

Identificación de células madre tumorales y desarrollo de cultivos en 3D en líneas celulares de carcinoma colorectal

Trabajo de Fin de Grado, Curso 2014-15

Santiago Costas Ramón
23/06/2015

Dirigido por:

Julián Pardo Jimeno

Departamento de Biología Molecular y Celular
Grupo Inmunidad Efectora, Centro de
Investigación Biomédica (CIBA)

HOJA DE PRESENTACIÓN

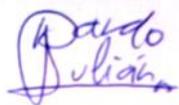
Dr. Julián Pardo Jimeno, Investigador ARAID en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón, Universidad de Zaragoza

INFORMA:

Que SANTIAGO COSTAS RAMÓN ha realizado en el Centro de Investigación Médica de Aragón bajo su dirección el Trabajo de Fin de Grado descrito en la presente memoria, que lleva por título *"Identificación de células madre tumorales y desarrollo de cultivos en 3D en líneas celulares de carcinoma colorectal"* y que el trabajo realizado cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG en Biotecnología.

Zaragoza, 2015-06-23

Firmado:



Director

Julián Pardo Jimeno

Índice

0. Resumen/Abstract.....	Pág. 1
1. Introducción	
1. Células madre tumorales	
• Características y origen de las células madre tumorales.....	Pág. 2
• Importancia del estudio de las células madre tumorales.....	Pág. 3
2. Cáncer colorectal	
• Carcinogénesis.....	Pág. 5
• Secuencia adenoma-carcinoma.....	Pág. 6
2. Antecedentes	
1. Métodos para determinar células madre tumorales en líneas celulares de carcinoma colorectal	Pág. 7
2. Objetivos del Trabajo de Fin de Grado.....	Pág. 8
3. Materiales y métodos	
• Materiales.....	Pág. 9
• Mantenimiento de cultivos celulares.....	Pág. 10
• Análisis de marcadores de superficie de las células madre tumorales en líneas celulares de carcinoma de colon.....	Pág. 11
• Análisis de la correlación entre los marcadores de superficie de las células madre tumorales con la expulsión del colorante Hoechst 33342...	Pág. 11
• Optimización del ensayo de expulsión de Hoechst 33342.....	Pág. 12
• Análisis de la correlación entre marcadores de superficie de las células madre tumorales y/o la expulsión de Hoechst 33342 con la expresión de ALDH.....	Pág. 12
• Enriquecimiento de la población de células madre tumorales utilizando Paclitaxel.....	Pág. 13
• Análisis de los efectos de la hipoxia en la expresión de los marcadores de superficie CD24, CD44 y CD133.....	Pág. 14
• Formación de cultivos en 3D <i>in vitro</i> por el método de la gota colgante	Pág. 14
• Disgregación de esferoides para el análisis de marcadores de células madre tumorales por citometría de flujo.....	Pág. 14
4. Resultados y Discusión	
• Expresión de los marcadores de superficie de células madre tumorales en las líneas celulares.....	Pág. 15
• Análisis de la correlación entre marcadores de superficie y expulsión de Hoechst 33342.....	Pág. 16
• Optimización del ensayo de expulsión del colorante Hoechst 33342.....	Pág. 18
• Análisis de la correlación entre los marcadores CD24 y CD44 y/o la expulsión de Hoechst 33342 con la sobreexpresión de ALDH.....	Pág. 19
• Análisis de la influencia del fármaco Paclitaxel en la población identificada	

como células madre tumorales.....	Pág. 20
• Análisis de la influencia de las condiciones de hipoxia en la expresión de marcadores de superficie.....	Pág. 21
• Formación de cultivos en 3D de las líneas celulares.....	Pág. 22
• Análisis de los marcadores de superficie en los cultivos en 3D.....	Pág. 23
5. Conclusiones.....	Pág. 24
6. Bibliografía.....	Pág. 25
7. Anexos	

Abreviaturas

7-AAD: 7-aminoactinomicina D

AACR: Asociación Americana para la Investigación del Cáncer (del inglés “*American Association for Cancer Research*”)

ABC: *ATP binding cassette*

ALDH: aldehído deshidrogenasa

APC: alofocianina

CSCs: células madre tumorales (del inglés “*cancer stem cells*”)

DMEM: Eagle modificado por Dubelco

DMSO: dimetilsulfóxido

FITC: isotiocianato fluorescente

MDR: *MultiDrug Resistance*

MTT: Bromuro de dimetiltiazolil difeniltetrazolium

PBS: tampón de fosfato salino

PE: ficoeritrina

PFA: Paraformaldehído

PTX: Paclitaxel

SFB: Suero fetal bovino

0 – Resumen

El carcinoma colorectal es el cáncer de mayor prevalencia entre la población, con una incidencia creciente en la población occidental acostumbrada a dietas saturadas en productos procesados y bajo consumo de frutas y verduras. Los tratamientos convencionales son efectivos pero en algunos casos el carcinoma resiste el tratamiento y resurge con una mayor patogenicidad. Se piensa que las células involucradas en esta reaparición del tumor son un tipo concreto celular que existe en todos los tumores, las células madre tumorales o CSCs. Estas células presentan una serie de características que las hace fundamentales para el mantenimiento del nicho del tumor y son estas propiedades las que les permite sobrevivir frente a las terapias y regenerar de nuevo la masa tumoral. Entre estas características se encuentran la capacidad de autorenovación y diferenciación y la alta resistencia a fármacos y terapias antitumorales. Su identificación y caracterización podría permitir dirigir las futuras terapias contra ellas y eliminar aquellos tumores más resistentes.

En este trabajo hemos evaluado diversos marcadores para CSCs en las líneas de carcinoma colorectal HT29, HCT116 y CaCo2. Entre ellos se encuentran los marcadores de superficie CD24, CD44 y CD133 y los marcadores funcionales de actividad ALDH y expulsión del colorante Hoechst 33342. Tras su evaluación, hemos puesto a punto un protocolo de identificación de CSCs está basado en el marcador de superficie CD44 y el marcador funcional de actividad ALDH. Ambos marcadores correlacionan con una población nueva de células que aparece ante un tratamiento con el fármaco Paclitaxel. A su vez, hemos puesto a punto el desarrollo de cultivos 3D en forma de esferoides con el fin de utilizar estudios *in vitro* más cercanos a la realidad fisiológica en la que las células están dispuestas formando estructuras tridimensionales.

0- Abstract

Colorectal carcinoma is the most prevalent cancer within western population due to the excessive presence of red meat and processed food in current diets. Traditional treatments for this pathology are effective in most cases, but there are limitations in the available alternative therapies for resistant tumours, which jeopardise life expectancy. Growing evidence suggests that the recurrence of cancer could be leaded by a subset of tumour cell populations, the cancer stem cells or CSCs. In this sense, cancer would be considered as a hierarchical structure controlled by an inner tumour niche of CSCs. These cells exhibit some essential properties for tumour maintenance such as autorenovation and proliferation, allowing them to survive against antitumour therapies. Thus, the identification and characterization of this subset of cells could permit us to develop targeted therapies aiming the elimination of CSCs and facing, this way, most resistant tumours.

In this project we have evaluated different protocols for the identification of CSCs in the colorectal carcinoma HT29, HCT116 and CaCo2 cell lines. This protocols are based on the study of surface markers such as CD24, CD44 and CD133 as well as functional ones such as the ALDH activity essay and the Hoechst 33342 efflux essay. We have identified that both the determination of CD44 expression and the ALDH activity assay are the best protocols to identify CSCs in colorectal cancer cell lines, showing correlation when these lines were exposed to the anticancer drug paclitaxel. Furthermore, we have evaluated the influence of hypoxia in those protocols. With another perspective we have finally optimized a 3D *in vitro* culture protocol based on spheroid generation thanks to methylcellulose to get an essay model with higher reliability and physiological representativeness.

1. Introducción

CÉLULAS MADRE TUMORALES

A lo largo de los años, se ha ido cambiando la concepción que se tenía sobre el cáncer en general y los tumores sólidos en particular, por la cual se concebían como masas celulares que crecían exponencialmente, sin orden ni control y de manera clonal. Los tumores sólidos presentan una compleja distribución celular dentro de la cual aparecen células capaces de generar vasos sanguíneos, células con distinta capacidad proliferativa o distinta resistencia a drogas,... Dentro de estas poblaciones celulares, hay una que comparte una serie de características que las hace únicas como nicho que mantiene la supervivencia del tumor y por tanto, una diana terapéutica clave para su tratamiento; son las células madre tumorales o CSCs (del inglés “cancer stem cells”).

Las CSCs pueden ser definidas como un subtipo de células dentro del complejo entramado celular que aparece en los tumores sólidos. Presentan la capacidad exclusiva de autorenovarse y generar cualquier subpoblación celular del tumor, característica que recuerda mucho a la encontrada en las células madre normales, de ahí su denominación de CSCs. Estas células existen en la mayor parte de los tumores y son las responsables de su iniciación, progresión, metástasis y supervivencia (Al-Hajj M et al. 2004).

Características y origen de las CSCs

En un primer momento se pensaba que son las células a partir de las cuales se genera la masa tumoral, que crece y se desarrolla hasta formar el tumor. De hecho, cuando se comenzaron a ver los primeros indicios de la existencia de estas células con características tan peculiares, se les denominó células madre iniciadoras de tumores (Bonnet D. et al. 1997).

Las CSCs presentan dos capacidades principales que las diferencian de las células diferenciadas: la capacidad de autorenovación y de diferenciación. Son capaces de dividirse y generar una progenie con características idénticas a las células parentales y algunas de ellas pueden diferenciarse a otras células tumorales que carecen de esta capacidad de autorenovación, considerándose por tanto estas nuevas células, células tumorales diferenciadas. Estas capacidades se han visto asociadas a una gran resistencia a fármacos antitumorales. De esta manera, el modelo CSC explica la formación de un tumor de la siguiente manera: en el interior del tumor se establece un nicho de CSCs que es el que mantiene su integridad, es capaz de generar los distintos grupos de células encontrados en un tumor y lidera su reaparición tras los tratamientos antitumorales (Huang E 2008). Sin embargo, aún está por determinar la cantidad de células con estas características que permanecen en un tumor desarrollado y su papel en el mismo. La falta de métodos consistentes que permitan la detección de estas CSCs y la gran diversidad que aparece en las muestras de pacientes para los mismos estadios de cáncer lleva irremediablemente a la controversia y la confusión entre investigadores que defienden el modelo CSC y los que no.

En cuanto al origen de las CSCs, existe controversia dentro de la comunidad científica. Algunos autores plantean la posibilidad de que mutaciones en células madre existentes los tejidos son las que provocan su aparición. Estas células utilizan la capacidad de autorenovación que ya tenían y mutaciones oncogénicas provocan su transición hacia CSCs. Otros autores en cambio, postulan que las CSCs deben de estar producidas por mutaciones en células progenitoras o células diferenciadas tumorales, es decir, en células que han perdido la capacidad de autorenovación. Mutaciones que

revertan esta diferenciación y les proporcionen de nuevo esta capacidad las convertirá en CSCs (Magee 2012). Ambas concepciones están representadas en la *Figura 1*.

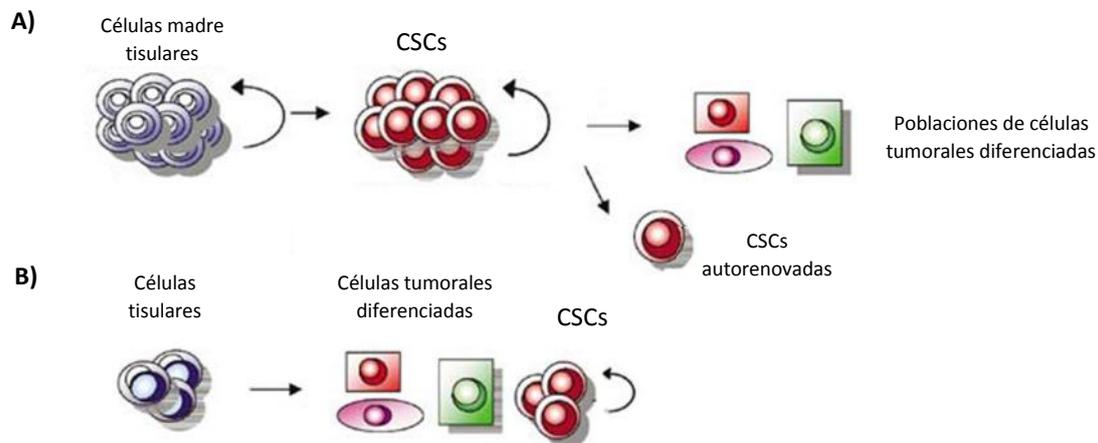


Figura 1. Representación de los modelos propuestos hasta el momento de formación de CSCs. A) Modelo célula madre: mutaciones oncogénicas en células madre con capacidad de autorenovación presentes en el tejido originan la población de CSCs. B) Modelo de evolución clonal: mutaciones en células tumorales normales que revertan el estadio de diferenciación reactivando su capacidad de autorenovación, originan la formación de CSCs.

En cualquier caso, el término “célula madre tumoral” se refiere a una serie de características funcionales; nada tiene que ver con su origen o procedencia. Esta interpretación de la palabra provocó mucha confusión con respecto al término empleado, sobre todo cuando fue acuñado en 2006 por la Asociación Americana para la Investigación del Cáncer o AACR (del inglés “American Association for Cancer Research”).

Esta última aclaración con respecto a la funcionalidad de las CSCs es importante. Muchos autores se centran en fenotipar este tipo de células, sin tener en cuenta que las características funcionales de las CSCs son las que las definen como tal, no así su fenotipo. Se ha observado una gran variabilidad en cuanto a la presencia de marcadores de superficie que puedan ser útiles para identificar las CSCs, incluso en pacientes con el mismo tipo y desarrollo de cáncer, remarcando de nuevo la importancia de un análisis funcional de dichas células que las definan como realmente células madre (Taussig DC et al. 2008). La tarea de encontrar nuevos marcadores que correlacionen con sus características funcionales es un objetivo crucial para poder dirigir las terapias antitumorales contra las CSCs de modo efectivo y selectivo.

Importancia del estudio de las CSCs en el desarrollo y pronóstico del cáncer

Con todo lo expuesto anteriormente, la cuestión principal a resolver es: ¿tiene relevancia real el estudio de las CSCs y el desarrollo de terapias dirigidas contra ellas?

John Dick, el primer investigador que identificó CSCs en ciertos tipos de leucemia, expresó de esta manera la respuesta a esta pregunta: *“It’s like dandelions in the back yard: You can cut the leaves off all you want, but unless you kill the root, it will keep growing back”* (“Son como los dientes de león en el campo: tú puedes cortar sus hojas todo lo que quieras pero si no arrancas la raíz, siempre volverán a crecer”) (E. 2005).

Por una parte, si consideramos a las CSCs como células madre normales, capaces de mantener un tumor activo y renovar cualquier tipo celular del mismo, entonces parece evidente que sí y la eliminación selectiva de estas células madre provocaría la desaparición total del tumor (*Figura 2*).

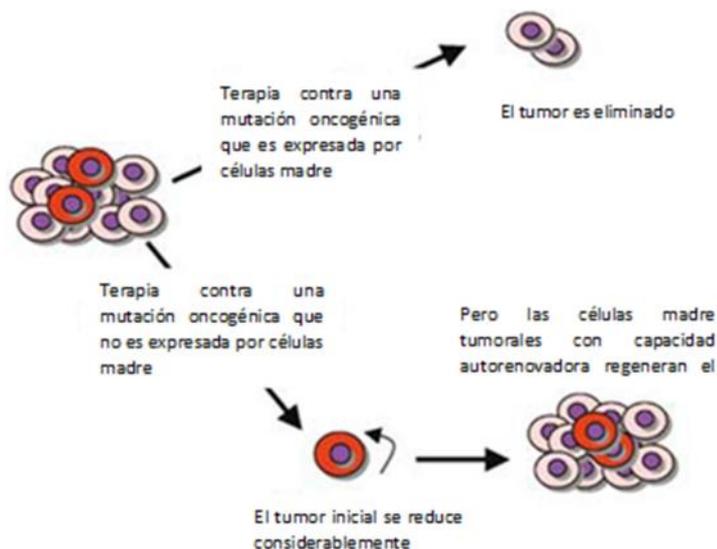


Figura 2. Representación del posible mecanismo por el cual las CSCs son capaces de provocar la reaparición del tumor tras una terapia antitumoral. La secuencia superior representa una terapia específica frente a las células madre, de tal manera que provoca la eliminación del tumor mientras que la secuencia inferior representa un tratamiento no específico que sólo reduce el tamaño del tumor, provocando la reaparición del tumor.

Adaptado de (Al-Hajj M 2004)

Sin embargo, si la progresión del tumor no depende en última instancia de las células madre sino de una población distinta y variada de células con unas mutaciones que les proporcionan el fenotipo adecuado para la supervivencia del tumor, entonces la eliminación de lo que se consideraría las células madre (células con “fenotipo CSC” pero que no son necesarias para la proliferación y mantenimiento del tumor) no tendría tanta relevancia.

Lo que sí que está claro es que la capacidad de autorenovación pertenece exclusivamente a las CSCs y dicha característica, aparece como intrínseca para los tumores más avanzados y con alta tasa de proliferación. Algunos estudios se han centrado en esta característica de los tumores y han analizado rutas de autorenovación celular conocidas como la ruta *Wnt* o *Hedgehog* con resultados interesantes (Peacock CD 2007). También se ha impuesto como característica única de las CSCs, tanto normales como tumorales, su resistencia a las toxinas xenobióticas, debido a la alta expresión de bombas de eflujo como transportadores ABC, MDR,...etc. Utilizando fármacos que inhiban dichas bombas de eflujo, podemos dirigir la terapia contra las CSCs y aumentar su efectividad.

Como resumen de todo lo expuesto anteriormente, hay evidencias de que una mejora en las terapias antitumorales pasa por eliminar aquellas células con capacidad de autorenovación y alta resistencia a los tratamientos; sin embargo aún queda mucho por investigar con respecto a si estas células pueden ser consideradas células madre tumorales y si son las células que realmente inician y promueven la supervivencia del tumor.

Los retos que quedan por resolver son 3 principalmente:

- 1) Determinar la relevancia de las células madre en la aparición de diferentes tipos de tumores. Si una población de células consideradas madre existe realmente y son las responsables de la generación del tumor, su eliminación selectiva es muy interesante. Por el contrario, si los tumores no mantienen una estructura jerárquica dirigida por las células madre, entonces la terapia tiene que dirigirse hacia aquellas células resistentes a las terapias antitumorales y células de alta proliferación.
- 2) Desarrollar un sistema experimental adecuado para la identificación de células madre de manera fenotípica y funcional a partir de tumores primarios.
- 3) Revisión completa de las terapias utilizadas hasta el momento en un intento de averiguar el papel de las células madre tumorales en la patogénesis del cáncer (Jordan 2009).

Las terapias actuales presentan una actividad citotóxica general que elimina a la mayor parte de las células tumorales pero muchas terapias no son efectivas totalmente y algunos tumores reaparecen, a veces incluso con mayor patogenicidad; si se demuestra la importancia de las células madre en esta reaparición, las nuevas terapias deberían dirigirse específicamente contra las CSCs en un intento de impedir la resistencia a las mismas y la regeneración del tumor.

CÁNCER COLORECTAL

El carcinoma colorectal es el cáncer de colon más común entre la población y representa el primer cáncer diagnosticado (tercer cáncer más diagnosticado en hombres y segundo en mujeres), con más de 1.2 millones de nuevos casos al año entre los cuales, casi la mitad son mortales. Además su prevalencia aumenta cada año entre la población occidental debido a la mala alimentación, con un bajo consumo de frutas y verduras a favor de un alto consumo de carne roja, grasas y comida procesada. La cirugía, quimioterapia y radioterapia han sido las principales estrategias para eliminar tumores en pacientes pero el desarrollo de resistencias a fármacos o a la radiación conduce a una reaparición muy agresiva del cáncer. La supervivencia de los pacientes a los 5 años tras recibir el tratamiento inicial es aproximadamente del 50% (Ferlay J 2013).

Carcinogénesis

La carcinogénesis colorectal es un proceso complejo en el cual están implicados tanto cambios genéticos y/o epigenéticos de las células epiteliales como factores ambientales como la dieta. Hasta el momento, se han propuesto dos modelos para explicar el desarrollo de la carcinogénesis colorectal: el modelo estocástico y el modelo CSCs, ambas adaptaciones del modelo clásico y el modelo CSC de formación de un tumor (Vaiopoulos AG et al. 2012).

La pared del colon está formado por 4 estructuras anatómicas distintas: mucosa, submucosa, musculatura propia y serosa. La capa mucosa está formada por una combinación de células epiteliales glandulares, lámina propia y músculo mucoso; estas células epiteliales forman una monocapa con invaginaciones rodeada por tejido conectivo de la submucosa formando las unidades funcionales del colon, las criptas de Lieberkuhn (*Figura 3*). Es en la base de estas criptas donde se localizan las células madre de este tejido, entre otras células, y conforme avanzan hacia el lumen se produce la diferenciación celular. Como ya se ha comentado, el modelo CSCs propone que los tumores están organizados de manera jerárquica liderados por las CSCs, y son ellas las únicas con el potencial para iniciar el tumor. Según este modelo, las células de las criptas del colon son cruciales para el inicio y desarrollo tumoral. En estudios experimentales se ha observado que alteraciones en esta capa de células madre producen lesiones que no producen las mismas alteraciones en otras capas celulares (Barker N et al. 2009).

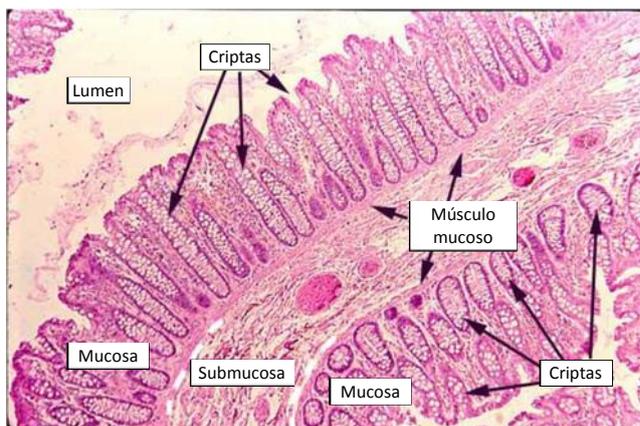


Figura 3. Análisis histológico de las capas celulares presentes en el colon. En la imagen, se pueden identificar las criptas donde se alojan las células madre presentes en este tejido, vistas como invaginaciones de la capa mucosa. *Imagen facilitada por SIU (School of Medicien) Medical Resource Center, Southern Illinois University.*

Secuencia adenoma-carcinoma

Se ha descrito el desarrollo de los carcinomas colorectales como una serie de pasos que llevan desde el epitelio normal hasta el carcinoma de colon, la llamada secuencia adenoma-carcinoma (*Figura 4*). La secuencia comienza con el desarrollo del adenoma, la forma premaligna de la lesión y que tratada a tiempo puede ser restaurada por completo. A partir de los adenomas, diversos cambios genéticos originan el carcinoma, la forma maligna del tumor con una alta capacidad invasiva y metastásica.

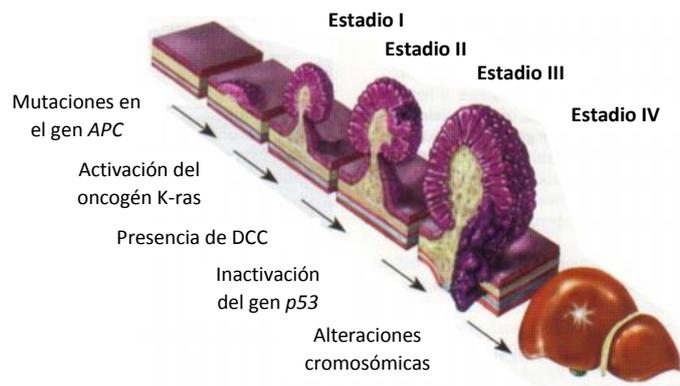


Figura 4. Representación de la secuencia adenoma-carcinoma en el desarrollo del carcinoma colorectal. En cada paso se indica los eventos más significativos y el estadio de desarrollo del tumor al que corresponde.

Se ha observado que mutaciones en el gen *APC* están asociadas con la aparición de adenomas. Este gen codifica para un supresor tumoral, denominado de manera homóloga, que controla la concentración intracelular de β -catenina implicada en la adhesión celular y la ruta de señalización *Wnt*. La proteína APC también se encarga de colaborar en el control de la división celular y la migración por lo que aparece como una proteína crucial en el ciclo celular. Se ha visto que mutaciones en el gen *APC* que provocan la inactivación de su proteína aparecen en más del 70% de los casos de adenomas colorectales, estableciéndose como un paso clave en el desarrollo de la secuencia (Kinzler KW et al. 1996). Además de este gen, se ha visto que mutaciones en el oncogén *K-ras* que promueven su activación e inactivaciones del gen supresor de tumores *p53* están asociadas con la formación de carcinomas. Estas mutaciones características del carcinoma colorectal son acompañadas generalmente con inestabilidad cromosómica y cambios estructurales profundos en los cromosomas, provocando el desarrollo de la secuencia adenoma-carcinoma y asociados a un mal pronóstico una vez desarrollado el carcinoma (Lengauer C et al. 1997) (*Figura 3*). Sin embargo, en general la heterogeneidad en los cánceres colorectales es muy alta así como los genes asociados a ellos.

2. Antecedentes y Objetivos

El aislamiento de CSCs puede ser llevado a cabo con técnicas basadas en los distintos marcadores de superficie de las CSCs, asociados con la renovación celular y la resistencia a fármacos. En concreto, para las CSCs asociadas a carcinoma colorectal o CR-CSCs (del inglés “colorectal-cancer stem cells”) se han encontrado como candidatos los marcadores de superficie CD133, CD44 y CD24.

CD133 fue identificado por primera vez en 1997 en las células madre hematopoyéticas (Yin AH 1997). También conocida como prominina-1 o AC133, CD133 es una proteína transmembrana de peso 120 kDa localizada principalmente a nivel de protuberancias de la membrana plasmática. Varios estudios inmunohistoquímicos muestran que CD133 se localiza exclusivamente en la membrana luminal de las glándulas cancerosas (Kojima M 2008). Aun así, se desconoce por completo la ruta metabólica o de señalización en la que está implicado CD133. Estudios *in vivo* con ratones demostraron que la única población capaz de desarrollar tumores era la población CD133⁺ y además dicha población era mucho más resistente al tratamiento con quimioterapia, por lo que parece que CD133 podría ser un buen marcador de células madre tumorales (O'Brien CA 2007).

CD44 es un receptor del ácido hialurónico que ha sido propuesto como un marcador de células madre alternativo. Se sabe que está involucrado en el crecimiento celular, la diferenciación y la supervivencia. Además, como molécula de adhesión, juega un papel importante en la migración tumoral y ha sido correlacionado con una alta tasa de formación de colonias e iniciación de tumores (Horst D 2009). En combinación con CD133, puede ser un buen marcador de células madre, como ha sido descrito por Vaiopolos et al. (Vaiopoulos AG et al. 2012).

Se han descrito otros marcadores relevantes para el estudio, identificación y aislamiento de células madre como **CD24** (Choi D 2009, Horst D 2009). En cualquier caso, no todos los estudios observan los mismos resultados apareciendo ciertas contradicciones. Por lo general, se ha extendido el uso de CD133 como identificador de células madre tumorales pero en el caso concreto de carcinomas colorectales, parece ser que un incremento en la expresión de CD44 parece ser más significativo en cuanto a características de células madre que la expresión de CD133 (Peter Chu 2009).

Además de los marcadores de superficie, otra forma de identificar las células madre tumorales es por la valoración de sus características funcionales. Dos ensayos muy habituales en los últimos años para la identificación de estas células son los ensayos de actividad de la enzima Aldehído deshidrogenasa (ALDH) y los ensayos de expulsión de Hoechst 33342 mediante bombas de eflujo.

La **ALDH1** ha surgido en la última década como un potente marcador universal para células madre y progenitoras, tanto normales como tumorales. En cuanto a células epiteliales de colon se refiere, se ha observado que en la base de las criptas no cancerosas aparece una rara población celular que sobreexpresa dicha enzima y durante la progresión cancerosa, la expresión de ALDH aumenta significativamente (Huang E and BM. 2009). Aislando estas células que sobreexpresan ALDH, se pudieron generar tumores en los que se observó que además de un aumento de expresión de ALDH, aparecía un aumento significativo de tumorigenicidad y de su habilidad para generar esferoides en cultivo.

El colorante **Hoechst 33342** es un colorante vital utilizado comúnmente en laboratorios de biología celular para tinciones nucleares. Es capaz de unirse al DNA, permitiendo teñir los núcleos de

las células y observarlos mediante microscopía así como las distintas aberraciones nucleares que pueden producirse, como por ejemplo los eventos apoptóticos de la célula (Darzynkiewicz Z 1992). Pero también puede ser útil para analizar la presencia de bombas de eflujo en la membrana plasmática. El Hoechst 33342 es un compuesto identificado como extraño en la célula y por tanto puede ser susceptible de ser expulsado al exterior por las bombas de eflujo de la célula. Se ha visto que las células madre presentan una mayor cantidad de bombas de eflujo de tal manera que puede utilizarse Hoechst 33342 como marcador funcional de las células madre, identificando una población celular capaz de expulsar más colorante que el resto. Las células identificadas con este marcador funcional son las denominadas *side population* o población lateral y se ha correlacionado con las características de células madre (Patrawala L 2005).

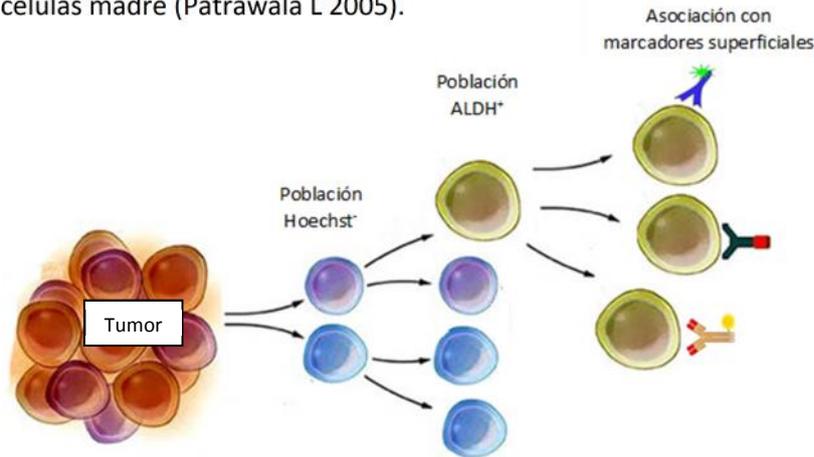


Figura 5. Representación esquemática del objetivo principal del Trabajo de Fin de Grado presentado.

Dicho objetivo consiste en la identificación de células madre tumorales mediante la correlación de dos marcadores funcionales (ALDH y Hoechst 33342) y 3 marcadores de superficie (CD24, CD44 y CD133).

Objetivos del Trabajo de Fin de Grado

Una vez revisados los trabajos e investigaciones anteriores, nos planteamos la identificación de células madre tumorales en líneas de cáncer colorectal utilizando los marcadores mejor valorados (Figura 5). Para cumplir dicho objetivo principal, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Identificación de los principales marcadores de superficie expresados en las líneas celulares de cáncer colorectal HT29, HCT116 y CaCo2. Para ello, se estudió la expresión de las proteínas CD24, CD44 y CD133 descritas como marcadores de CSCs en las distintas líneas celulares.
- 2) Asociación de la expresión de marcadores de superficie de CSCs con la presencia de bombas de eflujo en la membrana celular, utilizando el ensayo de expulsión de Hoechst 33342 y la sobreexpresión de la enzima ALDH en la líneas celulares indicadas.
- 3) Análisis del efecto del fármaco antitumoral Paclitaxel sobre los marcadores de superficie y funcionales de células madre en las mismas líneas celulares.
- 4) Análisis del efecto de la hipoxia sobre los marcadores de superficie de células madre en dichas líneas celulares.

Las limitaciones del cultivo *in vitro* en cuanto a reproducibilidad de la enfermedad ha potenciado en los últimos años el desarrollo de los cultivos en 3D, como un modelo *in vitro* más aproximado a la realidad. Por ello, nos planteamos como objetivo adicional:

- 5) Optimización de protocolos de formación de cultivos en 3D para estudios *in vitro*.
- 6) Análisis de marcadores de superficie asociados a CSCs en cultivos 3D.

3. Materiales y Métodos

3.1. – MATERIALES

3.1.1 – Líneas celulares

En este trabajo se han utilizado las líneas celulares HT29, HCT116 y CaCo2. Las células HT29 (ATCC® HTB-38) provienen de un adenocarcinoma colorectal aislado de una paciente de 44 años. Las células CaCo2 (ATCC® HTB-37) provienen de otro adenocarcinoma colorectal, en este caso extraídas de un paciente de 72 años. Las células HCT116 (ATCC® CCL-247) fueron obtenidas a partir de un carcinoma colorectal de un paciente adulto. Las tres líneas celulares son células adherentes con una morfología similar a las células epiteliales, puesto que son células obtenidas de carcinomas.

3.1.2 – Material para el mantenimiento de cultivos celulares

Para el mantenimiento de los cultivos de las líneas celulares utilizadas en este trabajo se ha utilizado el medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) procedente de la casa comercial Gibco Invitrogen® (España). El suero fetal bovino (SFB) también se ha obtenido de dicha casa comercial. Los frascos de cultivo, tubos Falcon de 15 y 50 ml, placas de 96 pocillos de fondo plano y cónico,... y el resto de material estéril fue suministrado por Corning. Las pipetas de 5, 10 y 50 ml también fueron suministradas por Corning. Los tubos criogénicos para la congelación de células se obtuvieron de Nunc (Dinamarca). La L-glutamina, penicilina, estreptomycin, azul Tripán y dimetilsulfóxido (DMSO) y tripsina-EDTA son suministrados por Sigma (España). El paraformaldehído (PFA) fue obtenido de Scharlau. Los sales utilizadas para la preparación de tampones fue proporcionado por Panreac. El buffer de unión a Anexina V o ABB (del inglés “Anexin-binding buffer”) se obtuvo de Immunostep.

3.1.2 – Reactivos utilizados para el análisis de marcadores de células madre tumorales

Para el análisis de la expresión de CD24, CD44 y CD133 se utilizaron anticuerpos específicos frente a dichas proteínas de la casa comercial Miltenyi Biotec (Madrid). Estos anticuerpos se encuentran conjugados con distintos fluoróforos que permiten medir su fluorescencia mediante citometría de flujo (datos en *Tabla 1*). Para el control negativo se emplearon los isotipos IgG1 conjugados con los mismos fluoróforos. La proteína Anexina V-Dy634 y el 7-AAD fueron suministrados por Immunostep. La Anexina V-Dy634 emite a una longitud de onda de 634 nm mientras que el 7-AAD emite a una longitud de onda de 647 nm.

Anticuerpo	Fluoróforo conjugado	Longitud de onda de excitación (nm)	Longitud de onda de pico de emisión (nm)	Clon	Isotipo
Anti-CD24	APC	633	660	32D12	IgG1
Anti-CD44	PE	532-561	578	DB105	IgG1
Anti-CD133	FITC	488	518	AC133	IgG1

Tabla 1. Información técnica sobre los anticuerpos utilizados. Se recogen los datos para cada anticuerpo utilizado de fluoróforo conjugado, longitud de onda de excitación y de emisión, clon del que procede y su isotipo.

Hoechst 33342 fue proporcionado por Sigma y emite a una longitud de onda de 488 nm. El kit ALDEFLUOR™ (kit de detección celular basado en la enzima aldehído deshidrogenasa) fue proporcionado por STEMCELL Technologies. El kit contiene el reactivo ALDEFLUOR, ALDEFLUOR buffer, ALDEFLUOR DEAB, HCl y DMSO. El fluoróforo utilizado en este kit emite a 488 nm.

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 – MANTENIMIENTOS DE CULTIVOS CELULARES

3.2.1.1 – Mantenimiento, incubación y manipulación de las líneas celulares

Las líneas celulares se cultivaron en frascos de cultivo de 25 o 75 cm² según su finalidad. Las tres líneas celulares utilizadas se cultivaron en medio DMEM suplementado con un 10% de SFB, Glutamax 2 mM (glutamina) y antibióticos (penicilina, 100 U/ml; estreptomycin, 100 µg/ml), a partir de ahora denominado medio DMEM completo. Las células eran subcultivadas cada 2 o 3 días dependiendo de la velocidad de crecimiento y el uso de las mismas. Los subcultivos eran llevados a cabo mediante tripsinización de las células adherentes con Tripsina-EDTA y resuspensión en medio DMEM completo a una concentración celular adecuada para su uso. En ausencia de manipulación, los frascos de cultivo se mantuvieron en un incubador termostático a 37°C en aire saturado de humedad y con regulación electrónica de flujo de CO₂ (Panasonic), manteniendo una concentración del 5%. Las manipulaciones de los cultivos celulares se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar vertical (Telstar Bio All), en condiciones de esterilidad. Las disoluciones y búfferes se esterilizaron utilizando filtros con un tamaño de poro de 0,22 µm o en autoclave dependiendo de su estabilidad a alta temperatura.

3.2.1.2 – Contaje y determinación de la viabilidad celular

Para realizar los contajes y calcular la viabilidad celular, se utiliza un hemocitómetro Neubauer y el colorante azul Trypan. Este colorante es capaz de penetrar en las células que han perdido la integridad de su membrana, y por tanto, están muertas; por el contrario, las células vivas con la membrana intacta no internalizan el colorante permitiendo distinguir entre unas y otras y determinar la viabilidad celular del cultivo. Para su realización, se dispone un alícuota de la suspensión celular a analizar junto con la disolución de azul Trypan (50% v/v) y se realiza el contaje utilizando la cámara Neubauer y el microscopio óptico (Nikon).

3.2.1.3 – Congelación y descongelación de células

Para la congelación de células, se toman las células necesarias y se centrifugan 5' a 2.851 xg. Tras la centrifugación, se retira el sobrenadante y se resuspenden las células en medio DMEM suplementado con 10% de DMSO. A continuación, se recoge la suspensión celular y se añade a viales estériles de congelación dispuesto en una caja con hielo. Finalmente se introducen en un congelador a -80°C.

Para la descongelación de células, se recupera cada vial del congelador de -80°C y se calienta poco a poco; conforme se descongela el medio, se añade poco a poco la solución líquida a un tubo Falcon con medio DMEM completo. Tras la descongelación, se centrifuga el tubo a 233 xg durante 5'; se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet celular resultante en medio DMEM completo para establecer de nuevo el cultivo.

3.2.2 – ANÁLISIS DE MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS CSCs

El análisis de marcadores de superficie se realiza utilizando anticuerpos específicos dirigidos frente a proteínas descritas en la bibliografía como proteínas indicadoras de CSCs. Se utiliza los anticuerpos dirigidos frente a las proteínas CD24, CD44 y CD133. Para realizar el marcaje extracelular en cada línea celular se procede de la siguiente manera. Se toman 150.000 células y se disponen en una placa de 96 pocillos. Se centrifuga la placa a 2.851 xg durante 2' y se retira el sobrenadante. El marcaje se realiza en un volumen total de 50 µl, en los cuales se encuentran las diluciones optimizadas de anticuerpos utilizados en el ensayo. Se utiliza como tampón de marcaje PBS suplementado con 5% de SFB. Para cada línea celular, se marca un pocillo con anticuerpos anti-CD24, anti-CD44 y anti-CD133 y se utiliza como control negativo un pocillo marcado con los isotipos IgG1-APC, IgG1-PE e IgG1-FITC utilizando la misma concentración que el anticuerpo anti-CD correspondiente. Se añade 7-AAD como marcador de células muertas a una concentración final de 1/100 (V/V) en cada pocillo. El 7-AAD es capaz de introducirse en aquellas células con la membrana muy dañada de tal manera que nos permite seleccionar para el análisis a las células vivas (células 7-AAD⁻, con la membrana intacta). Se deja incubar el marcaje 20' a 4°C en el frigorífico. Tras la incubación, se centrifuga la placa a 2.851 xg durante 2' para eliminar el exceso de anticuerpo; se retira el sobrenadante y se resuspende en 100 µl de PBS para lavar las células. Se vuelve a centrifugar a 2.851 xg durante 2', se retira el sobrenadante, se resuspende en 100 µl de PBS 5% SFB y se traslada a un tubo de citometría en el cual se añaden otros 200 µl de PBS 5% SFB. Se analiza la muestra mediante un citómetro de flujo FACScan (BD BioSciences). El citómetro es capaz de analizar de manera individual cada célula de una muestra dada. Por defecto, analiza el tamaño y la complejidad celular de cada célula pero además se puede incorporar mediciones de fluorescencia para poder analizar distintos fluoróforos. En nuestro caso, se analiza el tamaño, la complejidad celular y 4 mediciones de fluorescencia (para FITC, PE, 7-AAD y APC).

3.2.3 – ANÁLISIS DE LA CORRELACION ENTRE LOS MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES CON LA EXPULSIÓN DEL COLORANTE HOECHST 33342

Para analizar la correlación entre el análisis de marcadores de superficie anterior y la presencia de bombas de eflujo en la membrana plasmática se utilizó el colorante Hoechst 33342. Se disponen 300.000 células de cada línea celular en una placa de 96 pocillos en medio completo DMEM en un volumen de 50 µl y se añade 50 µl de una dilución de Hoechst 33342 en medio DMEM completo, obteniendo una concentración final de Hoechst 33342 de 5 µg/ml en un volumen de 100 µl. Se deja incubar la muestra durante 45' a 37°C en la estufa. Tras la incubación, se centrifuga la placa de 96 pocillos a 2.851 xg durante 2', se retira el sobrenadante y se resuspende en 100 µl de ABB 1x suplementado con 5% de SFB. Sobre dicho volumen se añaden los anticuerpos necesarios: se marca un pocillo de cada línea con anticuerpos anti-CD24 y anti-CD44 y se utiliza como control negativo un pocillo marcado con los isotipos IgG1-APC e IgG1-PE. En cada pocillo se añade 7-AAD al igual que en el ensayo anterior y se incluye otro marcador vital, Anexina V, a una concentración de 2/100 (V/V). La Anexina V es capaz de unirse a residuos de fosfatidilserina expuestos en la membrana externa (evento temprano de la apoptosis) permitiendo junto con el marcaje de 7-AAD seleccionar para el análisis sólo las células vivas y no apoptóticas, es decir, células 7-AAD⁻, Anexina V⁻. Se deja incubar el marcaje durante 20' a 4°C en la nevera. Tras la incubación, se analizan las muestras por citometría de flujo (Beckman Coulter GALLIOS). En este caso, además de los canales de fluorescencia que se analizaban en el apartado anterior, se utiliza un canal extra para analizar a Hoechst 33342.

3.2.4 – OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO DE EXPULSIÓN DE HOECHST 33342

Para optimizar el ensayo de expulsión de Hoechst 33342 se varían las condiciones de concentración de Hoechst 33342 (10, 5, 2.5 o 1 $\mu\text{g/ml}$) y tiempo de incubación con el colorante (1, 15, 45 o 90 min). Para ello, se disponen 100.000 células de cada línea celular en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en un volumen de 50 μl y se añade 50 μl de medio con la concentración de Hoechst 33342 correspondiente. La mezcla se deja incubar durante el tiempo correspondiente en la estufa a 37°C. Tras la incubación, se centrifuga a 2.851 $\times g$ 2', se decanta el medio y se resuspende en 100 μl de ABB 1x con 5% de SFB. Se añade Anexina V-APC y 7-AAD a las concentraciones estándar de marcaje y se deja incubar 30' a temperatura ambiente. Tras la incubación, se analiza por el citómetro de flujo.

Tras observar los resultados de la optimización de la concentración de Hoechst 33342 y el tiempo de incubación (apartado *Resultados y discusión*, 4.3), decidimos optimizar también el tiempo de expulsión del colorante. El tiempo de expulsión es el tiempo en el que las células, tras ser incubadas con el colorante, se encuentran en un medio sin colorante y a una temperatura adecuada para que las bombas de eflujo de su membrana plasmática puedan actuar. Elegimos como tiempos de expulsión del colorante a analizar 60', 120' y 300' y procedemos de la misma manera descrita anteriormente.

3.2.5 – ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES Y/O LA EXPULSIÓN DEL COLORANTE HOECHST 33342 CON LA EXPRESIÓN DE ALDH

Para analizar la correlación entre los marcadores de superficie CD24 y CD44 y/o el colorante Hoechst 33342 con una de las características descritas de CSCs se empleó el kit ALDEFLUOR®. Este kit analiza la expresión de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) basándose en un sustrato de dicha enzima que al ser metabolizado emite fluorescencia a 488 nm.

El análisis se realizará por citometría de flujo por lo que es necesario tener en cuenta el número de fluoróforos a utilizar y el número de canales que puede analizar el citómetro. Puesto que son demasiadas emisiones para analizar todos los fluoróforos y/o colorantes en una misma muestra, se decidió proceder en paralelo. En un tubo se realizará el protocolo del kit ALDEFLUOR® junto con el marcaje del colorante Hoechst 33342 mientras que en otro tubo, llevado en las mismas condiciones, se realizará el protocolo del kit ALDEFLUOR® junto con el marcaje de CD24 y CD44.

Para realizar el ensayo se procedió de la siguiente manera. Se dispusieron en dos tubos eppendorf 600.000 células en cada uno resuspendidas en medio DMEM completo, con un volumen final de 1 ml y otro tubo eppendorf con 300.000 células resuspendidas en 500 μl de medio completo, que se utilizará como control negativo. Sobre uno de los tubos se añade una dilución de Hoechst 33342 obteniendo una concentración final en el tubo eppendorf de 5 $\mu\text{g/ml}$ y se dejan incubar ambos tubos a 37°C durante 45'. Tras la incubación, se centrifugan a 524 $\times g$ durante 5'. Se retira el sobrenadante y se resuspenden en 1 ml de ALDEFLUOR buffer. A continuación se preparan los tubos control del ensayo ALDH (uno para cada tubo eppendorf) añadiendo 5 μl del reactivo ALDEFLUOR DEAB. Este reactivo es un inhibidor de la enzima ALDH de tal manera que aporta un control negativo interno para cada ensayo. En el tubo con la suspensión celular, se añade 5 μl del reactivo ALDEFLUOR, se resuspende bien y se transfieren 500 μl al tubo control. Se procede igual con el segundo tubo y una vez preparado cada tubo con su control, se incuban en la estufa a 37°C durante 45'. Tras la incubación del ensayo ALDEFLUOR, se procede al marcaje con anticuerpos anti-CD24 y anti-CD44, Anexina V y 7-AAD de la misma manera que en los apartados anteriores en placa de 96 pocillos con

un volumen final de 100 μ l (apartados 3.2.2 y 3.2.3). Como tampón de marcaje se utiliza ABB 1x suplementado con 5% de SFB. Tras añadir el marcaje, se incuba la placa durante 20' a 4°C. Tras la incubación, se centrifuga la placa de 96 pocillos a 2.851 xg durante 2', se retira el sobrenadante y se lava con tampón de marcaje. Se centrifuga de nuevo a 2.851 xg durante 2', se retira el sobrenadante y se resuspende en 100 μ l de tampón de marcaje. Se transfiere el volumen a tubos de citometría y se analizan con el citómetro de flujo.

3.2.6 – ENRIQUECIMIENTO DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS MADRE UTILIZANDO PACLITAXEL (PTX)

Para enriquecer la población celular descrita como población CSCs se utilizó el fármaco PTX y se realizaron los ensayos descritos en el apartado anterior 3.2.5 pero en vez de proceder en paralelo, se decidió marcar únicamente con CD44, analizar la actividad ALDH y la retención de Hoechst 33342. Antes de proceder a los ensayos para identificar el enriquecimiento en CSCs, se procedió a acotar el rango de concentración de fármaco a añadir al cultivo. Se ha descrito que una de las características de las células madre es la mayor resistencia a fármaco, pero esto sucede hasta un determinado límite; debemos encontrar el límite en el cual las células tumorales diferenciadas se vean afectadas por el fármaco pero sin llegar a concentraciones que afecten a la población de CSCs. Para ello, realizamos ensayos MTT en los cuales se analiza colorimétricamente la proliferación celular ante un determinado agente buscando una concentración que permita la eliminación del 60-70% de la población total de células.

Ensayo MTT

En una placa de 96 pocillos de fondo plano se disponen 5.000 células de cada línea celular y se dejan 24 h para que se adhieran a la placa y proliferen hasta 10.000 células. A continuación, se añade PTX (Sigma) a concentraciones de 40, 20, 10, 5 y 2.5 μ M y usaremos un pocillo control en el cual no se añadirá fármaco. Se deja incubar durante 48 h para que el fármaco actúe. Tras la incubación, se añaden 10 μ l de MTT (bromuro de dimetiltiazolil difeniltetrazolium, Sigma) y se deja incubar durante 1 h. El MTT es una molécula capaz de entrar en las células y ser metabolizada a azul de formazán; este compuesto tiene color y es insoluble, precipitando en las células viables que son capaces de metabolizarlo. Una vez formados los cristales de formazán, se centrifuga 2.851 xg durante 1 h, se retira el sobrenadante y se disuelven los cristales con 100 μ l de DMSO. Una vez disueltos, se mide la placa a 540 nm. Tras ver los resultados discutidos en el apartado *Resultados y Discusión 4.5*, decidimos repetir el ensayo utilizando concentraciones menores de fármaco. Se procede de la misma manera pero en este caso las concentraciones de fármaco son 5, 2.5, 1.2, 0.6 y 0.3 μ M.

Ensayo ALDH, Hoechst 33342 y marcaje con CD44

Una vez analizados los resultados de ambos ensayos MTT, procedemos a analizar si este fármaco es capaz de enriquecer la población CSCs, siguiendo los métodos descritos en el apartado anterior 3.2.5 con la modificación descrita, sin proceder en paralelo. La concentración elegida tras ver los resultados de MTT es 1 μ M; a pesar de ver unos resultados un poco dispares, la población celular se reducía pero no desaparecía por completo. En una placa de 12 pocillos, se disponen 100.000 células de cada línea celular en 500 μ l de medio DMEM completo. Tras dejar incubar 24 h para que las células se adhieran a la placa, se añade el fármaco PTX a una concentración final de 1 μ M y se deja incubar durante 48 h. Tras la incubación, se recoge el sobrenadante y se añade a un tubo eppendorf; se tripsinizan las células que han quedado adheridas a los pocillos con 250 μ l de tripsina y se recogen en el mismo tubo eppendorf. A partir de aquí se procede a analizar la expresión de CD44, la actividad

ALDH y la retención de Hoechst 33342 como se ha descrito anteriormente. Como control, se utiliza un pocillo en el que no se ha añadido fármaco.

3.2.7 – ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE LA HIPOXIA EN LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE SUPERFICIE CD24, CD44 Y CD133

Para analizar si las condiciones de hipoxia afectan a la presencia de marcadores de superficie en las líneas celulares, incubamos las células en concentraciones de oxígeno de 1% y 2%, condiciones similares a las que se producen en estadios avanzados de los tumores sólidos y se analizan los marcadores de superficie. Para ello, se ponen dos botes de cultivo de cada línea celular en incubadores con una concentración de oxígeno de 1% y 2% mientras que otro bote se deja en normoxia (21% aproximadamente) para ser utilizado como control; las células son incubadas en dichas condiciones durante 48 h en un estado de confluencia celular medio para permitir su crecimiento. Tras la incubación, se procede de la misma manera como se ha descrito en los apartados anteriores 3.2.2 y 3.2.3.

3.2.8 – FORMACIÓN DE CULTIVOS EN 3D IN VITRO POR EL MÉTODO DE LA GOTA COLGANTE

Para desarrollar y poner a punto la formación de cultivos en 3D in vitro se utilizó el método de la gota colgante. Este método se basa en el reactivo Methocel (metilcelulosa, proporcionado por Sigma); las células se disponen en una gota de medio completo y metilcelulosa que se deja colgando de la tapa de una placa de Petri. Debido a la alta tensión superficial del reactivo, la gota no se desprende de la tapa y permite que las células rueden por gravedad hasta el final de la gota poniéndose en contacto unas con otras. Al cabo de 24 ó 48 horas, las células se unen fuertemente entre sí generando un cultivo en 3D con forma de esfera (esferoide) que intenta imitar un tumor sólido real. El método ha sido optimizado para la formación de esferoides empleando 1.000 células por esferoide. Para ello, se dispone de un tubo Falcon con una mezcla de Methocel y medio DMEM completo y sobre él se añade un volumen de células tal que se forme una mezcla con las siguientes proporciones: 10% de células en medio DMEM completo, 20% de Methocel y 70% de medio completo DMEM. De dicha mezcla, se aplican gotas de 25 µl sobre la tapa de una placa Petri. Una vez aplicadas, se voltea la tapa y se deja incubando en la estufa a 37°C con el fondo de la placa Petri lleno de agua para evitar la excesiva evaporación. Cada 24 h se tomaron fotos de los esferoides formados para ver la evolución en el tiempo.

3.2.9 – DISGREGACIÓN DE ESFEROIDES PARA ANÁLISIS DE MARCADORES DE CÉLULAS MADRE POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para el análisis por citometría de flujo de los esferoides es necesaria su disgregación en células individuales. Para ello, se optimizó su disgregación utilizando Tripsina-EDTA. Los esferoides son recogidos de la placa Petri y dispuestos en una placa de 96 pocillos; a continuación, se añaden 100 µl de Tripsina-EDTA y se incuban entre 5' y 10' en la estufa a 37°C. Tras la incubación, las adhesiones moleculares entre células se rompen y una rápida resuspensión mecánica permite la disgregación del esferoide. Una vez disgregado, se procede al análisis de marcadores extracelulares o vitales como Anexina V y 7-AAD siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.2.2.

4. Resultados y Discusión

4.1 – EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE SUPERFICIE DE CSCs EN LAS LÍNEAS CELULARES

La *Figura 6* muestra los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de los marcadores de superficie CD24, CD44 y CD133 por citometría de flujo en las líneas celulares HT29, HCT116 y CaCo2. Cada línea celular era analizada siguiendo el esquema mostrado en el *Anexo 1, Figura A1.1*.

De los marcadores analizados, la bibliografía establecía que cada línea celular expresaba unos CDs mientras que otros no (resumen en *Tabla 2*) (Cherciu I 2014). Estos CDs estaban expresados en cada línea celular de manera constitutiva pero diversos estudios habían establecido que aparecía una población celular dentro de dicha línea que

sobreexpresaba estos marcadores y estaban correlacionados con sus características de células madre (Choi D 2009),(Peter Chu 2009). Nuestra hipótesis era encontrar una población en mayor o menor proporción que sobreexpresara aquellos marcadores de células madre o que se expresasen algunos para los cuales fueran

negativas las células tumorales normales de esa línea en concreto. Sin embargo, como se puede ver en la *Figura 1*, cada línea celular expresa aquellos marcadores que predecía la literatura de modo homogéneo sin aparecer ninguna población diferenciada con un mayor marcaje.

Analizando los datos con mayor profundidad, lo que está claro es que hay un amplio rango de expresión para los distintos marcajes, cubriendo más de un orden de magnitud de expresión a pesar de que no se pueden distinguir varias poblaciones bien definidas. A pesar de existir controversia entre unos marcadores y otros, en la bibliografía sí que parece que los 3 analizados se imponen como las mejores opciones en cuanto a marcadores de superficie asociados a CSCs (Choi D 2009),(Peter Chu 2009),(Cherciu I 2014); por lo que, el que no seamos capaces de distinguir dos poblaciones claramente diferenciadas para su expresión no significa que no sean útiles y es posible que una alta expresión de estos marcadores sea el marcador diferencial para identificarlas. También conviene reflexionar sobre el hecho de que las líneas celulares son generadas a partir de un único clon extraído del tumor de un paciente. Es posible que la selección de ese clon en cada una de las líneas celulares influya en las características CSCs.

Hay que destacar que dentro de las 3 líneas celulares aparecen dos poblaciones de distinto tamaño (como se puede apreciar en la *Figura A1.1* del *Anexo 1*). Estableciendo distintas regiones de análisis, se pueden analizar por separado estas dos poblaciones celulares y, como se muestra en dicha figura, aquellas células con mayor tamaño expresan más CDs con respecto a las de menor tamaño pero siempre aquellos CDs que se habían establecido en la bibliografía. Este hecho no se había reportado hasta ahora pero quizás este hecho se deba simplemente a que un mayor tamaño de célula permita una mayor cantidad de exposición de CDs en la membrana por mero espacio físico.

Por todo ello, decidimos estudiar algunos marcadores funcionales de las CSCs con el fin de aclarar estos datos.

Línea celular	CD24	CD44	CD133
HT29	+	+	+
HCT116	-/+	+	+
CaCo2	-	-	+

Tabla 2. Tabla resumen construida en base a los datos recogidos de la bibliografía en los que se muestra la expresión o no expresión de los distintos marcadores de superficie para las líneas celulares HT29, HCT116 y CaCo2 (Choi D 2009),(Peter Chu 2009)(Cherciu I 2014).

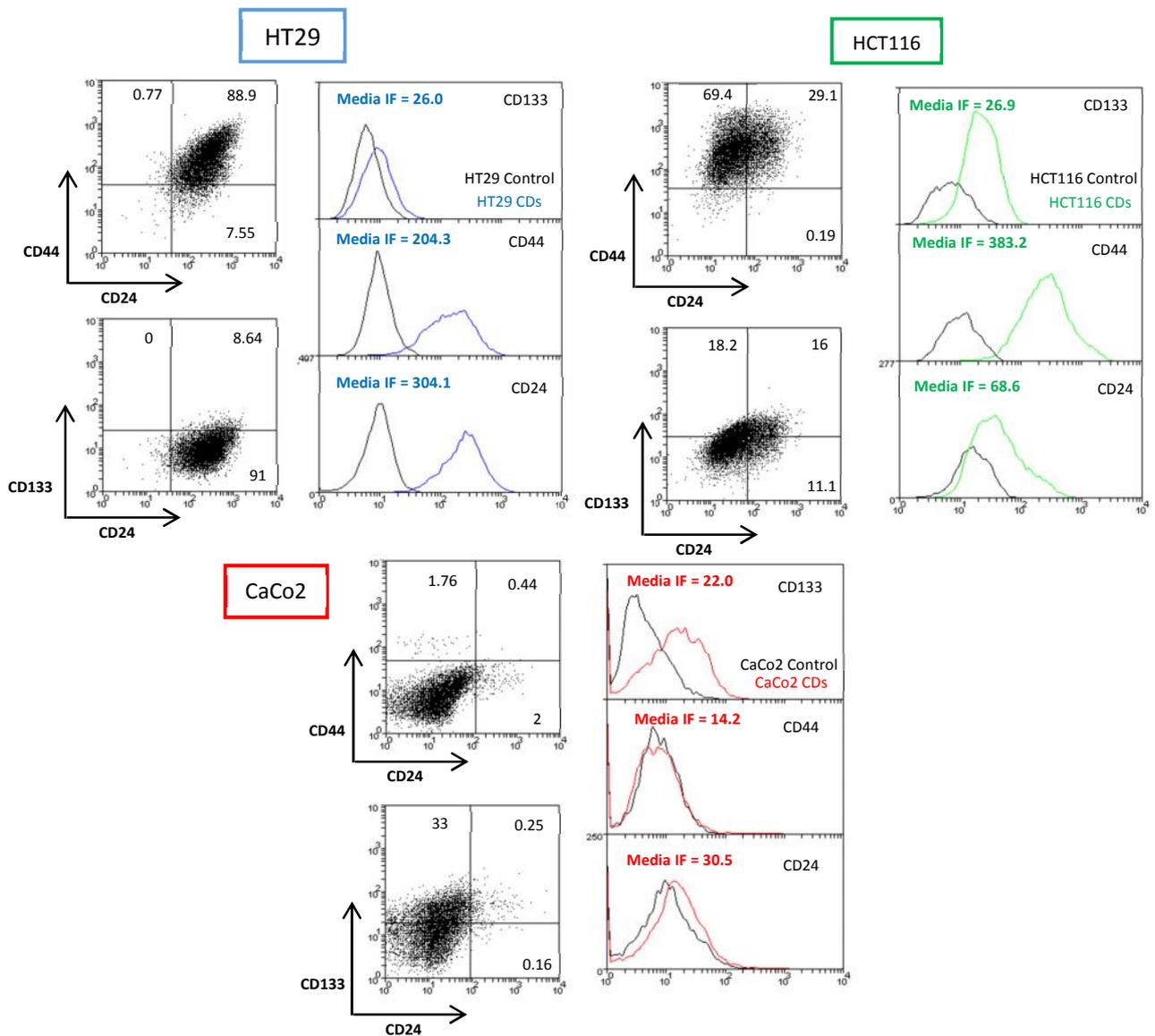


Figura 6. Resultados del análisis de expresión de CD24, CD44 y CD133 en las líneas celulares HT29, HCT116 y CaCo2. Se empleó anticuerpos anti-CD24, anti-CD44 y anti-CD133 como se indica en el apartado *Métodos* 3.2.2, y se utilizó como control negativo marcajes con anticuerpos anti-isotipo, anticuerpo frente a las cadenas pesadas de los anticuerpos utilizados. Este análisis se realizó sólo sobre la población de células vivas seleccionada utilizando el marcador 7-AAD. Las células muertas pierden la expresión de CDs por lo que desvirtuarían el análisis. Esquema de análisis mostrado en *Anexo 1, Figura A1.1*. Los resultados son presentados en diagrama de puntos e histogramas, de un ensayo representativo de 3 realizados. En el diagrama de puntos se indica el porcentaje de células de cada cuadrante mientras que en el histograma se busca observar desplazamiento del pico de fluorescencia y se indica la intensidad de fluorescencia media observada en la muestra marcada con CDs (Media = IF).

4.2 – ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE MARCADORES DE SUPERFICIE Y EXPULSIÓN DE HOECHST 33342

Una de las propiedades que comparten las CSCs, comentada en el apartado *Antecedentes y Objetivos*, es la alta expresión de bombas de eflujo en su membrana que les confiere resistencia a los fármacos antitumorales. Para estudiar esta expresión en las líneas celulares y si se correlaciona con la expresión de algún CD, se utilizó el ensayo de expulsión de Hoechst 33342 tal y como se describe en el apartado *Métodos*, 3.2.3. Puesto que no se podían utilizar todos los marcadores por falta de fluoróforos, se eligió CD24 y CD44 para las líneas celulares HT29 y HCT116 y CD133 para la línea CaCo2 puesto que son los marcadores positivos para esas líneas.

Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 7* y se complementan con la información del *Anexo 2, Figura A2.2*.

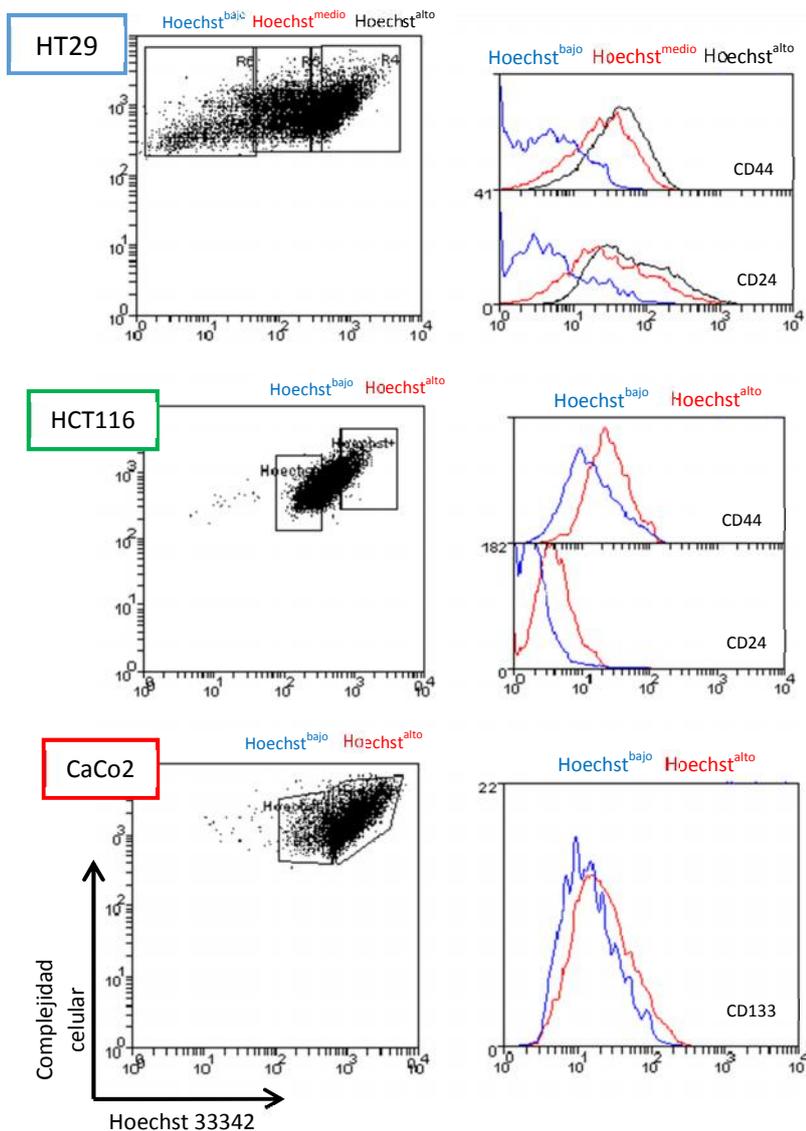


Figura 7. Análisis de la correlación de la expulsión de Hoechst 33342 con la expresión de CD24 y CD44 en las líneas celulares HT29 y HCT116 y CD133 en la línea celular CaCo2. El análisis se realizó siguiendo los procedimientos especificados en el apartado *Métodos 3.2.2* y *3.2.3*. Se seleccionaron las células vivas utilizando los marcadores 7-AAD y Anexina V (secuencia de análisis mostrada en *Anexo 2, Figura A2.1*). Se utilizó una concentración de Hoechst 33342 de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y los anticuerpos anti-CD24 y anti-CD44; el control negativo del marcaje de CDs fue el mismo que el utilizado anteriormente pero no se utilizó un control negativo para el ensayo de Hoechst 33342. Se muestran los resultados de la retención de Hoechst 33342 en forma de diagrama de puntos en donde se seleccionan las distintas poblaciones encontradas para su posterior análisis de expresión de CDs en forma de histograma. Se muestra un ensayo representativo de 3 realizados.

Como se puede ver en los histogramas de cada línea celular de la *Figura 7*, no aparece una correlación negativa entre la retención de Hoechst 33342 y la expresión de CDs; es más, la correlación aparece como positiva, expresando más CDs aquellas células que más Hoechst 33342 retienen. En la línea celular HT29 aparece una tercera población que retiene mucho menos Hoechst 33342; sin embargo, su expresión de CDs es realmente baja con respecto al resto de experimentos lo que nos hace pensar que es posible que estas células no sean en realidad células vivas a pesar de haber sido 7-AAD⁻ Anexina V⁻ y sean células apoptóticas que no hayan trasladado fosfatidilserina y expresen menos cantidad de CDs o células muertas que hayan perdido sus CDs o expresen CDs aberrantes. El análisis a la inversa (mostrado en el *Anexo 2, Figura A2.2*) no aporta ningún resultado significativo. Aquellas células que mayor expresión de CDs tienen, expresan mayor retención de Hoechst 33342.

En cualquier caso, en ninguno de los ensayos con estas 3 líneas celulares se ha conseguido diferenciar con claridad una población lateral o *side population* como se describía en la literatura para la identificación de células madre (Patrawala L 2005, Yasunaga 2014). Por una parte, es posible

que los marcadores de superficie utilizados no hayan sido bien escogidos para estas líneas. El ensayo Hoechst 33342 ha sido descrito a lo largo de mucho tiempo como identificador de células madre en general aunque también es cierto que aparecen muchos más artículos en relación a la utilización de este ensayo para aislar células madre normales que para CSCs. En concreto, para las líneas celulares utilizadas solo se ha comprobado en la línea celular HT29 (Yasunaga 2014). Por lo tanto, también es posible que el ensayo Hoechst 33342 no sea un buen marcador de CSCs para las líneas celulares utilizadas y sí los CDs.

Para discernir cuál de las dos posibilidades era la correcta, decidimos optimizar el protocolo de expulsión de Hoechst 33342 para distinguir mejor la población lateral e incluir otro análisis funcional muy utilizado para la identificación de CSCs, la sobreexpresión de ALDH.

4.3 – OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO DE EXPULSIÓN DEL COLORANTE HOECHST 33342

Siguiendo los procedimientos indicados en el apartado *Métodos 3.2.4* optimizamos los tiempos de incubación y la concentración del ensayo de expulsión de Hoechst 33342. Los resultados son mostrados en el *Anexo 3, Figura A3.1*, y resumidos en el diagrama de barras de la *Figura 8*. Para optimizar este ensayo debemos buscar una concentración de Hoechst 33342 y/o tiempo de incubación que sature las bombas de eflujo de la célula, de tal manera que se una al DNA todo el colorante posible y se permita su acumulación en el citosol de las células. Al retirar el medio con Hoechst 33342 tras la incubación y sustituirlo por un medio sin él, las bombas de eflujo deberían actuar y expulsar el colorante que se encuentre en el citosol puesto que sobre el colorante del núcleo no van a poder actuar. Aquellas células que expresen una mayor cantidad de bombas de eflujo serán capaces de expulsar más Hoechst 33342 y por lo tanto, aparecería en el diagrama de puntos una población que emita menos fluorescencia y se distinga del resto. Como se puede ver en ambas figuras, la retención del colorante es dependiente de la concentración y el tiempo (a mayor concentración, mayor retención y a mayor tiempo, mayor retención) pero hasta un determinado punto. A tiempos superiores a 15' y concentraciones superiores a 5 µg/ml la retención de Hoechst 33342 es independiente del tiempo y la concentración. Sin embargo, en ninguno de los casos conseguimos apreciar una población lateral que se distinga del resto. Por ello, procedimos a optimizar de la misma manera el tiempo de expulsión obteniendo una independencia del tiempo de expulsión a partir de 60' (datos mostrados en *Anexo 3, Figura A3.3*) pero la población lateral no apareció en ninguno de los ensayos.

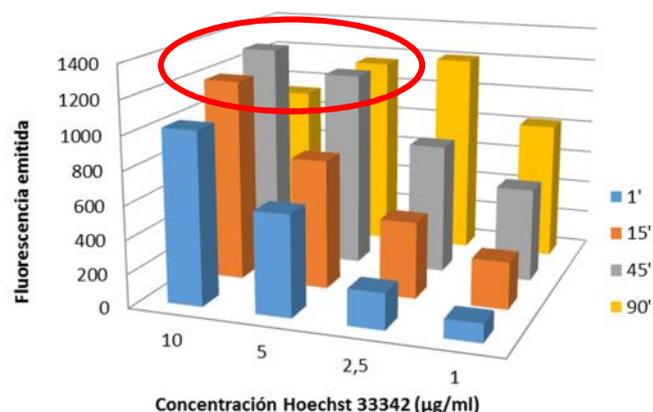


Figura 8. Análisis mediante diagrama de barras del ensayo de optimización para la expulsión de Hoechst 33342 en la línea HT29. La incubación se realizó a concentraciones de 10, 5, 2.5 y 1 µg/ml de Hoechst 33342 y tiempos de incubación de 1, 15, 45 y 90' como se indica en el apartado *Métodos, 3.2.4*. Se midió la emisión de Hoechst 33342 por citometría de flujo (datos mostrados en las figuras del *Anexo 3*) y los datos son resumidos en este gráfico de barras. En rojo se ha señalado los valores de concentración de Hoechst 33342 y de tiempo de incubación a los cuales la retención de Hoechst se vuelve independiente de dichos parámetros.

4.4 – ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES CD24 Y CD44 Y/O LA EXPULSIÓN DE HOECHST 33342 CON LA SOBREENPRESIÓN DE ALDH

A pesar de no conseguir identificar la población lateral en la optimización del protocolo de expulsión de Hoechst 33342, decidimos comprobar qué marcador era el mejor candidato para ser utilizado como identificador de CSCs, los CDs o el ensayo Hoechst 33342 en la línea celular HT29. Para ello, empleamos un ensayo extensamente descrito en la bibliografía tanto para el análisis de células madre normales como tumorales: el ensayo de actividad ALDH (Huang E and BM. 2009).

Procedemos tal y cómo se describe en el apartado de *Métodos*, 3.2.5. Los resultados obtenidos para la línea celular HT29 se muestran en la *Figura 9*. El diagrama de puntos denominado ALDH con Inhibidor representa los datos obtenidos de la muestra control del ensayo, aquella muestra en la que se añade el inhibidor DEAB específico de la enzima ALDH. Esta muestra representa un control negativo para el diagrama de puntos denominado ALDH sin Inhibidor, en la cual no se ha añadido dicho inhibidor y se puede ver la expresión de ALDH en comparación. A su vez, ambas muestras son tratadas siguiendo el protocolo de expulsión de Hoechst 33342 y marcaje con CDs. Los resultados se muestran en la parte izquierda de la *Figura 9*.

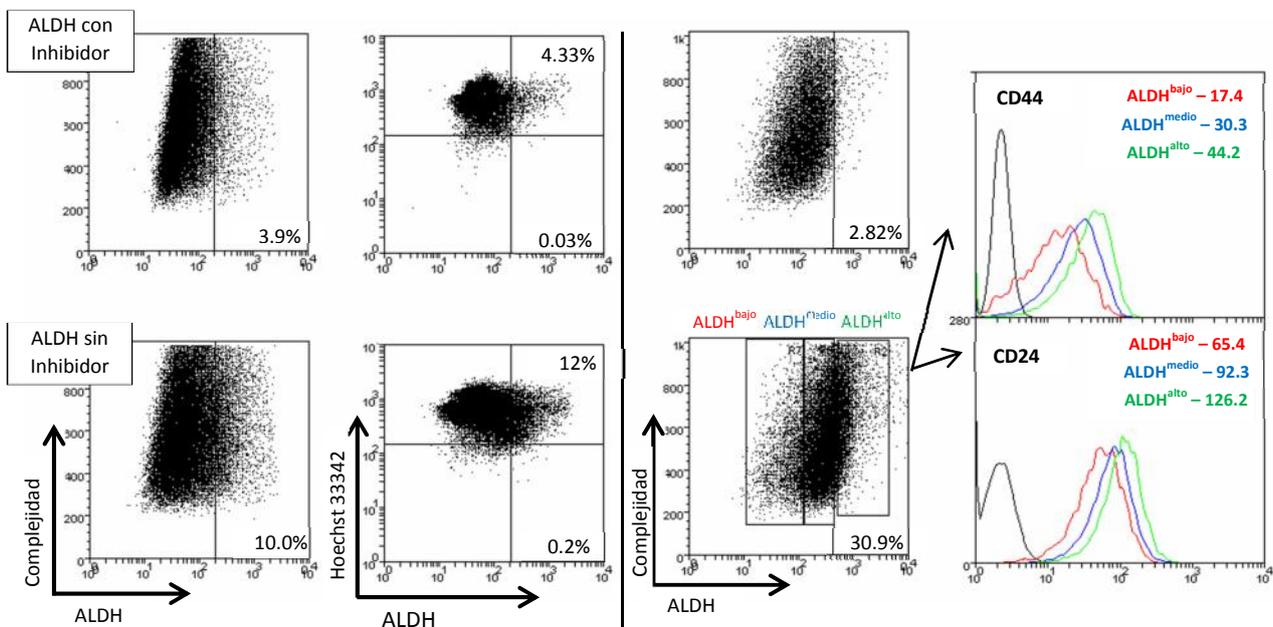


Figura 9. Análisis de la correlación entre la actividad de ALDH y la expulsión de Hoechst 33342 y/o la expresión de marcadores de superficie CD24 y CD44 en la línea celular HT29. El ensayo se realizó en paralelo tal y cómo se describe en el apartado *Métodos* 3.2.5: en una muestra se analizó la actividad de ALDH y la expulsión de Hoechst 33342 (parte izquierda de la figura) mientras que en otra se analizó la actividad de ALDH y la expresión de CDs para las distintas actividades de ALDH (parte derecha). Los ensayos de la actividad de ALDH se basan en un sustrato del enzima que al ser metabolizado por la misma emite fluorescencia; incorporan un control negativo interno, que es mostrado en los diagramas superiores, en los que se emplea el inhibidor DEAB específico para ALDH. Los datos de actividad de ALDH y de expulsión de Hoechst 33342 son representados en diagrama de puntos, en los que se indican los porcentajes de cada cuadrante, mientras que la expresión de CDs es representada en histogramas en los que se indica el valor medio de fluorescencia de cada población.

Como se puede apreciar en los porcentajes mostrados en los diagramas de puntos, la población ALDH⁺ se enriquece notablemente en la muestra ALDH Sin Inhibidor en ambos ensayos llevados en paralelo. Sin embargo no aparece una población ALDH⁺Hoechst⁻ como se puede apreciar en los porcentajes del diagrama de puntos Hoechst 33342 frente a ALDH. El porcentaje aumenta pero no son valores representativos y nuevamente no aparece una población lateral clara que correlacione

con una alta actividad de ALDH. En cambio, la expresión de CDs sí que está correlacionada con la actividad de ALDH, mostrando aquellas células con una mayor actividad ALDH, mayor expresión de ambos CDs. Realizando el análisis a la inversa (mostrado en el *Anexo 4, Figura A4*), se puede comprobar cómo una mayor expresión de ambos CDs está correlacionada directamente con una mayor expresión de ALDH. Hay que destacar que en este ensayo, no aparece ninguna población $CD44^- CD24^-$, lo que corrobora la hipótesis de que en el experimento anterior, la población que aparecía Hoechst⁻ y $CD24^- CD44^-$ no debía corresponder a una población de células vivas. También se muestra que la población $CD24^{bajo} CD44^{alto}$ tiene una mayor expresión de ALDH que la población $CD24^{alto} CD44^{bajo}$, lo que indica que CD44 correlaciona mejor con la expresión de ALDH y por lo tanto, puede ser mejor marcador de CSCs que CD24 como ya se había descrito en (Jaggupilli A 2012).

A partir de estos resultados podemos concluir que el ensayo de Hoechst 33342 no correlaciona con la expresión de ALDH pero el marcaje superficial de CD24 y CD44 sí y por tanto, se impone como **método de identificación de las CSCs el ensayo conjunto de CD24, CD44 y ALDH**, y más concretamente CD44-ALDH como ya se había descrito por separado (Huang E 2008, Jaggupilli A 2012, Cherciu I 2014).

4.5 – ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DEL FÁRMACO PTX EN LA POBLACIÓN IDENTIFICADA COMO CSCs

Siguiendo los procedimientos indicados en el apartado *Materiales y Métodos, 3.2.6*, analizamos la influencia del fármaco Paclitaxel (PTX) en la población que identificamos como población CSCs ($ALDH^+ CD44^+ CD24^+$). Debido a la dificultad experimental, decidimos analizar sólo la influencia sobre la población $ALDH^+ CD44^+$ aunque se incluyó también el análisis de expulsión de Hoechst 33342. Para elegir la concentración adecuada de PTX a utilizar, realizamos ensayos de MTT, mostrados en el *Anexo 5, Figura A5.1*. Debemos encontrar una concentración de fármaco que actúa frente a las células tumorales diferenciadas pero no sobre las CSCs, enriqueciendo por tanto la población CSCs; elegiremos aquella concentración que deje un porcentaje de supervivencia en torno al 25-30%. Tras los ensayos MTT, se eligió la concentración adecuada y se realizaron los ensayos para el marcaje de las CSCs según se indica en *Materiales y Métodos, 3.2.6*. Los resultados se muestran la *Figura 10*.

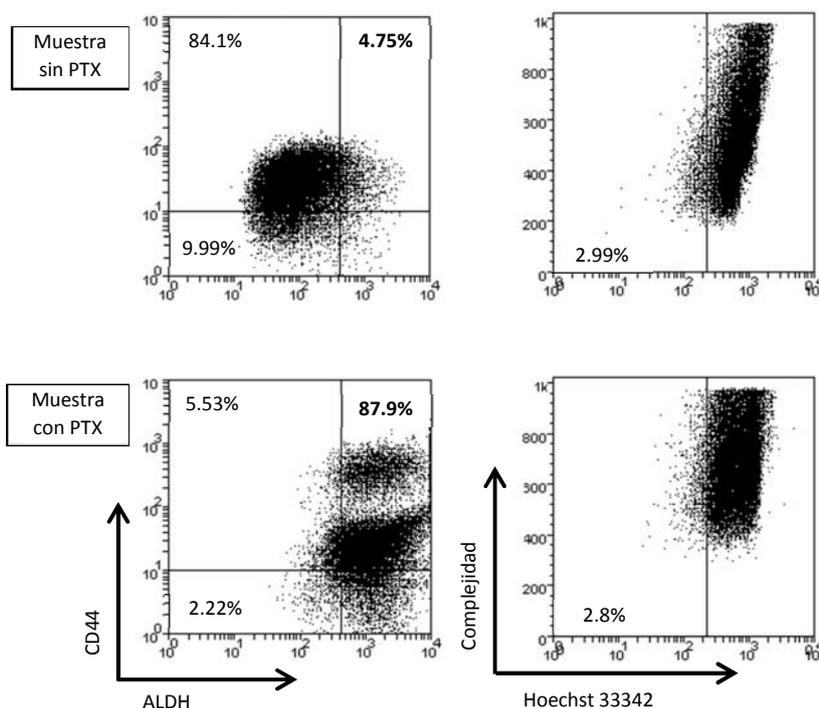


Figura 10. Análisis de la influencia del fármaco PTX en la presencia de CSCs en la línea celular HT29.

Las células fueron tratadas con PTX durante 48 h y analizadas mediante el protocolo de identificación de CSCs establecido en el apartado anterior, es decir, marcaje extracelular con CD44 y análisis funcional de actividad de ALDH. Se incluyó también el ensayo de Hoechst 33342 a pesar de los resultados anteriores en un intento de identificar la población lateral que no se había conseguido encontrar hasta ahora. Se utilizó como control negativo células sin tratar con PTX. Los resultados son mostrados en diagramas de puntos donde se indican los porcentajes de cada cuadrante.

Como se puede apreciar en la *Figura 10*, tanto la muestra tratada con PTX como la muestra sin tratar presentan una población mayoritaria de células CD44⁺. Sin embargo, esta vez en la muestra tratada aparece una población nueva que no aparece en la muestra sin tratar altamente CD44⁺ que no había sido reportada hasta ahora. Con respecto a la expresión de ALDH, en la muestra sin tratar aparece un pequeño porcentaje de células ALDH⁺, que sigue siendo mayor que el que aparece en el control interno del ensayo ALDH de esta muestra. Sin embargo, en la muestra tratada con PTX la población en general expresa altas cantidades de ALDH tornándose casi toda la muestra como ALDH⁺ como se puede ver en el aumento del porcentaje en el diagrama de puntos. Sorprendentemente, la nueva población que aparece para el marcaje con CD44 presenta también una alta actividad ALDH. En los diagramas de puntos de la derecha podemos ver el ensayo Hoechst 33342 probado en las mismas muestras en el que las diferencias son mínimas y en ningún caso aparece la población lateral buscada.

De esta manera, se impone el **marcaje CD44-ALDH como un posible marcaje de CSCs**, con el cual en la línea celular HT29 se ha llegado a distinguir una nueva población CD44^{+alto}ALDH⁺ que aparece en presencia del fármaco PTX. Este método de enriquecimiento de CSCs utilizando fármacos ya se había descrito con anterioridad como en (Patrawala L 2005) pero no para los ensayos de CD44 y ALDH.

Con respecto a las otras dos líneas celulares HCT116 y CaCo2, sus resultados se muestran en el *Anexo 5, Figura A5.2*. En la línea HCT116 no aparece ninguna población nueva con un alto marcaje para CD44 o ALDH, pero sí que parece enriquecerse la población en células ALDH⁺ (como se puede ver en los porcentajes de los diagramas de puntos). Si se observan los histogramas, sí es cierto que la población en la muestra tratada se desplaza hacia la derecha ligeramente, es decir, expresa más CD44 y ALDH que las células sin tratar. En cuanto al Hoechst 33342 aparece una población lateral, con un porcentaje muy minoritario. Sin embargo, esta población no correlaciona con una alta expresión de ALDH. En la línea CaCo2 se puede ver que la población CD44⁺ALDH⁺ disminuye drásticamente en la muestra tratada aunque en el ensayo Hoechst 33342 sí que aparece de nuevo lo que podría ser una población lateral. Su presencia en la muestra es minoritaria y con respecto a la muestra control apenas se encuentran diferencias. Además, la cantidad de células que se recogieron para esta línea tras el tratamiento fueron insuficientes como para estar seguros de estos últimos datos y haría falta su validación.

4.6 – ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE HIPOXIA EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE

La hipoxia es una condición común en los tumores sólidos avanzados que se genera en el interior del mismo debido a la gran acumulación de células que ahí se mantiene. Se ha observado que estas condiciones enriquecen la población celular en CSCs algunas líneas celulares (Choi D 2009); se piensa es debido a la eliminación de las células tumorales diferenciadas en favor de las CSCs o una posible desdiferenciación celular de la mismas células. Decidimos comprobar esta hipótesis en nuestras líneas celulares utilizando el marcaje superficial y el ensayo Hoechst 33342 para CSCs optimizado. En la *Figura 11*, se muestran los resultados de los marcajes extracelulares para la línea celular HT29 tras su exposición a un ambiente de hipoxia. Como se puede observar en la figura, las condiciones de hipoxia parece que inducen una disminución en la expresión de CD44, sobre todo en las líneas HCT116 y CaCo2. Los resultados para el ensayo de expulsión de Hoechst 33342 se muestran en el *Anexo 6, Figura A6*, y no muestran cambios significativos en las muestras incubadas en hipoxia con respecto a las incubadas en normoxia. El ensayo Hoechst 33342 sigue sin dar resultados positivos

para la identificación de la población lateral; sin embargo, los resultados de CD44 no correlacionan con la hipótesis de que la hipoxia induce diferenciación (Choi D 2009). Esto podría indicar que CD44 no es tan buen marcador como se ha visto hasta el momento o que las condiciones de hipoxia no afectan a la concentración de CSCs. Es posible que, al igual que la presencia de fármacos, la condición de hipoxia deba estar en un determinado rango para que la población de CSCs se vea incrementada. Si la concentración de oxígeno es demasiado baja, es posible que la viabilidad de las células madre se vea comprometida y en este caso, ese descenso de la viabilidad se vea reflejada en una bajada de las concentraciones de marcadores de superficie como CD44. Habría que buscar un rango de concentración de oxígeno y/o tiempo de incubación en el cual se induzca la dediferenciación de las células tumorales normales o su viabilidad se vea afectada permitiendo a las CSCs tomar el control del cultivo, viendo por tanto un incremento en dicha población.

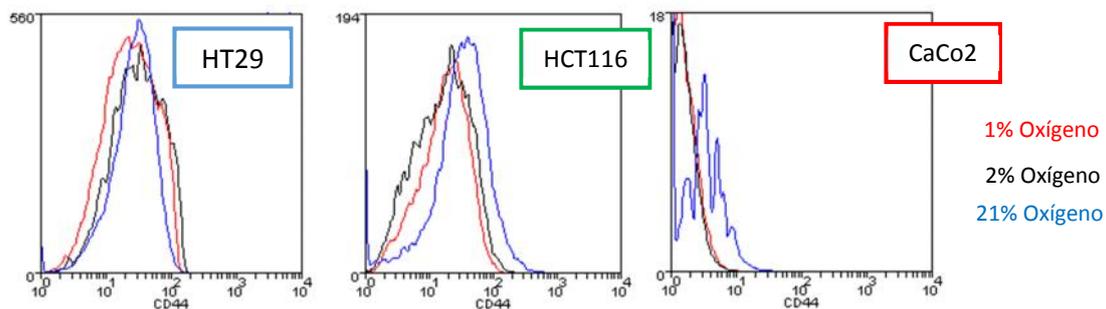


Figura 11. Análisis de la expresión de CD44 bajo condiciones de hipoxia en las líneas celulares HT29, HCT116 y CaCo2. Las células son incubadas en condiciones de hipoxia a 1 y 2% de concentración de oxígeno, y se utiliza como control negativo las células incubadas en normoxia, 21% de concentración de oxígeno. Tras la incubación, las células fueron marcadas con CD44 y analizadas por citometría. De izquierda a derecha, se muestran los resultados en forma de histograma de las líneas celulares HT29, HCT116 y CaCo2 incubadas a 1%, 2% y 21% de concentración de oxígeno.

4.6 – FORMACIÓN DE CULTIVOS EN 3D DE LAS LÍNEAS CELULARES

Siguiendo el protocolo de formación de esferoides detallado en el apartado *Métodos*, 3.2.8., conseguimos establecer cultivos en 3D *in vitro* para las líneas celulares HT29 y HCT116. Los resultados se muestran en la *Figura 12*. En ella, se muestra cómo la línea celular HT29 fue capaz de generar esferoides tras 24 h mientras que la línea celular HCT116 no fue capaz hasta pasadas 48 h. Sin embargo, la línea celular CaCo2 no fue capaz de generar esferoides en ningún momento.

Los esferoides de cada línea celular presentan unas características idénticas a las características observadas en el cultivo en 2D *in vitro*. En cultivo *in vitro* 2D la línea celular HT29 presenta un crecimiento más lento que la línea HCT116 y además sus adhesiones moleculares son más fuertes, hecho que se ha comprobado diariamente en el mantenimiento de cultivos de ambas líneas celulares. El cultivo en 3D reproduce fielmente estas características. La formación de un esferoide implica una adhesión molecular intensa entre las células que lo forman y por tanto, es consistente que la línea celular HT29 sea capaz de generar una masa compacta de células muy cohesionadas entre sí, un esferoide, en 24 h mientras que la línea HCT116 tarde 48 h. Trascorridas 24 h, la línea HCT116 presenta células individuales que pueden distinguirse perfectamente pero pasadas las 48 h, las adhesiones moleculares se hacen más fuertes y el esferoide se forma. La línea CaCo2 no ha sido capaz de generar correctamente esferoides sino que las células crecen en grandes glomérulos independientes. En cultivo en 2D, las células de esta línea celular se unen fuertemente entre sí formando una fina monocapa adherida a la placa y muy difícil de disgregar. Es posible que esto sea debido a la alta cohesión que presentan estas células entre sí que les permite crecer muy adheridas a las células vecinas pero no así con las lejanas formando glomérulos independientes en vez de un esferoide completo.

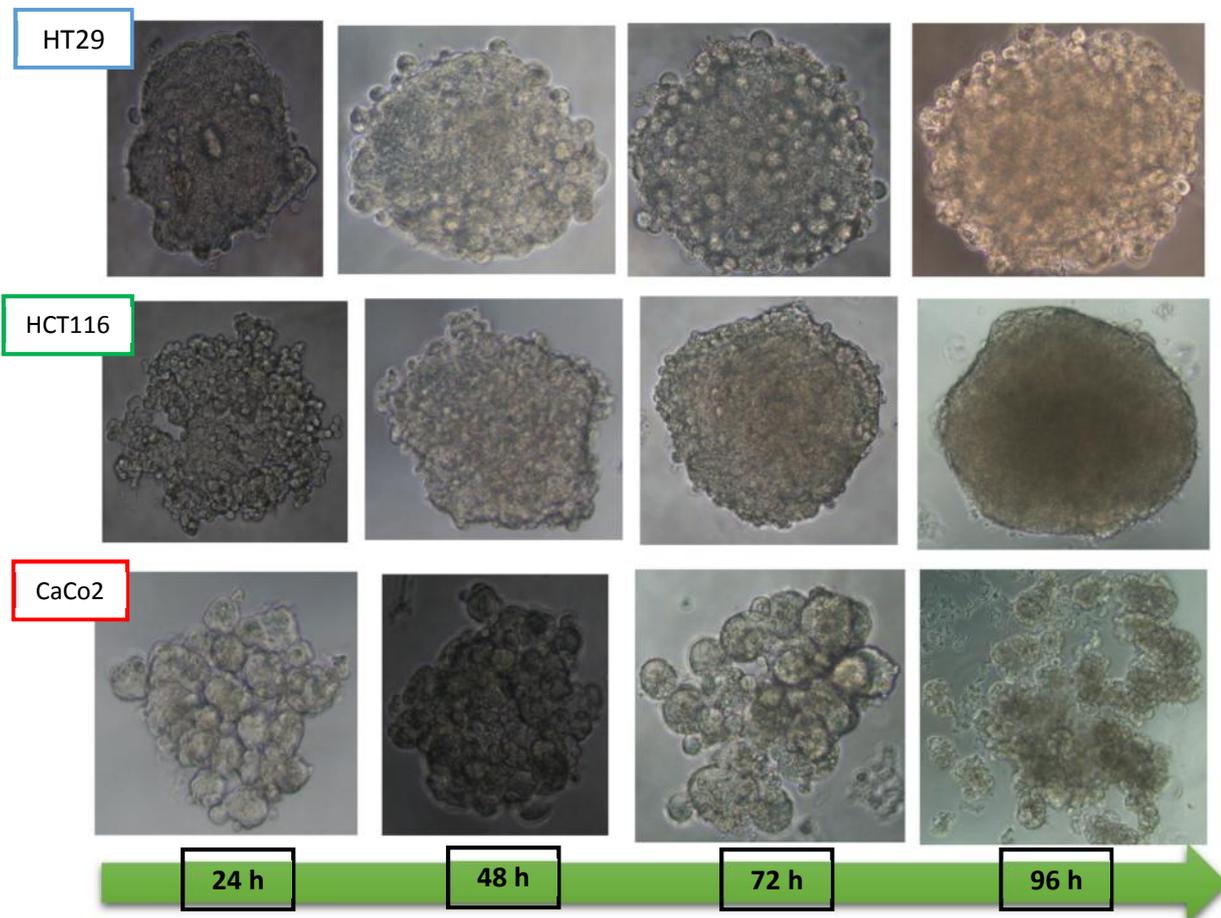


Figura 12. Análisis de la eficacia del método gota colgante para formación de cultivos 3D en forma de esferoide en las líneas celulares HT29, HCT116 y CaCo2. En una tapa de placa Petri, se aplican gotas de 25 μ l de una mezcla formada por 10% de células con medio DMEM completo, 20% de Methocel y 70% de medio DMEM completo. Al voltear la tapa, las gotas quedan colgando permitiendo a las células rodar hasta el fondo donde podrán establecer adhesiones y formar un esferoide 3D.

Conforme avanza el tiempo, las células crecen y se dividen como un cultivo normal en 2D hasta llegar a un máximo de crecimiento en torno a las 96-120 h. A partir de ese tiempo, el esferoide no aumenta de tamaño y se comienza a formar un núcleo necrótico, como puede apreciarse en la *Figura A7* del *Anexo 7*. La formación de dicho núcleo necrótico se analizó en las líneas HT29 y HCT116, las únicas capaces de generar esferoides 3D. Como puede verse en la *Figura A7*, en los esferoides de ambas líneas celulares comienza a aparecer una alta cantidad de células muertas a partir de las 96 h. El esferoide mantiene su forma y consistencia, sin embargo en su interior hay una gran cantidad de células muertas que forman un núcleo necrótico debido a la imposibilidad del acceso a los nutrientes del medio.

4.8 – ANÁLISIS DE LOS MARCADORES DE SUPERFICIE EN LOS CULTIVOS EN 3D

Tras poner a punto el protocolo de disgregación de esferoides, tal y como se indica en el apartado *Métodos 3.2.9*, examinamos si los marcadores de superficie CDs analizados para las líneas celulares en cultivos en 2D (CD24, CD44 y CD133) cambian cuando se genera un cultivo 3D. Los resultados son mostrados en el *Anexo 8, Figura A8*. La expresión de los marcadores de superficie para la línea HT29 no se ven modificada por el cultivo en 3D. Los picos que aparecen en los histogramas del cultivo en 2D y 3D son idénticos para los 3 marcadores. En cambio, los marcadores para la línea HCT116 sí que parece que se ven afectados. La expresión de CD133 se ve disminuida en gran medida mientras que la expresión de CD44 aumenta. CD133 es una proteína que está localizada en las protuberancias de la célula; el cultivo en 3D en forma de esferoide, en el cual las células están muy próximas entre sí formando una masa compacta, no permite que las células tengan tanto espacio para crecer ni adherirse por lo que podría tener sentido el hecho de que la expresión de CD133 se vea reducida. Con respecto a CD44, es posible que la íntima interacción entre las células que se produce en el cultivo en 3D induzca la desdiferenciación o sólo sean capaces de sobrevivir las CSCs, enriqueciendo la población que expresa CD44 que como hemos visto se impone como un buen marcador de CSCs. 23

5. Conclusiones

El trabajo desarrollado para resolver el objetivo general de identificar y caracterizar las CSCs en las líneas celulares HT29, HCT116 y CaCo2 ha permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. Las líneas celulares HT29, HCT116 y CaCo2 muestran una expresión de CD24, CD44 y CD133 acorde a lo mostrado en la bibliografía pero estos marcadores superficiales no sirven como único identificador de CSCs.
2. En las líneas celulares analizadas no se ha conseguido encontrar con el ensayo Hoechst 33342 una población lateral que expulsase correctamente el colorante y además no se correlaciona una baja retención de Hoechst 33342 con la expresión de los distintos CDs analizados.
3. El marcaje superficial de CD24 y CD44 correlaciona con la sobreexpresión de ALDH pero no así con la retención de Hoechst 33342 en las líneas celulares analizadas
4. El marcaje CD44-ALDH parece imponerse como marcador de CSCs al correlacionar entre sí en las líneas analizadas tras ser tratada con el fármaco PTX.
5. Se ha llegado a identificar una nueva población CD44^{alto}ALDH⁺ en la línea HT29 tras ser tratada con el fármaco PTX.
6. Se ha conseguido establecer cultivos *in vitro* 3D en las líneas celulares HT29 y HCT116 con el método de la gota colgante que reproduce las características fenotípicas observadas en cultivo *in vitro* 2D.
7. El marcaje con CD24, CD44 y CD133 para la línea celular HT29 no cambia tras la formación de un cultivo 3D. Sin embargo, en la línea celular HCT116 la expresión de CD133 disminuye mientras que el resto se mantiene igual.

5. Conclusions

This project developed to identify and characterise CSC of HT29, HCT116 and CaCo2 cell lines has allowed us to get the next conclusions:

1. HT29, HCT116 and CaCo2 cell lines show an expression pattern of CD24, CD44 and CD133 in agreement with bibliography but these surface markers are not enough as unique CSC marker.
2. Hoechst 33342 efflux assay does not allow us to find a side population in cell lines analyzed and do not correlate with surface markers.
3. Expression of CD24 and CD44 correlated with overexpression of ALDH but not with Hoechst 33342 efflux assay in the analyzed cell lines.
4. CD44-ALDH assay is proposed as a CSC identifier for analyzed cell lines due to its correlation after PTX treatment.
5. A highly CD44⁺ALDH⁺ new population has been identified after PTX treatment in HT29 cell line.
6. HT29 and HCT116 are able to be cultured on 3D *in vitro* culture by hanging drop assay and this culture reproduces the found phenotype on 2D *in vitro* cultures.
7. Surface markers do not change in 3D *in vitro* cultures in HT29 cell line but in HCT116 ones, the expression of CD133 decreases.

6. Bibliografia

- Al-Hajj M et al., C. M. (2004). "Self-renewal and solid tumor stem cells." *Oncogene* 23 (43): 7274-7282.
- Barker N et al., R. R., van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ, Clevers H. (2009). "Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer." *Nature* 457 (7229): 608-611.
- Bonnet D. et al., D. J. E. (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." *Nature* 3: 730-737.
- Cherciu I, B. A., Pirici D, argaritescu C, Saftoiu A (2014). "Stem cells, colorectal cancer and cancer stem cell markers correlations." *Current Health Sciences Journal* 40 (3): 153-161.
- Choi D, L. H., Hur KY, Kim JJ, Park GS, Jang SH, Song YS, Jang KS, Paik SS (2009). "Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma." *World J Gastroenterol* 15 (18): 2258-2264.
- Darzynkiewicz Z, B. S., Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F (1992). "Features of apoptotic cells measured by flow cytometry." *Cytometry* 13 (8): 795-808.
- E., D. J. (2005). "Acute myeloid leukemia stem cells." *Ann N Y Acad Sci* 1044: 1-5.
- Ferlay J, S.-F. E., Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F (2013). "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012." *Eur J Cancer* 49 (6): 1374-1403.
- Horst D, K. L., Engel J, Kirchner T, Jung A (2009). "Prognostic significance of the cancer stem cell markers CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer." *Cancer Invest* 27 (8): 844-850.
- Huang E, H. M., Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, Boman and BM. (2009). "ALDH1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells and tracks stem cell overpopulation during colon tumorigenesis." *Cancer Res* 69: 3382-3389.
- Huang E, W. M. (2008). "Colon cancer stem cells: implications for prevention and therapy." *Trends Mol Med* 14 (11): 503-509.
- Jaggupilli A, E. E. (2012). "Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity." *Clin Dev Immunol*.
- Jordan (2009). "Cancer Stem Cells: Controversial or Just Misunderstood." *Cell Stem Cell* 4 (3): 203-205.
- Kinzler KW et al., V. B. (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." *Cell* 87 (2): 159-170.
- Kojima M, I. G., Atsumi N, Fujii S, Saito N, Ochiai A. (2008). "Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study." *Cancer Sci* 99 (8): 1578-1583.
- Lengauer C et al., K. K., Vogelstein B (1997). "Genetic instability in colorectal cancers." *Nature* 386 (6625): 623-7.
- Magee, J. A., Elena Piskounova, and Sean J. Morrison. (2012). "Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty." *Cancer Cell* 21 (3): 283-296.
- O'Brien CA, P. A., Gallinger S, Dick JE. (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." *Nature* 445 (7123): 106-110.
- Patrawala L, C. T., Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG (2005). "Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic." *Cancer Res* 65 (14): 6207-6219.
- Peacock CD, W. Q., Gesell GS, Corcoran-Schwartz IM, Jones E, Kim J, Devereux WL, Rhodes JT, Huff CA, Beachy PA, Watkins DN, Matsui W (2007). "Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (10): 4048-4053.
- Peter Chu, D. J. C., Tracey S. Snipas, Julia Lee, Eric Mitchell, Mai-Lan Nguyen, Eric Hare and Robert J. Peach (2009). "Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties." *Int J Cancer* 124: 1312-1321.
- Taussig DC et al., M.-M. F., Anjos-Afonso F, Pearce DJ, Allen K, Ridler C, Lillington D, Oakervee H, Cavenagh J, Agrawal SG, Lister TA, Gribben JG, Bonnet D (2008). "Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells." *Blood* 112 (3): 568-575.
- Vaiopoulos AG et al., K. I., Koutsilieris M, Papavassiliou AG. (2012). "Colorectal cancer stem cells." *Stem Cells* 30 (3): 363-371.
- Yasunaga, M. e. a. (2014). "Role of SLC6A6 in promoting the survival and multidrug resistance of colorectal cancer." *Sci. Rep* 4: 1-9.
- Yin AH, M. S., Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood* 90 (12): 5002-5012.