



## Universidad Zaragoza

“Evaluación del efecto antitumoral de inhibidores del metabolismo de lípidos en cultivos primarios derivados de pacientes de cáncer de páncreas”

“Study of the antitumoral effect of lipid metabolism inhibitors in primary cultures from pancreatic cancer patients”

---

Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología

Directora: Dra. Patricia Sancho Andrés. Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón.

Colaboración de: Beatriz Parejo Alonso. Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón.

Ponente: Dra. Milagros Medina Trullenque. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.

Autora: Hazel Santander Badules.

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Dar las gracias a mi directora, la Dra. Patricia Sancho, y al técnico de laboratorio, Beatriz Parejo, por permitirme formar parte de su equipo para esta investigación, y por toda su ayuda y supervisión a lo largo de mi estancia en el laboratorio del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza y en la realización de este trabajo de fin de grado.

Dedico mi primera investigación en el campo de la Biotecnología a la memoria de mi abuela Milagros, fallecida el 05/07/16 a causa de un cáncer de páncreas.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>Cáncer de páncreas</b> .....	2
<b>Células madre tumorales</b> .....	3
<b>Metabolismo tumoral</b> .....	5
<b>Inhibidores: SSO y JZL184</b> .....	6
<b>Tratamientos actuales</b> .....	9
<b>OBJETIVOS</b> .....	10
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	11
<b>Ensayo de proliferación con dosimetría</b> .....	12
<b>Ensayo de formación de esferas tras tratamiento en adherencia</b> .....	13
<b>Ensayo de formación de colonias (CFA)</b> .....	13
<b>Proliferación en distintas concentraciones de glucosa</b> .....	14
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	15
<b>Ensayo de proliferación con dosimetría</b> .....	15
<b>Ensayo de formación de esferas tras tratamiento en adherencia y ensayo de formación de colonias (CFA)</b> .....	17
<b>Proliferación en distintas concentraciones de glucosa</b> .....	20
<b>CONCLUSIONES</b> .....	22
<b>CONCLUSIONS</b> .....	23
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	24

## RESUMEN

En la actualidad, el cáncer de páncreas es una de las neoplasias más agresivas, puesto que, a pesar de que su incidencia no es la más elevada en cuanto a los distintos tipos de cáncer, su mortalidad sí lo es, teniendo una tasa de supervivencia a 5 años del 7%. En los últimos años se ha comprobado la existencia de las células madre tumorales (CSC) en este y otros tipos de tumores, siendo las responsables de la proliferación y diferenciación que le aportan la capacidad metastásica a estos cánceres, convirtiéndose en una nueva diana contra la que actuar para detener el desarrollo tumoral.

En este proyecto se pretende comprobar el efecto que dos inhibidores del metabolismo de lípidos tendrían sobre tres cultivos primarios (215, 253 y 354) de pacientes con cáncer de páncreas. Estos inhibidores son el SSO y el JZL184, que desactivan el receptor de membrana CD36 responsable de la absorción de lípidos y asociado a la capacidad metastásica de los tumores, y a la enzima MGLL responsable de la salida de lípidos de las gotas lipídicas, respectivamente. Para ello se desarrollarán diferentes experimentos: de proliferación con dosimetría, de formación de esferas tras tratamiento en adherencia, de formación de colonias, y de proliferación en distintas concentraciones de glucosa.

Los inhibidores parecen no tener efecto sobre las células 215 y 253, pero sí se observa una reducción de CSCs en el caso de las 354, que son las más metastásicas. Por tanto, estos inhibidores podrían ser efectivos para tratar células con mayor capacidad metastásica. En un futuro, se podrían llevar a cabo ensayos con otros tipos de células metastásicas para comprobar nuestra hipótesis.

## ABSTRACT

Nowadays, pancreatic cancer is one of the most aggressive malignancies. Even though its incidence is not the highest among other cancer types, its mortality is, with a five-year survival rate of 7%. Recently, cancer stem cells (CSC) have been found in this and other tumors types. Those cells are responsible of proliferation and differentiation, which contribute to the metastatic malignancy of these cancers. Thus, a new target is set in order to act against tumor development.

In this research work, we are trying to test the effect of two inhibitors of lipids metabolism on three primary cultures (215, 253 & 354) derived from pancreatic cancer patients. These inhibitors are the SSO and JZL184, which disable the cell surface receptor CD36, responsible of lipids absorption and related to the malignancy of tumors, and the enzyme MGLL, accountable of the release of lipids from lipid droplets. With this aim, several experiments will be carried out: proliferation with dosimetry, sphere formation after treatment in adherent conditions, colony formation assay, and proliferation in various concentration of glucose.

Inhibitors apparently do not have an effect on 215 and 253 cells, but a reduction of CSCs is observed in 354 cells, which are the most metastatic. Thus, these inhibitors could be effective for the treatment of this type of cells. In the future, some experiments could be carried out with other types of malignant cells in order to assess our hypothesis.

## INTRODUCCIÓN

### Cáncer de páncreas

El páncreas es un órgano de gran tamaño que se encuentra entre el estómago y la columna vertebral. (1) Su función principal es producir y secretar enzimas a los intestinos, ayudando a la digestión y absorción de los alimentos, sobre todo las grasas. Este órgano también secreta dos hormonas muy importantes en la regulación de los niveles de glucosa en sangre, la insulina y el glucagón. (2)

El páncreas está formado por la cabeza, el cuerpo y la cola, produciéndose, según la SEOM, el **60%** de los **casos de cáncer de páncreas** en la parte de la **cabeza**.

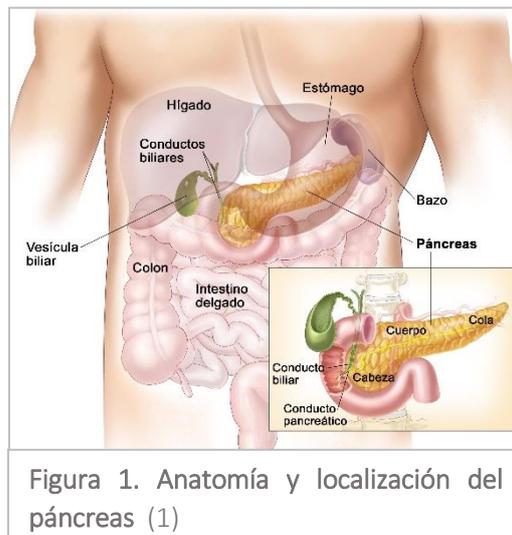


Figura 1. Anatomía y localización del páncreas (1)

El cáncer de páncreas se produce debido a una proliferación incontrolada de las células sanas del páncreas. Si se acumulan formarán una masa llamada tumor y si algunas de estas células poseen capacidad migratoria, se diseminarán a través del torrente sanguíneo a otras partes del cuerpo, donde se volverán a acumular y formarán más tejidos tumorales. Este proceso se conoce como metástasis.

Este tipo de cáncer es una de las neoplasias más agresivas debido a su **difícil detección y diagnóstico**. Esto se debe, a que, en la mayoría de los casos, no aparecen síntomas ni signos tempranos, si no que se manifiestan cuando el tumor ya está muy avanzado impidiendo llevar a cabo una cirugía. Además, estos síntomas y signos tienen mucha similitud con los de muchas otras enfermedades (por ejemplo, la ictericia, la cual es una causa más común de la hepatitis y otras enfermedades del hígado y el conducto biliar), por lo que es necesario realizar pruebas más específicas para determinar si se trata de cáncer de páncreas o alguna otra patología. Al mismo tiempo, debido a que el páncreas se encuentra detrás de muchos otros órganos, como el estómago, el intestino o el hígado, también es difícil su diagnóstico por palpación. (1)

Este tipo de cáncer tiene una incidencia de aproximadamente 50.000 casos al año y se producen unas 42.000 muertes al año debido a esta enfermedad. Estos números indican que, aunque el cáncer de páncreas no sea el principal tipo de cáncer más frecuente en la población, es uno de los más mortales, debido a que, como ya he explicado, su diagnóstico es tardío y los pacientes se encuentran en un estado avanzado de la enfermedad. Por ello, solo un 10-15% de los pacientes se benefician de la cirugía. Además, la tasa de supervivencia a 1 año, de este tipo de tumor, está en torno al 29%, mientras que la **tasa de supervivencia a 5 años está en torno al 7%** (ambos porcentajes dependen de muchos factores, por tanto, habría que evaluar cada paciente de forma individual, puesto que sí se consigue detectar el tumor en un estadio temprano y someter al paciente a cirugía, los porcentajes de supervivencia aumentan). (3)

### Células madre tumorales

Los cánceres están compuestos por células que difieren en cuanto a su morfología, fenotipo, capacidad proliferativa y migratoria (metastásica), potencial tumoral o resistencia quimioterápica. (4)(5) Esto se conoce como **heterogeneidad tumoral** explicada mediante dos modelos, el primero tiene su origen en 1976 y fue desarrollado por Peter Nowell (6) y el segundo está siendo estudiado actualmente y se basa en las células madre tumorales (CSCs), el cual no tiene por qué contradecir el primero (7), si no complementar la información que ya se conoce sobre los tumores.

El primer modelo (figura 2), llamado **modelo de evolución clonal** consiste en que los tumores provienen de una única célula que ha acumulado una serie de mutaciones que la transforman en una célula maligna capaz de producir cáncer. A partir de ella se producen cada una de las subpoblaciones diferentes que forman parte de la masa tumoral. Además, estas subpoblaciones pueden sufrir otras mutaciones aumentando la variabilidad tumoral.

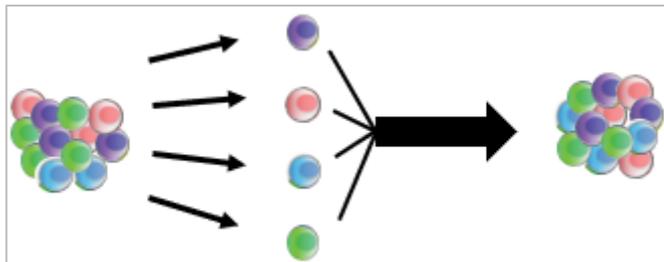


Figura 2. Representa el modelo de evolución clonal del cáncer

Cada una de las células puede acumular mutaciones y formar a un tumor. (Elaboración propia).

Esta heterogeneidad da una ventaja a las células cancerígenas a la hora de sobrevivir a los tratamientos a los que se someten los pacientes, ya que siempre puede haber una subpoblación que sea resistente, lo cual explicaría que a medida que avanza la enfermedad el tumor se vuelve más agresivo y menos sensible a los tratamientos. (8)(7)

El **modelo de las células madre tumorales** (figura 3) se basa en que solo una pequeña subpoblación de células tumorales es capaz de proliferar y diferenciarse en otros tipos celulares, es decir, que solo unas pocas células poseen potencial tumoral y son esenciales para el desarrollo y mantenimiento del cáncer. (7)(9) Se cree que las CSC provienen de células somáticas o progenitoras que han sufrido alteraciones genéticas que les confieren un comportamiento maligno. Otra posibilidad es que se originen a partir de la dediferenciación de una célula que adquiere, mediante mutaciones, las características propias de una célula madre. (10)

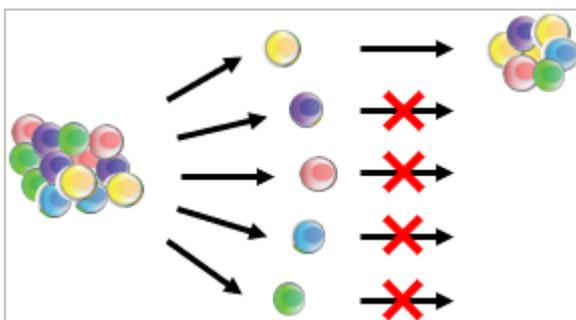


Figura 3. Representa el modelo células madre tumorales

Color amarillo corresponde a las CSCs.

Solamente las CSCs tienen capacidad de formar un tumor y diferenciarse en el resto de las células. (Elaboración propia).

Las **células madre tumorales (CSCs)** son un tipo de células madre, puesto que son capaces de autorrenovarse, dividirse de forma ilimitada, provocando la formación de poblaciones celulares de gran tamaño dando lugar al cáncer, y diferenciarse en otros tipos celulares, contribuyendo a la heterogeneidad tumoral (figura 4). (11)

Las células normales necesitan estar adheridas a una superficie y estar en contacto con otras células para poder crecer, mientras que las células madre tumorales se caracterizan por todo lo contrario, puesto que, además de crecer sin necesidad de adhesión a una pared y no necesitar contacto celular alguno para su proliferación, cuando en el organismo se encuentran en contacto con otros tipos celulares no se frena su desarrollo, sino que siguen dividiéndose y formando una masa de células que desarrollará un cáncer.

Las CSCs se han identificado mediante el uso de marcadores moleculares específicos en modelos animales (12) y se han encontrado en muchos tipos de cáncer (leucemias, cáncer de mama, glioblastoma, etc.) (9) siendo las responsables de la recaída y la metástasis en los pacientes. (13)

Las CSCs son las **principales culpables de la resistencia de los tumores** a los **tratamientos clásicos**, puesto que, al someter a los pacientes, por ejemplo, a quimioterapia, los fármacos utilizados se encargan de eliminar todas las células sensibles, pero algunas CSCs serán resistentes y quedarán en el organismo, favoreciendo la reaparición del tumor maligno al cabo del tiempo y probablemente se forme un nuevo tumor más resistente. (13) Esto es debido a que una de las principales características de las CSCs es la quimioresistencia y por ello, está en auge la búsqueda de nuevas drogas que sean capaces de acabar con ellas y así evitar la recaída en el cáncer.

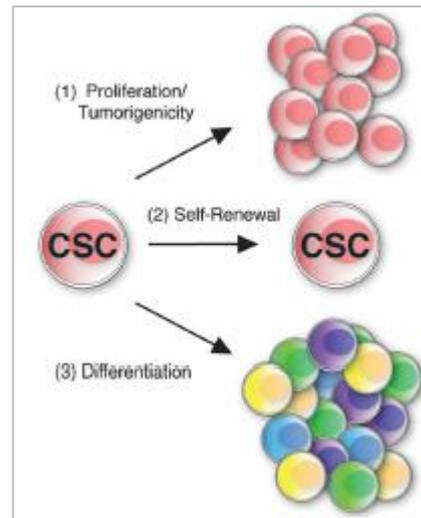


Figura 4. Representación gráfica de las tres características principales de las CSCs (12)

- (1) Crecimiento ilimitado,
- (2) autorrenovación y
- (3) diferenciación a otros tipos celulares.

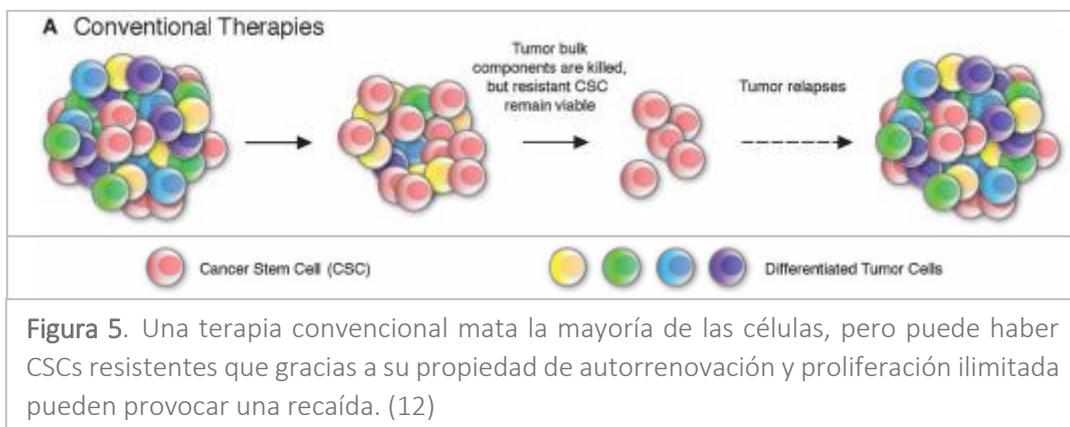
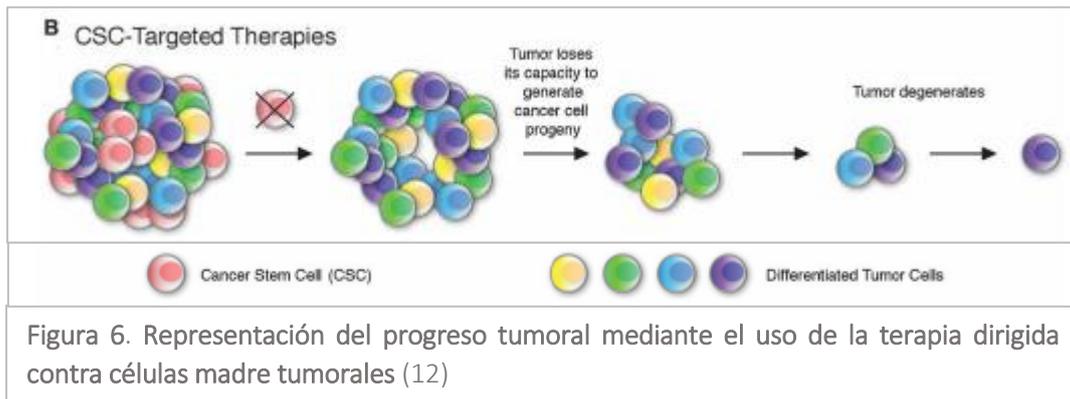


Figura 5. Una terapia convencional mata la mayoría de las células, pero puede haber CSCs resistentes que gracias a su propiedad de autorrenovación y proliferación ilimitada pueden provocar una recaída. (12)

Estudios han demostrado que dirigiendo las terapias contra las células madre tumorales se puede inhibir el crecimiento tumoral, puesto que si eliminamos las CSCs conseguiremos dejar al tumor sin su capacidad de generar nuevas células y, por lo tanto, aquellas células diferenciadas contra las que no está dirigida la terapia terminan muriendo como consecuencia de su propio metabolismo, consiguiendo una degeneración del tumor. (12) **Actualmente**, las líneas de actuación se dirigen hacia la **combinación** de las **quimioterapias convencionales** con terapias dirigidas con **nuevos fármacos que sean capaces de atacar y eliminar las CSCs para conseguir una eliminación completa del tumor.**



### Metabolismo tumoral

Las células tumorales son capaces de llevar a cabo **reprogramación genética**, para conseguir el soporte necesario para mantener el crecimiento tumoral y para resistir al estrés celular. (14) Para ello, alteran numerosos mecanismos moleculares que proporcionan los nutrientes y metabolitos necesarios para mantener el estado energético de la célula, la biosíntesis de macromoléculas y un estado redox adecuado. (15) De hecho, las células tumorales tienen una demanda mayor de nutrientes debido a que están continuamente creciendo y proliferando. Debido a esta demanda excesiva de nutrientes las células tumorales son capaces de formar nuevos vasos sanguíneos mediante angiogénesis para facilitar la llegada de nutrientes, factores de crecimiento y oxígeno al microambiente tumoral. Sin embargo, algunas partes de la masa tumoral quedan sin un riego adecuado y, por tanto, quedan sometidas a hipoxia, contra lo cual las células tumorales activan procesos para adaptarse a estas circunstancias, tales como la inducción de factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) y una regulación positiva de absorción de glucosa y glutamina, internalización de lípidos y proteínas y la autofagia. (14)

Estudios han demostrado que los procesos metabólicos de las lipoproteínas y la absorción de numerosos lípidos están relacionados con una activación del crecimiento tumoral. (16) Cada vez está más claro que **la síntesis de ácidos grasos favorece la carcinogénesis y la supervivencia de las células tumorales**, y, por consiguiente, una inhibición de las enzimas implicadas en el metabolismo lipídico podría ser una buena diana para atacar el cáncer de páncreas, ya que se ha comprobado que la inhibición de las enzimas lipogénicas ralentiza el crecimiento y proliferación de las células tumorales. Por ejemplo, las balsas lipídicas son dominios lipídicos ricos en colesterol y esfingolípidos que desempeñan un papel importante tanto en el bienestar como en la enfermedad de la célula, incluida la carcinogénesis, además de servir como depósito lipídico a la célula. Por tanto, también es interesante utilizar inhibidores de la salida y entrada de lípidos de

las balsas lipídicas para analizar cómo afecta una reducción de la cantidad de lípidos en el metabolismo de las células tumorales. (17)

La transición epitelio-mesenquimal (EMT) se caracteriza por el cambio de fenotipo de las células epiteliales, las cuales adquieren la pérdida de la adhesión célula-célula y de la polaridad celular, aumentan la prevención de la apoptosis y senescencia y aumentan su capacidad migratoria e invasiva. Todas estas características influyen en la resistencia a la quimioterapia convencional haciendo de este tipo de cáncer uno de los más mortales. (18) Tanto la **EMT** como la captación de **ácidos grasos** (por ejemplo, a través del receptor CD36) y la **lipogénesis** parecen estar **aumentadas en aquellos tumores pancreáticos más metastásicos**, implicando una relación directa del metabolismo lipídico con la progresión metastásica y el mal pronóstico del cáncer. (19)

Las CSCs, a diferencia de las células tumorales diferenciadas, muestran un fenotipo metabólico dependiente de la fosforilación oxidativa mitocondrial. El sistema OXPHOS permite a las CSCs cursar con una mayor resistencia a la privación de nutrientes en condiciones de estrés, ya que es una fuente más eficiente para la generación de energía y permite a las células tener una ventaja en cuanto a la falta de nutrientes en el microambiente tumoral. (20) Por último, está claro que **el metabolismo de ácidos grasos es esencial para la actividad tumorigénica de las CSCs pancreáticas** debido a la presencia elevada de genes implicados en captación y acumulación de lípidos en las gotas lipídicas, lo cual confiere una mayor agresividad a este tipo de cáncer, un mayor número de gotas lipídicas en las CSCs y que la inhibición mitocondrial reduce el número de CSCs pancreáticas, entre otras evidencias. (21)

Todo esto sugiere que las CSCs necesitan captar, acumular y metabolizar ácidos grasos para aumentar y mantener su capacidad metastásica y proliferativa. Por tanto, como he comentado anteriormente sería interesante atacar enzimas y moléculas relevantes en el metabolismo lipídico de las células tumorales como una terapia contra el cáncer de páncreas.

### **Inhibidores: SSO y JZL184**

Estudios han demostrado que el **receptor CD36** es un factor determinante para que las células tumorales sean **metastásicas**. Se han llevado a cabo experimentos en ratones y se han estudiado distintos tipos de cáncer (de ovario, de vejiga, de mama, de pulmón y melanoma) y se ha observado que cuando se bloquea el receptor CD36, antes de inocularlo en el animal se reduce totalmente la capacidad metastásica del tumor, y que cuando se bloquea una vez inoculado el tumor, se consigue una eliminación total en el 20% de los ratones y en el resto se reduce el número de focos metastásicos. En los tumores analizados se ha detectado que solamente entre 50 y 100 células serían iniciadoras de la metástasis, las cuales poseen el receptor CD36, mientras que, si añaden CD36 a tumores que no tenían capacidad metastásica, se convierten en metastásicos, lo que proporciona más evidencias de la importancia de este receptor para la proliferación y diseminación del cáncer. (22)

El receptor CD36 (figura 7) tiene como función la absorción de ácidos grasos de cadena larga, además de contribuir en el suministro excesivo de grasa que produce acumulación lipídica y disfunción del metabolismo. Este receptor es una proteína de membrana que se encuentra ampliamente expresada en muchos tejidos, como adipocitos, células inmunitarias y células del retinal. Está formado por dos dominios intracelulares cortos, dos segmentos transmembrana y

un largo dominio extracelular que posee una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos que forman parte de un bolsillo donde se produce la unión de ligandos lipídicos, además de tres puentes disulfuro importantes para su reclutamiento en la membrana. El C-terminal está implicado en la interacción y activación de numerosas tirosin quinasas, lo cual inicia la mayoría de las señales de transducción del receptor CD36. Tanto el N-terminal como el C-terminal, se encuentran palmitolados, lo cual localiza a CD36 en las balsas lipídicas de la membrana. En el N-terminal tiene sitios de unión a varios ligandos, como fosfolípidos, ácidos grasos, etc. Por último, este receptor, consta de numerosas modificaciones post-traduccionales (glicosilación, ubiquitinación, etc). (23)

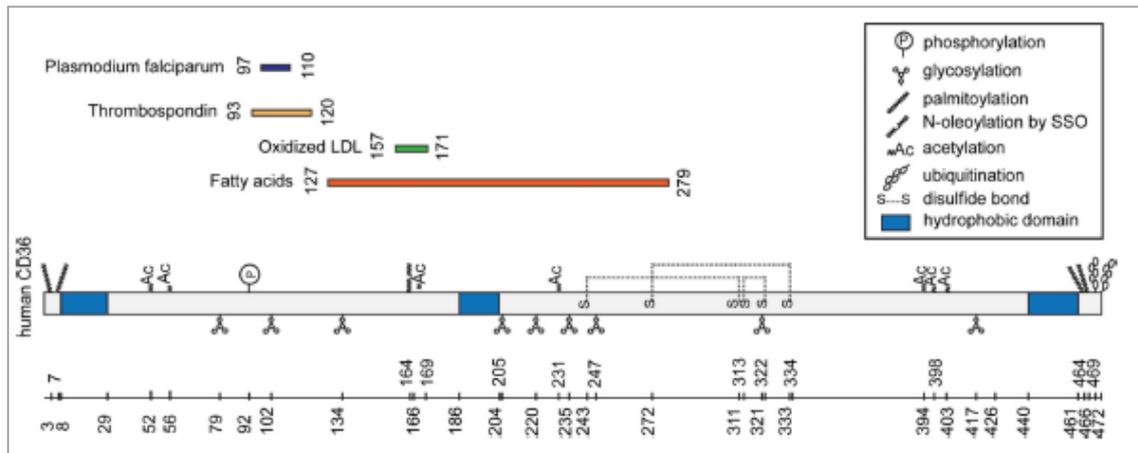


Figura 7. Estructura del receptor CD36

Están indicadas sus modificaciones pos-traduccionales, sitios de unión a sus posibles ligandos, en el N-terminal y sus dominios extra e intracelulares. (23)

La inhibición de este receptor podría ser una buena diana contra la que atacar al cáncer, y por ello, en este proyecto utilizamos el inhibidor Sulfosuccinimidyl Oleate (SSO).

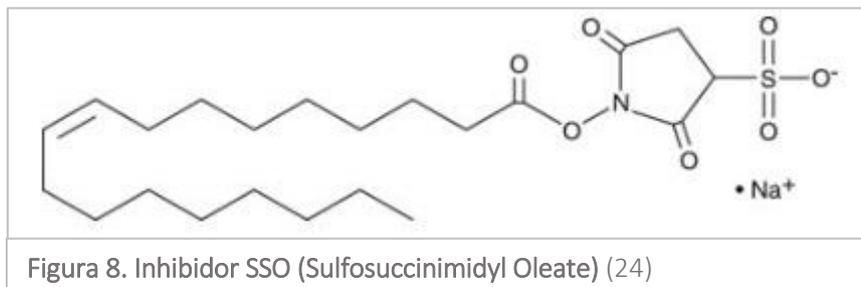


Figura 8. Inhibidor SSO (Sulfosuccinimidyl Oleate) (24)

El SSO posee un grupo sulfonato cargado negativamente que restringe su permeabilidad de membrana. Se encarga de inhibir, de forma irreversible, tanto la absorción de ácidos grasos como la señalización mediada por ácidos grasos que lleva a cabo el receptor CD36. Se ha demostrado que esta inhibición se produce debido a la **unión del SSO al grupo amino de la Lisina 164** (figura 9), residuo localizado **en el bolsillo del receptor CD36**. (23)

El grupo carboxilo de los ácidos grasos se une mediante interacciones electrostáticas con la Lisina 164, lo cual provocaría un cambio de conformación en CD36 promoviendo la absorción de lípidos o su señalización. (23)(25) Si se produce la unión del SSO en ese residuo, se impide que los ácidos grasos se unan a él, por lo cual no se producirá el cambio de conformación y el receptor no podrá llevar a cabo su función, consiguiendo su inhibición.

Hay otro residuo, la Lisina 166 que también forma parte del bolsillo hidrofóbico, la cual no une al SSO, sino que está acetilada, regulando el acceso de los ácidos grasos al interior del bolsillo. (23)

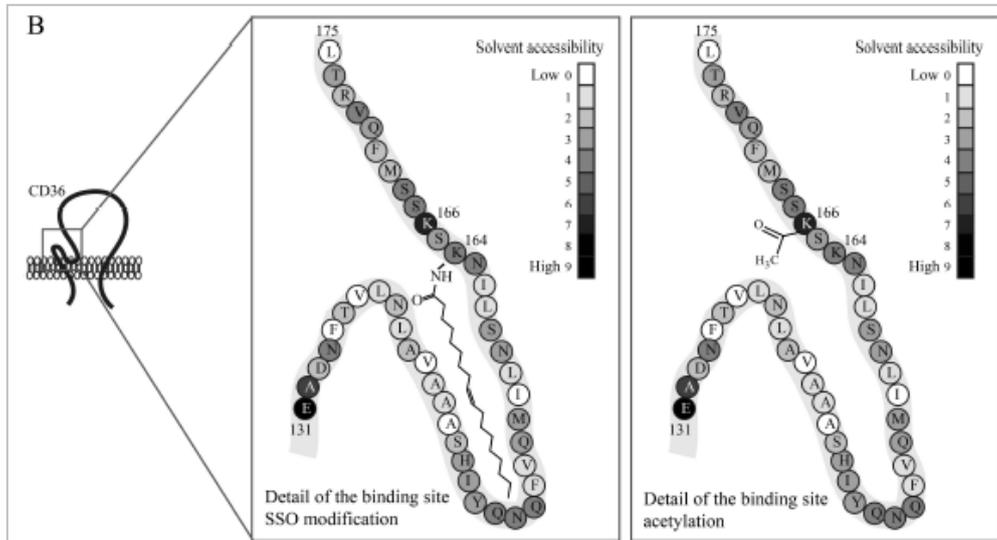


Figura 9. Bolsillo hidrofóbico de CD36

En la imagen izquierda observamos el SSO unido a la Lisina 164 y en la imagen derecha vemos el sitio de acetilación, la Lisina 166. (25)

Los **triacilglicéridos** (TAG) tienden a empaquetarse entre sí repeliendo el agua del citosol, formando **gotas lipídicas** en el adipocito. En el núcleo de la gota se encuentran los TAG y ésteres de colesterol, rodeados por una monocapa de fosfolípidos. Además, llevan asociados diversas proteínas. Se puede decir que, en definitiva, una gota lipídica es un complejo de lípidos y proteínas.

Algunas de estas proteínas tienen actividad reguladora y otras tienen actividad catalítica, como es el caso de la **enzima monoacilglicerol lipasa (MGLL)**, la cual es muy específica para los monoacilglicéridos (MAG), y se encarga de degradarlos y liberar los ácidos grasos al exterior de la gota lipídica. Es una enzima que se localiza en el citosol y está activa de forma constitutiva.

Publicaciones de los últimos años han mostrado que esta lipasa tiene **mayores niveles de expresión** en aquellas **líneas tumorales que son más agresivas** y en tumores primarios de mama, ovario, melanoma, próstata y colorrectal. (26)(27) Por ello, la enzima MGLL es otra buena diana mediante la que atacar el cáncer.

Sobre esta enzima actúa el inhibidor **JZL184**, inhibiéndola de forma irreversible, impidiendo así que los MAG que haya en el interior de las gotas lipídicas salgan hacia el citosol, impidiendo que la célula pueda aprovechar los ácidos grasos en su metabolismo.

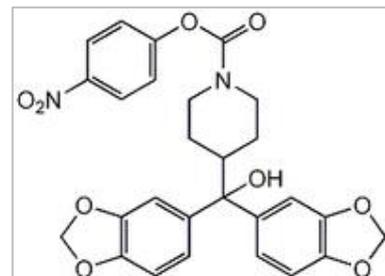
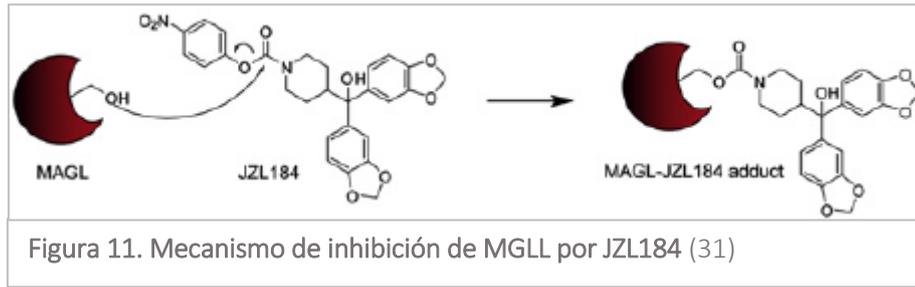


Figura 10. Inhibidor JZL184 (4-nitrophenyl-4-[bis(1,3-benzodioxol-5-yl) (hydroxy) methyl] piperidine-1-carboxylate) (30)

JZL184 lleva a cabo una **inhibición covalente**, vía carbamoilación, sobre la **serina 122 de la enzima MGLL**. (29)



### Tratamientos actuales

La mayoría de los tratamientos utilizados en este tipo de cáncer son poco específicos, puesto que se utilizan para todos los tipos de tumores: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Actualmente se están investigando nuevas combinaciones de medicamentos para la quimioterapia, nuevos métodos para extirpar el tumor y nuevos materiales para usar en radioterapia, todo ello para conseguir un menor daño y una mayor supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas. Tanto la radioterapia como la quimioterapia se utilizan como complemento a la cirugía, para asegurar la eliminación total de las células tumorales que no se hayan conseguido extirpar en la operación. (30) En los últimos años está empezando a cobrar importancia el uso de la **terapia dirigida**, la cual utiliza medicamentos más específicos consistentes en atacar a las células malignas sin afectar a las células sanas del paciente.

Algunas de estas terapias están dirigidas:

- Contra factores que favorecen la angiogénesis tumoral, dado que las células cancerígenas dependen de la formación de nuevos vasos sanguíneos para beneficiarse de los nutrientes y así favorecer su crecimiento.
- Contra el estroma tumoral que actúa como barrera impidiendo la correcta penetración de los medicamentos usados en quimioterapia.
- Contra las células madre del páncreas, pues serían aquellas a partir de las cuales el tumor se reproduce y aumenta su tamaño y diseminación.
- Por último, se usan inhibidores de los factores de crecimiento para evitar el crecimiento incontrolado que caracteriza a las células tumorales.

Todos estos posibles nuevos medicamentos se encuentran en estudios clínicos, a excepción de los últimos, puesto que ya hay algunos que han sido aprobados para el uso en seres humanos, como es el ejemplo de erlotinib, dirigido contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual se suministra en combinación con la gemcitabina, fármaco utilizado en quimioterapia, ya que es un análogo de la citosina que inhibe la síntesis de DNA y, por consiguiente, las células pierden su capacidad de división bloqueando la progresión tumoral. (31)

Debido al escaso número de tratamientos efectivos contra el cáncer de páncreas hay muchas líneas de investigación abiertas en la búsqueda de nuevos fármacos capaces de detener este tipo de tumores. Una de ellas es **la búsqueda de inhibidores del metabolismo de lípidos** como es el proyecto que se va a exponer en las siguientes páginas.

## OBJETIVOS

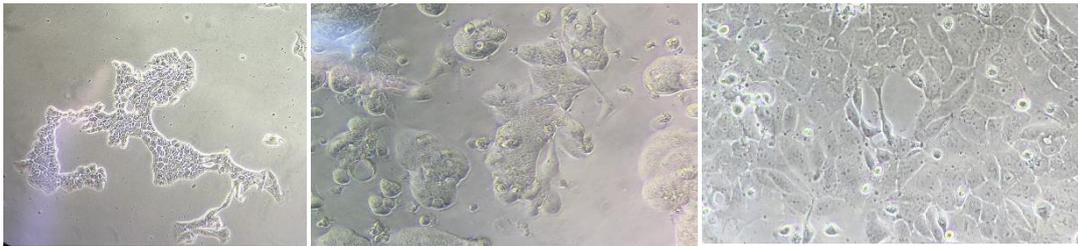
El objetivo principal de este proyecto es evaluar el efecto de los inhibidores SSO y JZL184 sobre tres cultivos primarios de pacientes con cáncer de páncreas. Para ello se van a llevar a cabo diferentes experimentos, con diferentes objetivos:

- Encontrar la concentración adecuada de cada inhibidor para que se observe un efecto sobre las células, pero sin que haya toxicidad excesiva o inespecífica.
- Evaluar la capacidad de autorenovación de las CSCs mediante distintas técnicas.
- Someter a las células a diferentes concentraciones de glucosa, para comprobar si a bajas concentraciones de glucosa las células hacen un mayor uso de los lípidos para completar su metabolismo, y para observar el efecto que ejerce sobre la acción de los inhibidores JZL184 y SSO.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se han utilizado tres cultivos primarios procedentes de pacientes de cáncer de páncreas:

- **253:** son las células menos metastásicas. Los clones suelen estar muy agrupados y son células poco migratorias.
- **354:** son las células más metastásicas. Además de los clones, aparecen muchas células solitarias porque se escapan de estos, ya que tienen mucha capacidad migratoria.
- **215:** son un nivel intermedio entre las 253 y las 354. Se observa que algunas de las células pretenden escaparse de los clones.



**Figura 12.** De izquierda a derecha observamos las células 253, 354 y 215. Las 354 están tratadas con una concentración de SSO de 100  $\mu$ M y las 215 con una concentración de JZL184 de 100  $\mu$ M. Las 253 no están tratadas. (Elaboración propia, laboratorio).

Los inhibidores usados son **SSO** (Cayman Chemical) y **JZL184** (Santa Cruz).

Ambos utilizan el mismo disolvente, el **DMSO** (Fisher BioReagents), el cual ya de por sí tiene efecto inhibitor sobre las células. Por tanto, cuando se realicen los experimentos con diferentes concentraciones de los inhibidores, tendremos que añadir en todos los pocillos la correspondiente cantidad de DMSO respecto a la máxima concentración de inhibidor usada en cada experimento, para que podamos comparar los resultados entre sí, puesto que, si en el control no añadimos DMSO, puede parecer que el inhibidor tiene mayor toxicidad de la que en realidad tiene y obtendríamos unos resultados erróneos.

Además, la concentración inicial a la que se encuentran los inhibidores, SSO y JZL184, es de 50 mM y 100 mM, respectivamente. Cuando se deseen utilizar concentraciones pequeñas de estos inhibidores en los experimentos tendremos que llevar a cabo una dilución intermedia, obteniendo stocks diferentes de los que coger inhibidor para hacer las diferentes condiciones.

Los medios utilizados son RPMI 1640 (Gibco) y DMEM/F12 (Gibco).

- **RPMI 1640:** Este medio tiene una composición de 12 mM de glucosa, al cual le añadimos externamente: un 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco)
- **DMEM/F12** (medio de esferas): Su composición es de 25 mM de glucosa (condiciones diabéticas) a la cual le añadimos 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, 2% de B27 (Gibco) 4 mg/ml de FGF (Preprotech), suplemento que le falta al B27 y es el factor de crecimiento de fibroblastos.

El **suero** posee muchos factores de transcripción y proteínas, como la albúmina que tiene muchos lípidos pegados a ella. Es decir, tiene una composición poco definida y, por lo tanto, difícil de controlar, lo cual podría afectar a nuestros resultados y a nuestras células. Por ello, en el segundo medio añadimos B27 como suplemento de sustitución al suero, permitiendo conocer exactamente la composición del medio de esferas.

Todos los experimentos llevan una preparación previa común. Se aspira el medio de los flask de los cultivos primarios 215, 253 y 354. Se lavan con 5 ml de PBS, y tras aspirarlo se añaden 4 mL de tripsina. Se deja incubar las células con tripsina unos 10-15 minutos en la estufa de 37°C, hasta que se observa que las células dejan de estar adheridas a la pared del flask. Para parar la tripsinización añadimos 8 ml de medio (RPMI). Pasamos la dilución adecuada, para cada línea, a un FALCOM y el resto se guarda en 15 ml de medio en los flask iniciales. Centrifugamos los FALCOM a 1200 rpm durante 5 minutos. Aspiramos el sobrenadante y resuspendemos el pellet en 1 mL de medio, para añadir, posteriormente, más medio si la concentración celular fuera muy alta. Contamos las células usando 10 µl del pellet resuspendido, mediante la cámara de Neubauer. Por último, realizamos los cálculos necesarios para saber el volumen de células que necesitamos.

### Ensayo de proliferación con dosimetría

Una vez hechos los cálculos, plaqueamos las células en cuatro placas de 96 pocillos, con **10.000 células por pocillo** en un volumen total de **200 µl por pocillo**. Incubamos las placas toda la noche en la estufa de 37°C para que las células se adhieran en el pocillo.

Al día siguiente, aspiramos el medio de cada pocillo y añadimos nuevo medio con y sin concentración de inhibidores. Como he explicado anteriormente, para las condiciones de inhibidor en las que la concentración es muy baja, tenemos que hacer una dilución intermedia previa tomando 1 µl del stock de 100 mM y 50 mM (de JZL184 y SSO, respectivamente) y añadirle 99 µl del medio a utilizar, obteniendo dos nuevas concentraciones de 1 mM y 0.5 mM de los inhibidores JZL184 y SSO, respectivamente.

- Control → 20 µl de DMSO
- 1 µM JZL184 (4 µl de 1 mM JZL184) + 20 µl DMSO
- 10 µM JZL184 (40 µl 1 mM JZL184) + 20 µl DMSO
- 100 µM JZL184 (4 µl 100 mM JZL184) + 16 µl DMSO
- 1 µM SSO (8 µl 0.5 mM SSO) + 20 µl DMSO
- 10 µM SSO (80 µl 0.5 mM SSO) + 20 µl DMSO
- 100 µM SSO (8 µl 50 mM SSO) + 12 µl DMSO
- 250 µM SSO (20 µl 50 mM SSO)

Tres de las cuatro placas de 96 pocillos que utilizamos en este experimento se activan añadiendo las diferentes condiciones (por triplicado) mencionadas arriba y se incuban en la estufa a 37°C.

La placa restante se incuba con cristal violeta (ACROS ORGANICS) durante 30 minutos, luego se lava y se deja secar durante uno o dos días. Esta placa será la correspondiente a las 0 horas. El resto de las placas se van a ir teñiendo a diferentes tiempos para hacer un seguimiento en el tiempo del efecto inhibitorio del SSO y el JZL184. Se teñirán a las 24 horas, a las 72 horas y a los

6 días de la activación. El CV es un colorante que tiñe proteínas permitiendo cuantificar el número de células viables que hay en un cultivo acumulándose en el citoplasma de estas.

Una vez tengamos todas las placas teñidas y secas, disolveremos los pocillos en una disolución de SDS al 1% y mediremos el resultado en un lector de placas a una absorbancia de 590 nm.

### Ensayo de formación de esferas tras tratamiento en adherencia

El objetivo de este experimento es estudiar la capacidad de los inhibidores para matar a las CSCs, ya que se trata con inhibidores antes de pasar a la placa de adherencia, no volviéndolos a utilizar.

Una vez hechos los cálculos, plaqueamos las células en tres placas de seis pocillos (una para cada tipo celular), con **250.000 células por pocillo** en un volumen total de **2 ml por pocillo**. Incubamos las placas toda la noche en la estufa de 37 °C para que las células se adhieran en el pocillo. El medio que utilizamos el primer día es RPMI.

Al día siguiente, aspiramos el medio de cada pocillo y añadimos medio de esferas con y sin concentración de inhibidores:

- Control (2 mL medio de esferas) + 10 µl DMSO.
- JZ 10 µM (20 µl 1 mM JZL184) + 2mL medio de esferas + 10 µl DMSO
- JZ 100 µM (2 µl 100 mM JZL184) + 2 mL medio de esferas + 8 µl DMSO
- SSO 100 µM (4 µl 50 mM SSO) + 2 mL medio de esferas + 6 µl DMSO
- SSO 250 µM (10 µl 50 mM SSO) + 2 mL medio de esferas

A los cuatro días, es decir, el viernes si empezamos el experimento en lunes, tripsinizamos y contamos.

Una vez contadas las células vamos a plaquearlas en dos placas de 24 pocillos, especiales para formar esferas (ultra baja adherencia), con **10.000 células por pocillo** en un volumen total de **1 ml por pocillo**. Hacemos los cálculos necesarios para plaquear el mismo número de células en todos los pocillos y así poder comparar los resultados. Una vez plaqueadas se incuban en la estufa a 37 °C.

Por último, a los siete días, es decir, el viernes siguiente, se sacan las placas de la estufa y se cuenta pocillo por pocillo el número de esferas que se han formado.

### Ensayo de formación de colonias (CFA)

Se lleva a cabo para estudiar la capacidad de los inhibidores para inhibir el crecimiento y para matar a las CSCs, ya que se utiliza medio con inhibidores durante todo el tratamiento.

Una vez hechos los cálculos, plaqueamos las células en tres placas de seis pocillos (una para cada tipo celular), con **500 células por pocillo** en un volumen total de **2 ml por pocillo**. Además, añadimos los inhibidores el primer día en medio RPMI.

- Control + 10 µl DMSO
- JZ 10 µM (20 µl 1 mM JZL184) + 10 µl DMSO
- JZ 100 µM (2 µl 100 mM JZL184) + 8 µl DMSO

- SSO 100  $\mu\text{M}$  (4  $\mu\text{l}$  50 mM SSO) + 6  $\mu\text{l}$  DMSO
- SSO 250  $\mu\text{M}$  (10 50 mM SSO)

Tras la activación de las células, incubamos las placas en la estufa de 37 °C. Este proceso lo repetimos dos semanas más, cambiando el medio a medio de esferas y añadiendo los inhibidores con una semana de diferencia respecto a la última activación. A la tercera semana aspiramos el medio de las células, lavamos con PBS y teñimos con cristal violeta, tal y como está explicado en el ensayo de proliferación con dosimetría.

Por último, tomamos fotos de las placas y contamos a ojo las esferas formadas. Tras esto, disolvemos los pocillos con una disolución de SDS al 1% y mediremos el resultado en un lector de placas a una absorbancia de 590 nm.

### Proliferación en distintas concentraciones de glucosa

En todos los experimentos estamos trabajando en condiciones diabéticas debido a la composición del medio de esferas (25 mM glucosa). En este experimento vamos a trabajar con diferentes concentraciones de glucosa para ver si las células tumorales en un medio pobre en glucosa utilizan más los lípidos. Vamos a utilizar tres concentraciones diferentes de glucosa:

- 25 mM, siendo una concentración de condiciones diabéticas.
- 5 mM, siendo la concentración de glucosa en sangre.
- 1 mM, siendo la concentración de glucosa que hay en un tumor.

Una vez hechos los cálculos, plaqueamos las células en cuatro placas de 96 pocillos, con **10.000 células por pocillo** en un volumen total de **200  $\mu\text{l}$  por pocillo**. Incubamos las placas toda la noche en la estufa de 37 °C para que las células se adhieran en el pocillo.

El segundo día activaremos el experimento, mediante la adición de los inhibidores y la glucosa. En este experimento tenemos que preparar un medio basal sin glucosa, que lleva DMEM, B27 al 2%, 2 mM de piruvato (Lonza) y 2 mM de glutamina (Lonza). Además, vamos a preparar todas las concentraciones, tanto de inhibidores como de glucosa, a 2x, porque en cada pocillo vamos a echar primero 100  $\mu\text{l}$  de glucosa y luego otros 100  $\mu\text{l}$  de los inhibidores.

Las condiciones que vamos a utilizar son las siguientes:

- 25 mM glucosa
- 5 mM glucosa
- 1 mM glucosa
- JZ 100  $\mu\text{M}$  + 25 mM glucosa
- JZ 100  $\mu\text{M}$  + 5 mM glucosa
- JZ 100  $\mu\text{M}$  + 1 mM glucosa
- JZ 100  $\mu\text{M}$  + 1 mM glucosa
- SSO 100  $\mu\text{M}$  + 25 mM glucosa
- SSO 100  $\mu\text{M}$  + 5 mM glucosa
- SSO 100  $\mu\text{M}$  + 1 mM glucosa

Tres de las cuatro placas de 96 pocillos que utilizamos en este experimento se activan añadiendo las diferentes condiciones (por triplicado) mencionadas arriba y se incuban en la estufa a 37 °C.

El procedimiento final se lleva a cabo igual que como está explicado en el experimento de dosimetría.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ensayo de proliferación con dosimetría

En este primer experimento testamos diferentes concentraciones de los inhibidores, sobre los tres cultivos primarios con los que trabajamos. El objetivo de dicho experimento estaba encaminado al conocimiento de qué concentraciones deberemos trabajar a lo largo del proyecto para conseguir observar un efecto terapéutico, si lo hay, sobre las células de cáncer de páncreas, sin que llegue a producir un efecto de excesiva toxicidad, ya que en ese caso no podríamos asegurar que solo fueran a afectar a las células de cáncer de páncreas y no también a las células sanas de los pacientes, además de no observar una acción progresiva sobre las células tumorales.

Los datos de 24 horas no tienen una diferencia significativa respecto a la placa de 0 horas, por tanto, no la tendremos en cuenta a la hora de analizar los resultados, además, solo medimos ese tiempo en el primer experimento porque ya nos dimos cuenta de que no aumentaba demasiado la proliferación respecto al control.

Observamos que, en todas las gráficas, en mayor o menor medida, siempre hay un aumento de proliferación, tanto a 72 horas como a 6 días, lo cual indica que las células continúan creciendo a pesar de estar expuestas a los inhibidores.

En el caso del cultivo primario **215**, observamos que el SSO (figura 13.A.Izq.) no afecta a su crecimiento, puesto que como se observa en la gráfica, a 6 días, todas las concentraciones con inhibidor tienen mayor proliferación que la del control (DMSO), resultados contrarios a los esperados. En el caso del JZL184 (figura 13.A.Dcha.) sí que se ha obtenido un resultado más semejante a lo esperado, puesto que, tanto a 72 horas como a 6 días, las células con inhibidor tienen un menor crecimiento que el control, e incluso en el caso de 1  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ , hay una gran caída del crecimiento, lo cual no implica necesariamente que el inhibidor provoque la muerte de las células, ya que si así fuera veríamos menos células que a tiempo 0.

En el caso del cultivo primario **354**, observamos un resultado parecido a las 215 en el caso del SSO (figura 13.C.Izq.), ya que todas las condiciones con inhibidor tienen mayor proliferación a 6 días que la situación control, lo cual quiere decir que el SSO no afectaría tampoco al crecimiento de las células 354. En cuanto al JZL184 (figura 13.C.Dcha.), tanto a 1  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ , se observa una proliferación mayor que el control a 6 días, mientras que a una concentración de 100  $\mu\text{m}$  se observa la misma proliferación, aunque la barra de error indica que hay valores que también se encuentran por encima del control. Sin embargo, en el tiempo de 72 horas sí se aprecia una disminución de la proliferación en las condiciones con inhibidores respecto a la situación control.

En el caso del cultivo primario **253**, solo tenemos datos de un experimento dado que se produjo una contaminación en el laboratorio y se trata de células que tardan mucho en crecer. Por consiguiente, no se pudo repetir este experimento con ellas. Con los datos de que disponemos podríamos afirmar que en el caso del SSO (figura 13.B.Izq.) sí se ve una menor proliferación a concentraciones de 100  $\mu\text{m}$  y 250  $\mu\text{m}$ , y en el caso del JZL184 (figura 13.B.Dcha.) a concentraciones de 10  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ .

Por lo tanto, podríamos decir que el inhibidor SSO (figura 13.A.B.C.Izq.) tiene poco efecto en todas las células, salvo en las 253, cuyas máximas concentraciones provocan un descenso en la proliferación de las células. En el caso del inhibidor JZL184 (figura 13.A.B.C.Dcha.), sí se aprecia un mayor efecto en las células 215 y 253, y uno menor en las 354.

Las concentraciones que vamos a utilizar en el resto de los experimentos para el SSO son 100 y 250  $\mu\text{m}$  y para el JZL184 son 10 y 100  $\mu\text{m}$ .

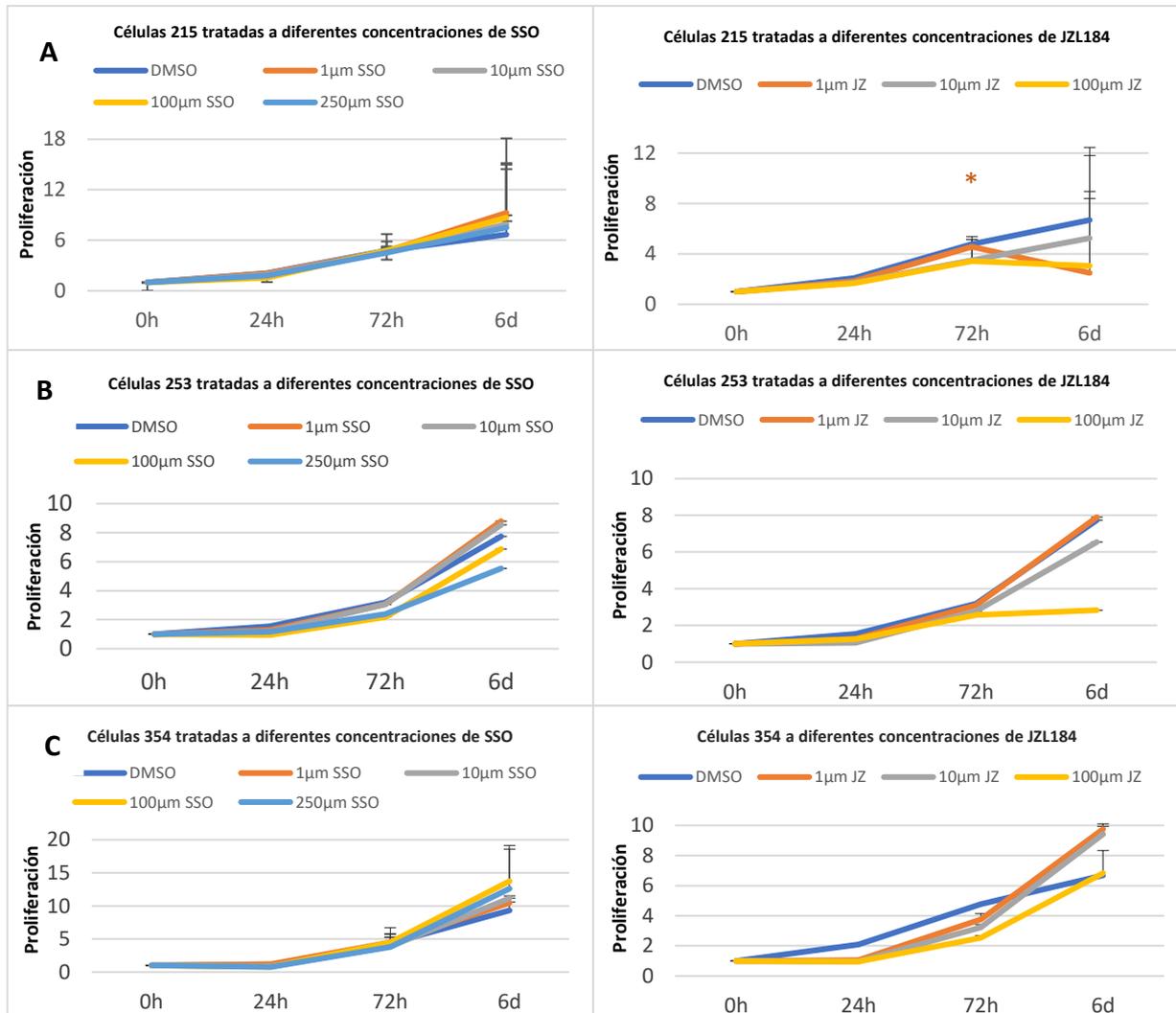


Figura 13. Tratamiento de los tres cultivos primarios con diferentes concentraciones de los inhibidores, SSO y JZL184

Las lecturas de absorbancia se normalizaron dividiendo entre las lecturas obtenidas a 0 horas. A 0 horas siempre obtendremos una tasa de proliferación de 1. Las barras de error se han obtenido haciendo la desviación estándar de la media. Este experimento fue repetido tres veces para obtener resultados más fiables, salvo en el caso de las 253.

**A.** Gráficas de las células 215, tratadas a la izquierda con SSO y a la derecha con JZL184. **B.** Gráficas de las células 253, tratadas a la izquierda con SSO y a la derecha con JZL184. **C.** Gráficas de las células 354, tratadas a la izquierda con SSO y a la derecha con JZL184.

\* $p < 0.05$ . Datos diferentes significativamente tras aplicar el test T de Student. Color corresponde a la concentración de inhibidor.

## Ensayo de formación de esferas tras tratamiento en adherencia y ensayo de formación de colonias (CFA)

Ambos experimentos se llevan a cabo con el propósito de estudiar el crecimiento de las células madre tumorales. Para ello, evaluamos la capacidad de las CSCs de crecer en un medio sometido a diferentes concentraciones de inhibidores. En el caso del ensayo de formación de esferas tras tratamiento en adherencia, como está explicado previamente en materiales y métodos, tratamos las células con los inhibidores antes de cambiarlas a la placa de ultra baja adherencia. En este caso observamos si a diferentes concentraciones de inhibidores se ha producido un descenso en el número de CSCs, mientras que en el caso del CFA el tratamiento con inhibidores está continuamente en el medio, por lo que, inhibe tanto la muerte de las CSCs como la inhibición de su crecimiento, al tener una acción continuada sobre las células.

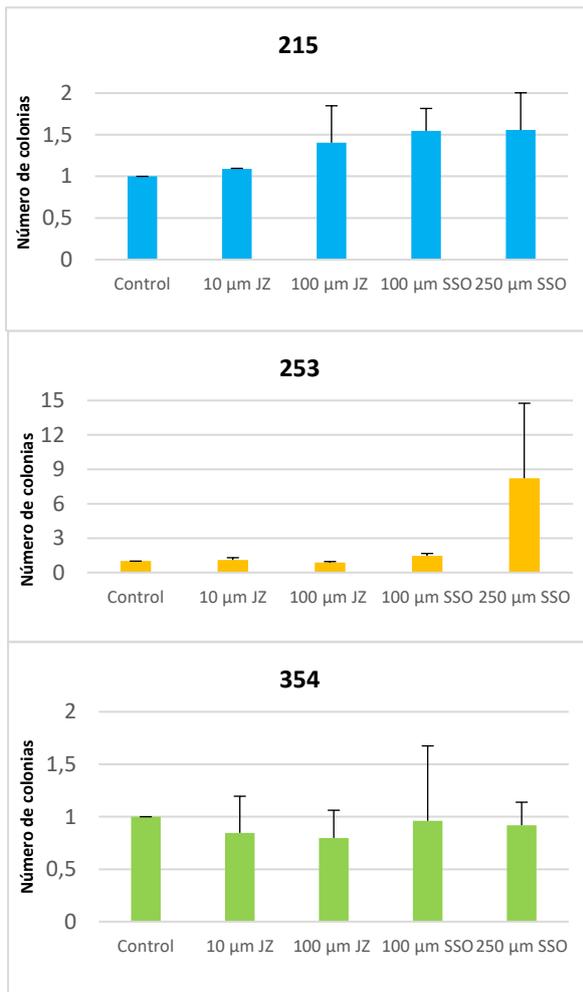


Figura 14. Resultados obtenidos del experimento ensayo de formación de esferas tras tratamiento en adherencia

Los tres cultivos primarios fueron tratados con diferentes concentraciones de inhibidores durante dos semanas. El conteo de las esferas se hizo a ojo. Este experimento se llevó a cabo dos veces. Las barras de error se han obtenido haciendo la desviación estándar de la media.

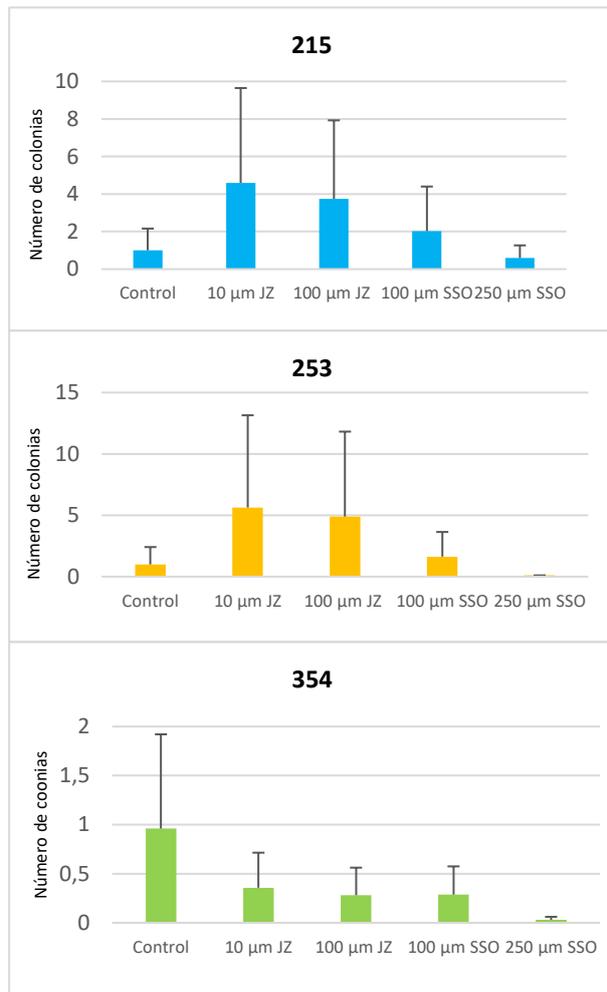
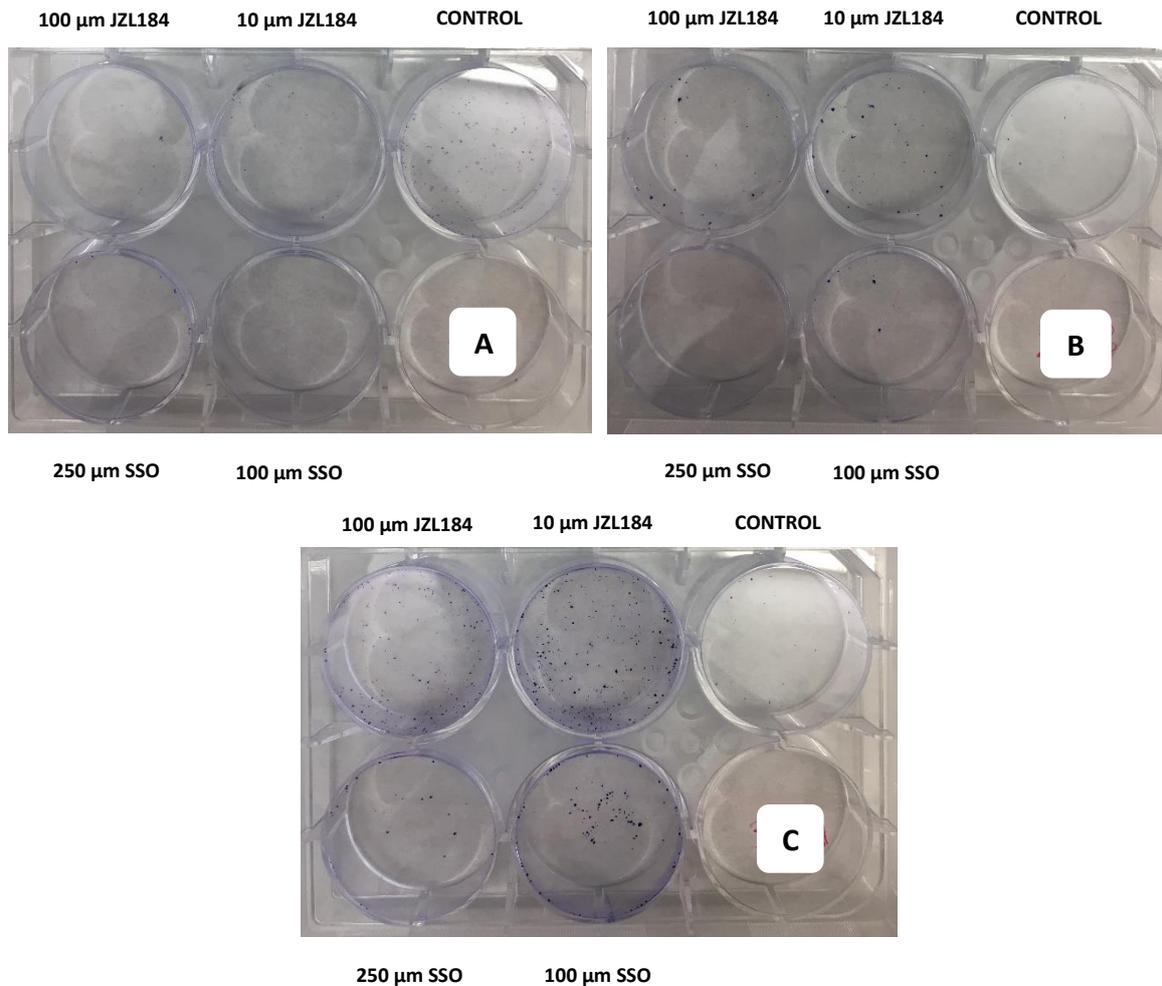


Figura 15. Resultados obtenidos del experimento CFA

Los tres cultivos primarios fueron tratados con diferentes concentraciones de inhibidores durante tres semanas. El conteo de las colonias se hizo a ojo. Este experimento se llevó a cabo tres veces, salvo en el caso de las 253, que solo se hicieron dos experimentos. Las barras de error se han obtenido haciendo la desviación estándar de la media.



**Figura 16. Resultados obtenidos del primer experimento de CFA (Elaboración propia, laboratorio)**

Las células 215 (A), 253 (B) y 354 (C) fueron tratadas con diferentes concentraciones de los inhibidores JZL184 y SSO, indicadas en la imagen, durante tres semanas. Para observar las colonias obtenidas se utilizó el colorante cristal violeta.

Una vez terminado el experimento contamos a ojo las esferas y colonias de CSCs obtenidas y en el caso del CFA también las teñimos con cristal violeta y las leemos en el lector de placas.

Sabemos que solo las células madre tumorales son capaces de crecer en estos experimentos, puesto que son capaces de dividirse sin la necesidad de estar adheridas a un sólido, ni estar pegadas a otras células. Si el inhibidor ha hecho efecto sobre las CSCs, al pasarlas a la placa de ultra baja adherencia crecerán menor número de esferas o colonias que las que teníamos inicialmente (control). Esto sería lo ideal ya que indicaría que nuestra droga mata las células madre tumorales y, por tanto, podríamos conseguir parar la proliferación tumoral y luego con quimio eliminar las células diferenciadas que queden en el organismo, que al no ser células madre tumorales no podrían migrar ni producir metástasis en el paciente.

En el caso del experimento de **esferas** (figura 14), observaremos que, en el caso de las células 215, en todas las condiciones aumenta el número de esferas respecto al control. En el caso de las células 253, se observa claramente un aumento muy significativo del número de esferas a una concentración de 250 μm de SSO y solo un pequeño descenso a una concentración de 100 μm de

JZL184. Y, por último, en el caso de las células 354 no hay un aumento del número de esferas en ninguna de las condiciones con inhibidor, habiendo un mayor descenso en el caso del inhibidor JZL184.

En cuanto al experimento de **CFA** (figura 15), vemos que tanto en las células 215 como 253, se produce un aumento del número de colonias en el caso del inhibidor JZL184, al igual que en el caso de la concentración más baja del SSO, pero un ligero descenso en la situación de la concentración 250  $\mu\text{m}$  de SSO. En el caso de las células 354, en todas las condiciones con inhibidor se observa un descenso claro del número de colonias.

El resultado que se esperaba obtener era un descenso del número de colonias en presencia de los inhibidores, puesto que significaría que estos matan e inhiben el crecimiento de las CSCs y que, por tanto, podrían ser utilizados como fármacos para tratar el cáncer.

En el caso del cultivo primario **215** (figura 14 y 15), en ambos experimentos hay un aumento de colonias en las condiciones sometidas al inhibidor JZL184 y en la concentración más pequeña utilizada del inhibidor SSO. Sin embargo, en el caso de la concentración de 250  $\mu\text{m}$  de SSO, en el experimento de formación de esferas tras tratamiento en adherencia hay un aumento del número de esferas y en el CFA hay un descenso.

En el caso del cultivo primario de **253** (figura 14 y 15), en ambos experimentos hay un aumento del número de colonias en las concentraciones de 10  $\mu\text{m}$  del inhibidor JZL184 y 100  $\mu\text{m}$  de SSO. Sin embargo, en el caso de las otras dos condiciones, se obtienen resultados contrapuestos, ya que en el experimento de formación de esferas tras tratamiento en adherencia hay un aumento del número de esferas a 250  $\mu\text{m}$  SSO y un descenso en 100  $\mu\text{m}$  de JZL184, mientras que en el caso del experimento CFA es al revés.

A diferencia de lo que cabría esperar, lo que observamos en el caso de los cultivos primarios 215 y 253, es que, en la mayoría de los casos, hay un aumento de colonias respecto al control, lo cual indica que los inhibidores no parecen tener un gran efecto sobre las células. Ello puede deberse a que dichas células tumorales son capaces de adaptarse a estos inhibidores y a la falta de lípidos y desencadenar otras rutas para la obtención de energía y nutrientes.

Además, los resultados contrapuestos que obtenemos en estos dos cultivos primarios siempre son las condiciones de mayor concentración de inhibidor (250  $\mu\text{m}$  de SSO en 215, 100  $\mu\text{m}$  de JZL184 y 250  $\mu\text{m}$  de SSO en 253), lo cual puede indicar que estos inhibidores tienen cierto efecto sobre las células y que el tiempo del experimento, la manipulación, los medios u otros errores de trabajo pueden afectar al efecto final de los inhibidores sobre las células y dar, así, estos resultados opuestos. Para comprobar si estamos en presencia de algún error de experimentación habría que repetir los experimentos.

En el caso del cultivo primario **354** (figura 14 y 15) se puede observar en ambos experimentos que hay un descenso del número de colonias respecto al control. En consecuencia, podríamos afirmar que sobre estas células los inhibidores sí afectan al crecimiento de las células madre tumorales, inhibiéndolas. Vemos que en el caso del CFA el descenso del número de colonias es mayor que el que se observa en el de esferas. Ello se debe a que, en el caso del CFA, hay una doble acción debido a que los inhibidores están presentes en el medio durante todo el tiempo

que dura el experimento y afecta tanto al número de CSCs que sobreviven como a la inhibición de su crecimiento.

### **Proliferación en distintas concentraciones de glucosa**

Este experimento se llevó a cabo para comprobar si cambiando el ambiente metabólico de las células se podía afectar a la inhibición que llevan a cabo el SSO y el JZL184 sobre las células del cáncer de páncreas. Las células 215, 253 y 354 fueron incubadas en medios con concentraciones diferentes de glucosa y medido su efecto a 24 horas, 72 horas y 6 días.

Todos los experimentos anteriores se han hecho en unas condiciones diabéticas puesto que los medios utilizados tenían una concentración alta de glucosa y este experimento se lleva a cabo para observar que ocurre con las células y con los inhibidores en presencia de distintas concentraciones de glucosa. Para ello utilizaremos una concentración de 25 mM que representa condiciones diabéticas, una concentración de 5 mM que representa la fisiológica y una concentración de 1 mM que representa la concentración que hay en los tumores.

En el caso de las células **215**, podemos observar la misma tendencia tanto con el inhibidor SSO (figura 17.A.Dcha.) como con el JZL184 (figura 17.A.lzq). Observamos que tanto las células diferenciadas como las células madre tumorales tienen una mayor proliferación en unas condiciones de 25 mM de glucosa y una menor proliferación a 1 mM de glucosa, lo cual tiene sentido ya que tienen menos glucosa a partir de la cual obtener sus nutrientes. Si comparamos el efecto sobre estas células al añadir los inhibidores vemos que no se observa apenas ningún cambio, lo cual indica que estos inhibidores en presencia de glucosa no parecen tener efecto alguno en la inhibición del crecimiento de las células tumorales.

En el caso de las células **253**, solo pudimos obtener datos de un experimento a tiempo 6 días debido a que, como ya he comentado antes, hubo incidencias de contaminaciones. De todas formas, lo que parece deducirse en este caso es que la menor proliferación de células sigue siendo a una concentración de 1 mM de glucosa y la máxima no está tan claro como en el caso anterior. De hecho, parece que hay una mayor proliferación de las células tumorales cuando añadimos inhibidor, tanto el JZL184 (figura 17.B.lzq.) como el SSO (figura 17.B.Dcha.), en el caso de las concentraciones 25 mM y 5 mM de glucosa. Por ello, parece que sobre este cultivo celular los inhibidores tampoco hacen el efecto que buscábamos en un principio, pero deberían desarrollarse más experimentaciones puesto no podemos extraer conclusiones a priori basándonos en los datos de un solo experimento.

Por último, en el caso de las células **354**, observamos la misma tendencia que en las células 215 para el inhibidor JZL184, siendo la mayor proliferación de células a 25 mM de glucosa y la mínima a 1 mM de glucosa. Además, vemos también que cuando se añade el inhibidor JZL184 (figura 17.C.lzq.) apenas hay una disminución significativa del crecimiento celular. En el caso del inhibidor SSO (figura 17.C.Dcha), observamos la misma tendencia que en el cultivo primario 253, puesto que advertimos que hay mayor proliferación en presencia del inhibidor a 25 y 5 mM de glucosa, lo cual sigue sin ser el resultado que se buscaba inicialmente. Además, tampoco se aprecia una diferencia de crecimiento con y sin inhibidor en el caso de la concentración de 1 mM de glucosa.

De estos datos se puede concluir que no se observa diferencias entre la exposición a los inhibidores y su no exposición, en la proliferación de las células madre tumorales y las células diferenciadas que forman parte de los tres cultivos primarios utilizadas en este proyecto.

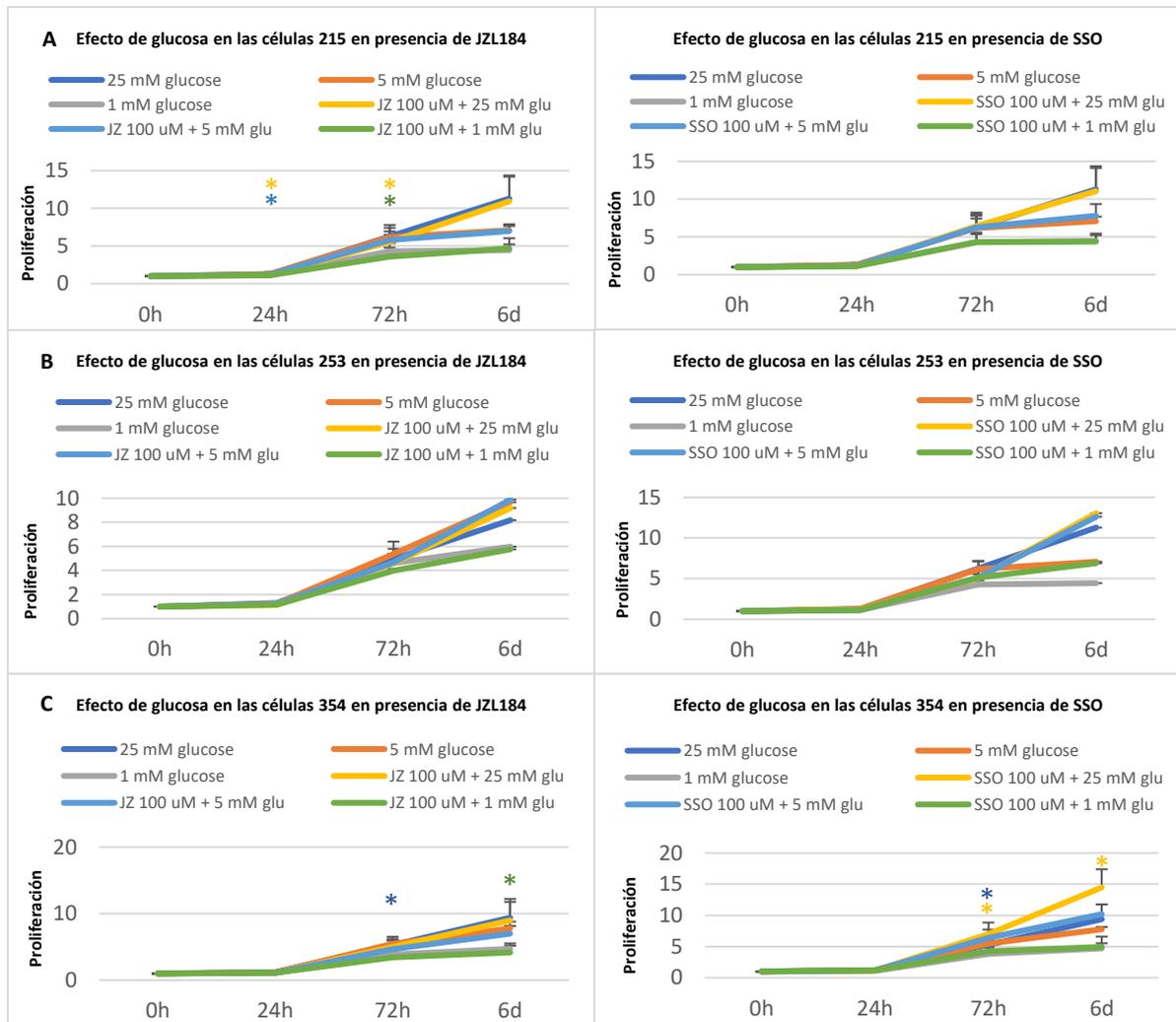


Figura 17. Resultados obtenidos de la proliferación a diferentes concentraciones de glucosa

Los tres cultivos primarios fueron tratados con distintas concentraciones de glucosa y una concentración de 100  $\mu$ M del inhibidor correspondiente en cada caso. Las lecturas de absorbancia se normalizaron dividiendo entre las lecturas obtenidas a 0 horas. A 0 horas siempre obtendremos una tasa de proliferación de 1. Solamente obtuvimos una medida de las 253 a un tiempo de 6 días.

**A.** Gráficas de las células 215, tratadas a la izquierda con JZL184 y a la derecha con SSO. **B.** Gráficas de las células 253, tratadas a la izquierda con JZL184 y a la derecha con SSO. **C.** Gráficas de las células 354, tratadas a la izquierda con JZL184 y a la derecha con SSO.

\* $p < 0.05$ . Datos diferentes significativamente tras aplicar el test T de Student. Color corresponde con la concentración de inhibidor.

## CONCLUSIONES

Las concentraciones que usamos en todos los experimentos son para el SSO 100 y 250  $\mu\text{M}$  y para el JZL184 son 10 y 100  $\mu\text{M}$ , ya que en el experimento de proliferación parecieron ser los que mejor efecto tenían sobre los tres cultivos primarios utilizadas.

En el caso de los cultivos primarios 215 y 253 se observa aumento de proliferación de las células tratadas con inhibidores, salvo en un par de condiciones. Mientras que en el caso de las 354, tanto en los experimentos CFA (figura 15) como el de formación de esferas tras ser sometidas a adherencia (figura 14), se observa un descenso en la proliferación.

En el caso del experimento de **proliferación en distintas concentraciones de glucosa** (figura 17), en los tres cultivos celulares hay menor proliferación de células a una concentración de 1 mM de glucosa y una mayor proliferación a 25 mM. Sin embargo, ninguno de los casos parece indicar que los inhibidores tengan un efecto terapéutico sobre las células, ya que en el caso de las 215 no se observa ninguna diferencia en las condiciones con inhibidor y en el caso de las 253 y 354 aparece un aumento de la proliferación cuando hay presencia de inhibidores respecto a las situaciones control dónde solo se tratan las células con glucosa.

Los resultados obtenidos parecen indicar que los inhibidores no tienen un efecto significativo sobre las células. El poco efecto que observamos puede deberse a que las células tumorales son capaces de adaptarse a la falta de lípidos y, por tanto, desencadenen otras rutas alternativas para mantenerse con vida dejando de necesitar el aporte lipídico para conseguir su energía y nutrientes.

Todos estos experimentos parecen indicar que **nuestros inhibidores no son adecuados** para su uso en las células **215 y 253**, son recomendables posteriores experimentaciones para una completa verificación. Puesto que, las **células 354**, en el caso del experimento de **CFA** (figura 15) y **formación de esferas tras ser sometidas a adherencia** (figura 14) parece que hay **un descenso en el crecimiento de CSCs**, sin embargo, en el resto de los cultivos primarios y experimentos no se ha visto ninguna mejora en las condiciones con inhibidores respecto al control.

Hay dos datos importantes que parecen estar muy relacionados según los resultados obtenidos: que el **receptor CD36** es un factor importante para la **capacidad metastásica** de las células tumorales y que las células 354 son, de los tres tipos de células con las que hemos trabajado, las más metastásicas. Las células **354** son las únicas que parecen tener **un resultado positivo** en los experimentos, al observarse un descenso en el número y crecimiento de las CSCs. Esto podría deberse a que al ser las más metastásicas, posean mayor número de receptores CD36 contra los cuales el inhibidor SSO se dirige.

Si quisiéramos continuar con esta línea de investigación en un **futuro** se podrían realizar ensayos para comprobar que hay más receptores CD36 en las células 354 y **añadir** en los ensayos **otros cultivos primarios de células más metastásicas** como las 354, con el fin de comprobar si estos inhibidores funcionan mejor sobre las células metastásicas y por eso parecen tener un mayor efecto en las 354, ya que puede ser que el **metabolismo lipídico sea más importante para las células con una mayor capacidad metastásica** que para las que son menos metastásicas, como las 215 y 253.

## CONCLUSIONS

The concentrations used in the experiments were 100 and 250  $\mu\text{M}$  for SSO and 10 and 100  $\mu\text{M}$  for JZL184. These concentrations were, apparently, those with the best effect on the three primary cultures used.

In primary cultures 215 and 253, an increase in the proliferation of cells treated with inhibitors was observed, except under a couple of conditions. In 354 cells, in both CFA (figure 15) and sphere formation experiment after treatment in adherence (figure 14), a decrease in proliferation was observed.

In the proliferation with various concentrations of glucose experiment (figure 17), the three primary cultures showed low proliferation at 1mM glucose concentration, but higher proliferation at 25 mM. Yet, neither condition apparently showed a therapeutic effect on the cells, given that in 215 cells no difference was observed, and in cases 253 and 354 there is an increase in proliferation with the inhibitors in comparison to the control conditions, where cells are only treated with glucose.

Results presumptively indicate that inhibitors do not have remarkable effects on the cells. The minimum observed effect might be due to the ability of tumor cells to adapt to a lack of lipids and, in sum, to trigger new alternative ways of surviving without lipids intake, which usually provide them with energy and nutrients.

All these experiments apparently showed that our inhibitors are not adequate for use in cells 215 and 253, but further research is strongly suggested to confirm these results. No improvement has been observed in the primary cultures and experiments in relation to control conditions, except for 354 cells in CFA (figure 15) and spheres formation after treatment in adherence experiments (figure 14), where it seems to be a decrease in the growth of CSCs.

Two important aspects can be highlighted in relation to our results: receptor CD36 is an important factor to the metastatic malignancy of the tumor cells and the 354 cells are the most malignant among those analyzed. These cells are the only ones that apparently showed a positive result in the experiments, after a decrease in number and entity of the CSCs. This could be explained by a greater presence of the CD36 receptor, targeted by SSO.

Further research should assess the presence of receptors CD36 in cells 354 and other primary cultures of malignant cells like 354, in order to test whether these inhibitors work better against metastatic cells, and thus, if this is the cause of a greater effect in cells 354. Their lipid metabolism could be the cause of this higher capacity, in comparison to cells 215 and 253, because it can be more important for metastatic cells.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Instituto nacional del cáncer. Tratamiento del cáncer de páncreas [Internet]. p. 5. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol>
2. Instituto nacionales de la salud. Cáncer pancreático [Internet]. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000236.htm>
3. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Cáncer de páncreas: Estadísticas [Internet]. Available from: <https://www.cancer.net/es>
4. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell [Internet]. 2000;100(1):57–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>
5. Sabbath KD, Ball ED, Larcom P, Davis RB, Griffin JD. Heterogeneity of clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. J Clin Invest [Internet]. 1985;75(2):746–53. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=423572&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
6. Nowell P. The clonal evolution of tumor cell populations. Science (80- ). 1976;194(4260):23–8.
7. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. Cell. 2009;138(5):822–9.
8. Swanton C. Intratumor heterogeneity: Evolution through space and time. Cancer Res. 2012;72(19):4875–82.
9. Corbin M, Morrison S. Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity. Nature. 2013;501(7467):328–37.
10. Lonardo E, Hermann PC, Heeschen C. Pancreatic cancer stem cells - update and future perspectives. Mol Oncol. 2010;4(5):431–42.
11. Stem Cells Transplant Institute. ¿Qué son las células madre? [Internet]. Available from: <https://stemcellstransplantinstitute.com/que-son-las-celulas-madre/>
12. Schatton T, Frank NY, Frank MH. Identification and targeting of cancer stem cells. Bioassays. 2010;31(10):1038–49.
13. Célula madre cancerosa [Internet]. 2018. Available from: <https://es.wikipedia.org/>
14. White E. Exploiting the bad eating habits of Ras-driven cancers. Genes Dev. 2013;27(19):2065–71.
15. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. Nat Rev Cancer. 2011;85–95.
16. Guillaumond F, Bidaut G, Ouaiissi M, Servais S, Gouirand V, Olivares O, et al. Cholesterol uptake disruption, in association with chemotherapy, is a promising combined metabolic therapy for pancreatic adenocarcinoma. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2015;112(8):2473–8. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1421601112>
17. Swierczynski J, Hebanowska A, Sledzinski T. Role of abnormal lipid metabolism in development, progression, diagnosis and therapy of pancreatic cancer. World J Gastroenterol. 2014;20(9):2279–303.

18. Pan J-J, Yang M-H. The role of epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *J Gastrointest Oncol* [Internet]. 2011;2(3):151–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22811845><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3397615>
19. Nath A, Chan C. Genetic alterations in fatty acid transport and metabolism genes are associated with metastatic progression and poor prognosis of human cancers. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(August 2015):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep18669>
20. Sancho P, Barneda D, Heeschen C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br J Cancer* [Internet]. 2016;114(12):1305–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2016.152>
21. Sancho P, Burgos-Ramos E, Tavera A, Bou Kheir T, Jagust P, Schoenhals M, et al. MYC/PGC-1 $\alpha$  balance determines the metabolic phenotype and plasticity of pancreatic cancer stem cells. *Cell Metab*. 2015;22(4):590–605.
22. Pascual G, Avgustinova A, Mejetta S, Martín M, Castellanos A, Attolini C, et al. Targeting metastasis - initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*. 2016;541(7635):41–5.
23. Yanina Pepino M, Kuda O, Samovski D, A Abumrad N. Structure- Function of CD36 and Importance of Fatty Acid Signal Transduction in Fat Metabolism. *NIH*. 2014;34:281–303.
24. Sulfosuccinimidyl Oleate (sodium salt) [Internet]. Available from: <https://www.caymanchem.com/product/11211>
25. Kuda O, Pietka TA, Demianova Z, Kudova E, Cvacka J, Kopecky J, et al. Sulfo-N-succinimidyl oleate (SSO) inhibits fatty acid uptake and signaling for intracellular calcium via binding CD36 lysine 164: SSO also inhibits oxidized low density lipoprotein uptake by macrophages. *J Biol Chem*. 2013;288(22):15547–55.
26. Ma M, Bai J, Ling Y, Chang W, Xie G, Li R, et al. Monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 regulates apoptosis and migration of colorectal cancer cells. *Mol Med Rep*. 2016;13(3):2850–6.
27. Nomura DK, Long JZ, Niessen S, Hoover HS, Ng SW, Cravatt BF. Monoacylglycerol Lipase Regulates a Fatty Acid Network that Promotes Cancer Pathogenesis. *Cell* [Internet]. 2010;140(1):49–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.027>
28. MAGL Inhibitor III, JZL 184 [Internet]. Available from: [http://www.merckmillipore.com/ES/es/product/MAGL-Inhibitor-III-JZL184-CAS-1101854-58-3-Calbiochem,EMD\\_BIO-475741](http://www.merckmillipore.com/ES/es/product/MAGL-Inhibitor-III-JZL184-CAS-1101854-58-3-Calbiochem,EMD_BIO-475741)
29. Long JZ, Nomura DK, Cravatt BF. Characterization of Monoacylglycerol Lipase Inhibition Reveals Differences in Central and Peripheral Endocannabinoid Metabolism. *Chem Biol* [Internet]. 2009;16(7):744–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.05.009>
30. Maraculla T. Cáncer de páncreas [Internet]. Available from: <https://cuidateplus.marca.com/enfermedades/cancer/cancer-de-pancreas.html>
31. American Cancer Society. ¿Qué avances hay en la investigación del cáncer de páncreas? [Internet]. p. 5. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-pancreas/acerca/nuevas-investigaciones.html>