dani, C. (2020). The primary cilium of adipose progenitors is necessary for their differentiation into cancer-associated fibroblasts that promote migration of breast cancer cells in vitro. *Cells (Basel, Switzerland)*, 9(10), 2251. <https://doi.org/10.3390/cells9102251>
56. Piersma, B., Hayward, M. K., & Weaver, V. M. (2020). Fibrosis and cancer: A strained relationship. *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1873(2), 188356. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188356>