



**Universidad**  
Zaragoza



**Facultad de Ciencias**  
**Universidad Zaragoza**

# Desarrollo de un modelo in vitro para angiogénesis en cáncer de páncreas

## **TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

Autora: Laura Ruiz de Alarcón Comenge

Directores: Patricia Sancho Andrés y Ángel Luis García Otín

Ponente: M<sup>a</sup> Pilar Mozas Alonso

Curso 2020/2021

*Hospital Universitario Miguel Servet*

*Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón*

*Unidad de Investigación Traslacional*



## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN/ABSTRACT</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
2.1.    Cáncer de páncreas	2
2.2.    Microambiente tumoral	3
2.3.    Procesos angiogénicos en el microambiente tumoral	4
2.4.    Células progenitoras endoteliales	7
<b>3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>9</b>
4.1.    Material biológico	9
4.2.    Mantenimiento	10
4.3.    Ensayo de proliferación celular	11
4.4.    Ensayo de formación de esferas de líneas tumorales pancreáticas	12
4.5.    Ensayo de curva de crecimiento de células endoteliales	13
4.6.    Ensayo de viabilidad de líneas progenitoras endoteliales tipo ECFC	14
4.7.    Ensayo de angiogénesis de líneas progenitoras endoteliales	14
4.8.    Estadística	15
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>15</b>
5.1.    Ensayo de proliferación celular de líneas tumorales pancreáticas	15
5.1.1.  Ensayo de viabilidad celular de MiaPaca y Bxpc3	15
5.1.2.  Ensayo de la proliferación celular de MiaPaca y Bxpc3	17
5.2.    Curva de crecimiento de líneas progenitoras endoteliales	20
5.3.    Ensayo de formación de esferas en la línea Bxpc3	20
5.4.    Ensayo de viabilidad de líneas progenitoras endoteliales	21
5.5.    Ensayo de angiogénesis de células endoteliales	22
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
<b>7. CONCLUSIONES/CONCLUSSIONS</b>	<b>25</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>26</b>

## **1. RESUMEN**

El cáncer de páncreas es una de las enfermedades tumorales más agresivas en todo el mundo, y a pesar de no tener una de las incidencias más grandes en la población, su mortalidad es altamente elevada, dejando la tasa de supervivencia a 5 años en un 7% de los diagnosticados. Se trata de una enfermedad a día de hoy incurable debido a su quimioresistencia y a la falta de terapias efectivas, además de que este permanece asintomático hasta que alcanza un estadio avanzado y metastásico.

El crecimiento tumoral invasivo y el desarrollo metastásico requieren de un proceso denominado angiogénesis, imprescindible en el cáncer, en el que se da un crecimiento y proliferación de vasos sanguíneos nuevos que penetran en los tumores, ayudándoles así a crecer gracias a su aporte de oxígeno y nutrientes. La angiogénesis alterada característica de este cáncer, viene acompañada de una elevada densidad de microvasos sanguíneos de baja integridad y capacidad de perfusión, lo que se relaciona con mal pronóstico de los pacientes. Por tanto, es por esto por lo que la terapia anti-angiogénica puede impulsar hacia delante nuevas opciones de tratamiento.

Conocer los mecanismos de comunicación entre células tumorales y las células encargadas del proceso de angiogénesis es esencial para diseñar estrategias terapéuticas efectivas teniendo en cuenta el microambiente tumoral. En este Trabajo de Fin de Grado se ha buscado encontrar unas condiciones óptimas en las cuales podría realizarse un co-cultivo de células tumorales pancreáticas y de células progenitoras endoteliales tipo ECFC, utilizadas como modelo de células angiogénicamente activas, para poder estudiar como ocurren los procesos angiogénicos y como se podría actuar sobre ellos. Para lograr este co-cultivo se ha visto que, aunque los factores secretados por una línea celular no tengan un efecto negativo muy significativo sobre la proliferación de la otra línea, sí que pueden influir sobre los procesos angiogénicos de las células endoteliales. En este contexto, realizar un co-cultivo con MiaPaca y células de adulto BH20 podría resultar de interés, dado que parece ser la única situación en la que no se aprecia una inhibición o modulación de la angiogénesis.

## **ABSTRACT**

Pancreatic cancer is one of the most aggressive tumor diseases worldwide, and despite not having one of the highest incidences in the population, its mortality is highly elevated, leaving the 5-year survival rate at 7% of those diagnosed. It is an incurable disease due to its chemoresistance and the lack of effective therapies, in addition to the fact that it remains asymptomatic until it reaches an advanced and metastatic stage.

Invasive tumor growth and metastatic development require a process called angiogenesis, essential in cancer, in which there is a growth and proliferation of new blood vessels that penetrate the tumors, thus helping them to grow thanks to their supply of oxygen and nutrients. This type of cancer is characterized by altered angiogenesis, with a high density of blood microvessels of low

integrity and perfusion capacity, which is related to poor patient prognosis. Therefore, this is why angiogenic therapy can drive forward new treatment options.

Understanding the mechanisms of communication between tumor cells and the cells in charge of the angiogenesis process is essential to design effective therapeutic strategies taking into account the tumor microenvironment. In this Final Degree Project we have sought to find optimal conditions in which a co-culture of pancreatic tumor cells and endothelial progenitor cells type ECFC, used as a model of angiogenically active cells, could be performed in order to study how angiogenic processes occur and how they could be acted upon. To achieve this co-culture, it has been shown that, although the factors secreted by one cell line do not have a very significant negative effect on the proliferation of the other line, they can influence the angiogenic processes of the endothelial cells. In this context, co-culture with MiaPaca and adult BH20 cells could be of interest, since this seems to be the only situation in which no inhibition or modulation of angiogenesis is observed.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Cáncer de páncreas

El páncreas se trata de un órgano glandular largo y plano situado en el abdomen, entre el estómago y la columna vertebral. Este tiene dos funciones principales, la función exocrina y la función endocrina. Las células exocrinas pancreáticas se encargan de la producción de los jugos pancreáticos, que contienen enzimas que ayudan a la digestión de los alimentos. Por otra parte, la función endocrina hace referencia a la secreción de la insulina y el glucagón, dos hormonas clave en la regulación de los niveles de glucosa en sangre. (1)

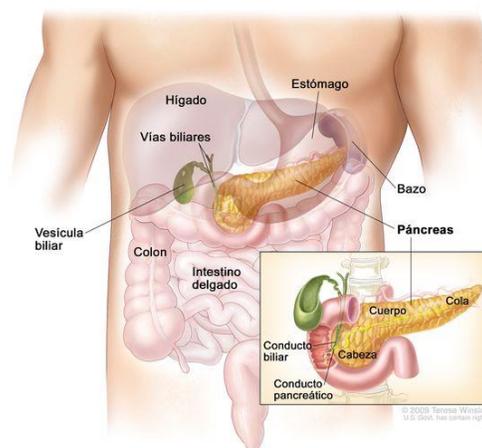


Figura 1. Anatomía del páncreas y su localización (1)

El cáncer de páncreas se produce debido a una proliferación incontrolada de células anormales del páncreas. Si se acumulan formarán una masa denominada tumor, y si alguna de estas células posee una capacidad migratoria, se diseminará a través del torrente sanguíneo a otras zonas del organismo, donde volverán a acumularse y formarán más tejidos tumorales. A este proceso se le conoce como metástasis. (2)

La mayoría de los cánceres de páncreas son exocrinos, y se tratan generalmente de adenocarcinomas pancreáticos ductales (APD). Este tipo de cáncer comienza a desarrollarse en las células que recubren los conductos pancreáticos. La principal función de estos conductos es transportar jugos digestivos con las enzimas necesarias, y son inicialmente dirigidos hacia el conducto pancreático principal, y posteriormente hacia el inicio del intestino delgado, el duodeno. El APD suele hacer metástasis a otros órganos como por ejemplo el hígado, a través del sistema vascular linfático. Una de las opciones terapéuticas posibles es la cirugía, sin embargo, un muy bajo porcentaje de los diagnosticados presenta una masa cancerígena extraíble. (2)

La mutación del gen KRAS es el principal evento en el cáncer de páncreas. Esta provoca una activación permanente de la proteína KRAS, que actúa como un interruptor molecular para activar diferentes vías de señalización intracelular y factores de transcripción, induciendo así la proliferación, migración, transformación y supervivencia celular. (2)

El cáncer de páncreas es asintomático hasta que la enfermedad alcanza un estadio avanzado, y esta es una de las causas por las que tiene una tasa tan baja de supervivencia. Además, no existe ningún programa de cribado de la enfermedad en la población que mejore su pronóstico gracias a una detección temprana. Individuos con historia familiar de este tipo de cáncer, fumadores, una previa pancreatitis crónica, y diabéticos, tiene un mayor riesgo a desarrollar esta enfermedad. (2)

La falta de síntomas o biomarcadores en las primeras etapas de la enfermedad, la agresividad de las células tumorales de hacer metástasis a sitios distantes del organismo incluso desde tumores muy pequeños, y la resistencia a los fármacos como consecuencia de un estroma fibroso y denso, contribuyen a la poca eficacia de las terapias en el cáncer de páncreas. (3)

La gemcitabina es uno de quimioterapéuticos estándar que se utilizan solos o en combinación con otros fármacos quimioterapéuticos para hacer más eficaz el tratamiento. En resumen, la quimioterapia citotóxica convencional constituye el tratamiento estándar actual para el cáncer pancreático avanzado o metastásico. Sin embargo, esta únicamente logra proporcionar unos pocos meses de beneficio en la supervivencia global. (2)(4)

## 2.2. Microambiente tumoral

Las escasas y poco efectivas opciones terapéuticas existentes para tratar el cáncer de páncreas han conducido a la búsqueda de la explotación del microambiente tumoral con una finalidad terapéutica. (4)

El microambiente tumoral es el conjunto de células, moléculas y vasos sanguíneos que rodean y alimentan un tumor. (5) Una masa tumoral sólida está formada no sólo por células tumorales, sino también por otras numerosas células residentes e infiltradas y la matriz extracelular, que en conjunto forman el microambiente tumoral (MAT). El MAT contiene principalmente tres entidades celulares: fibroblastos, células del sistema inmune y células endoteliales; estas tres constituyen un tejido conocido como estroma tumoral. (6)

Es comúnmente aceptado que el microambiente tumoral favorece la supervivencia de las células cancerígenas y es crucial para la progresión tumoral y la metástasis, y consecuentemente hay un mayor interés en dirigirse contra la diana del estroma tumoral para mejorar la efectividad de las terapias del cáncer. (6) Además,

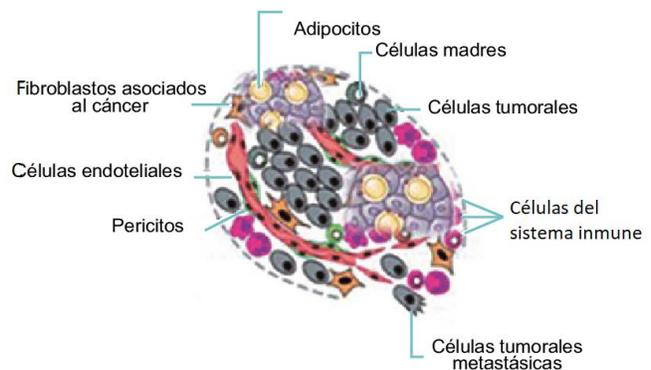


Figura 2. Componentes celulares del microambiente tumoral. (7)

durante la progresión del cáncer, las células tumorales son capaces de alterar las características del estroma adyacente para crear un microambiente de apoyo. (8)

Estudios recientes han demostrado que el microambiente tumoral del cáncer de páncreas, donde se encuentran los fibroblastos asociados al cáncer, las células estrelladas, la matriz extracelular, varios tipos de células inmunitarias y las citoquinas liberadas por estas células, participa en el control del crecimiento, la invasión y la metástasis del tumor mediante estrechas interacciones con las células cancerosas o neoplásicas. Por tanto, estudios preclínicos y clínicos han optado por focalizarse en el microambiente tumoral como posible objetivo novedoso sobre el que actuar mediante distintas terapias. (3)

Los fibroblastos asociados al cancer (FACs) son el tipo de célula estromal más predominante y crucial del microambiente tumoral, y su interacción con las células cancerosas promueve el crecimiento, migración e invasión de las células tumorales a otras zonas del organismo mediante varios mecanismos. (6)(8)(9). Por otra parte, encontramos las células estrelladas pancreáticas, un grupo altamente heterogéneo de células mesenquimales con unas características miofibroblásticas. (10) Estas células llevan a cabo una reacción pro-inflamatoria denominada reacción desmoplásica, mediante la cual ocurre una deposición de abundantes cantidades de colágeno y matriz extracelular en el estroma. Este estado de estroma desmoplásico, fibrótico e hipóxico crea una barrera mecánica alrededor de las células tumorales, evitando una vascularización adecuada, y por tanto limitando la exposición del tumor a la quimioterapia. (4) Cabe destacar también la presencia de células inmunes, las cuales son inhibidas por una serie de células inmunosupresoras, alcanzando de esta manera el microambiente tumoral inmunosupresor, una característica esencial en los tumores pancreáticos. (3)

### **2.3. Procesos angiogénicos en el microambiente tumoral**

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, formados en una de las primeras etapas de la vasculogénesis. Consiste en la migración, crecimiento y diferenciación de células endoteliales, encargadas de recubrir el interior de las paredes de los vasos sanguíneos. El proceso de angiogénesis está controlado por señales químicas en el organismo. (11)

La angiogénesis se trata de un proceso altamente regulado que se activa de forma esporádica o transitoria en ciertas situaciones fisiológicas como pueden ser el desarrollo, el ciclo menstrual en la reproducción, la reparación de fracturas óseas o la cicatrización de heridas. Sin embargo, también puede activarse de manera anómala en algunas patologías como la psoriasis o la diabetes mellitus. Además, se ha observado que se trata de un factor esencial para el crecimiento y progresión tumoral, y la formación de metástasis en el cáncer. (12)(13)

Durante la vasculogénesis embrionaria, la formación de vasos sanguíneos *de novo* implica la formación de células endoteliales progenitoras y su ensamblaje en un plexo capilar primario, del que posteriormente emergerán nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes mediante brotes y ramificaciones. (13)(14)

La diferencia más clara entre la angiogénesis fisiológica y la patológica es la regulación del equilibrio del denominado “interruptor angiogénico”, regulado por diversos factores, y el cual se activa en diferentes periodos de la progresión tumoral en función del tipo del cáncer y de su microambiente. (13)

La difusión de oxígeno en nuestro organismo requiere que prácticamente todas las células del cuerpo se encuentren a una distancia de entre 100 y 150 micrómetros de un capilar. En una situación fisiológica, el crecimiento o formación de nuevos vasos sanguíneos conllevaría la entrega de oxígeno y nutrientes, lo cual conduce a una reducción en la secreción de factores proangiogénicos, adoptando así un fenotipo vascular quiescente. (6)

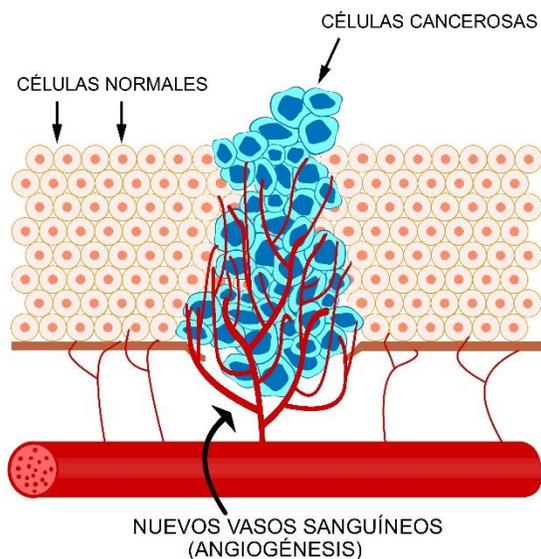


Figura 3. Vascularización del tumor mediante angiogénesis (16)

En la fase inicial prevascular del crecimiento tumoral, el tumor se desarrolla sin neovascularización, suele tener menos de 2-3 mm<sup>3</sup>, y la suplementación nutricional y el oxígeno es obtenido por difusión. El tumor permanece en un estado latente, y se vuelve capaz de generar señales de hipoxia, dado que los capilares están lejos como para que el oxígeno llegue por difusión, hasta que se vasculariza. (13)(15) Es por esto por lo que el crecimiento de un tumor generalmente requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. Este proceso, conocido como angiogénesis tumoral, consiste en la proliferación de vasos sanguíneos que penetran en el interior de tumor para aportarle oxígeno y nutrientes y que pueda crecer. Esto se consigue gracias a la reactivación de la vasculatura residente quiescente

gracias a la acción de factores de crecimiento, como por ejemplo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), secretado por las células pertenecientes a un tejido en condiciones de hipoxia. (6)

Mediante este mecanismo, el tumor busca obtener el aporte nutricional necesario, como sustento y oxígeno, y además eliminar el dióxido de carbono y residuos metabólicos potencialmente tóxicos. Además, la angiogénesis desempeña un papel crucial en la fase premaligna asintomática de la progresión neoplásica. (13)

Como vemos, la angiogénesis se ve regulada por moléculas activadoras, como VEGF y bFGF, e inhibidoras. En una situación fisiológica predomina la inhibición angiogénica, sin embargo, en presencia de un tumor, es necesario un aumento de los activadores angiogénicos, debido a la necesidad de una nueva vascularización. (12)

En este contexto, el problema se encuentra en que los nuevos vasos que se forman no son morfológica ni funcionalmente normales, dando lugar a una vasculatura de estructura caótica.

Consisten en vasos débiles y aberrantes con un flujo invertido e intermitente, caracterizados por una ramificación anormal y excesiva, y uniones interendoteliales alteradas. Por tanto, aunque exista un incremento de la vascularización, al ser esta poco funcional, se promueve un ambiente hipóxico, una inmunosupresión, y por tanto la progresión tumoral. (6)(13)

El crecimiento de la masa tumoral maligna es dependiente de la formación de vasos sanguíneos por parte de las células endoteliales. Las células endoteliales no solo se encargan de formar estos vasos para el transporte de la sangre, sino que además expresan diversos factores que fomentan la agresividad y malignidad de las células tumorales, influyen en la respuesta inmune contra estas, y contribuyen por tanto a la progresión tumoral y metástasis. (6)

Cabe destacar que la densidad de microvasos es un indicador pronóstico bastante útil en muchas neoplasias, incluyendo el cáncer de páncreas, y se correlaciona con la agresividad y el potencial metastásico. Una angiogénesis crónica activada, junto con un desequilibrio de las señales proangiogénicas, estimulan la formación de vasos sanguíneos aberrantes. Un gran número de vasos sanguíneos aumenta la probabilidad de que las células tumorales entren en la circulación. Una vez las células metastásicas alcanzan el órgano diana, inducen una neovascularización para que la metástasis crezca hasta un tamaño clínicamente detectable. (13)

Al principio se atribuía la progresión tumoral únicamente a la formación de estos nuevos vasos sanguíneos. Sin embargo, estudios posteriores revelaron que las células endoteliales controlan su microambiente a través de la expresión de factores tanto unidos a su membrana como secretados. Estas funciones angiocrinas suelen ser secuestradas por las células cancerígenas, las cuales desregulan las vías de señalización controlando así la expresión de dichos factores angiocrinos. (6)

En cuanto a la inducción angiogénica, la hipoxia es uno de los inductores más potentes de este proceso, actuando como regulador primario del interruptor angiogénico. La hipoxia tumoral activa el metabolismo anaeróbico, la angiogénesis, la eritropoyesis y la supervivencia celular. (2) Numerosos estudios demuestran que el factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  (factor inducible por hipoxia) juega un papel importante en la patogénesis del cáncer. Al ser HIF-1 $\alpha$  sensible a situaciones de hipoxia, se estabilizaría, y se dirigiría al núcleo activando los genes de respuesta a hipoxia como por ejemplo VEGF. En el cáncer, VEGF es uno de los factores angiogénicos más importantes, y actúa uniéndose a sus receptores estimulando el crecimiento de los nuevos capilares a partir de otros preexistentes. (17)

Basándose en el concepto de la angiogénesis tumoral, se han estudiado y diseñado diversas terapias con este proceso como objetivo sobre el que actuar. Una terapia anti-angiogénica contra el cáncer ha sido desarrollada, y es hoy en día uno de los puntos de atención más importantes en muchos tipos de cáncer. A pesar de la prometedora eficacia de este tipo de terapias en la prolongación de la supervivencia libre de progresión, su impacto en la supervivencia global es limitado. Esto podría ser debido a mecanismos de resistencia adquirida, como el reclutamiento de vías angiogénicas alternativas. (6)

Por otra parte, el cáncer de páncreas se caracteriza por una alta densidad microvascular y un deterioro en la integridad de microvasos sanguíneos. Estos dos fenómenos juntos se asocian con

una metástasis temprana y una corta supervivencia, a pesar de la resección o extracción del tumor. Todas estas características alteradas de la vasculatura cancerígena pancreática pueden ser el objetivo de otro grupo de terapias, cuya finalidad podría ser inducir la normalización de los vasos sanguíneos del tumor, lo que resulta en una mejor perfusión del tumor, una reducción de la hipoxia, y una mejora de la administración de fármacos y por tanto de los resultados terapéuticos. (2)

#### **2.4. Células progenitoras endoteliales**

Hasta hace unos pocos años, se pensaba que la vasculogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células no diferenciadas, únicamente ocurría durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, el descubrimiento de las células progenitoras endoteliales (CPEs) en la sangre circulante de nuestro organismo, cambió esta situación conduciendo a numerosos estudios posteriores. (18)

Hasta el descubrimiento de esta población celular, se pensaba que el principal mecanismo de vascularización tras un evento isquémico se debía al proceso de angiogénesis, por el que se forman nuevos vasos mediante la migración, diferenciación y proliferación directas de las células endoteliales maduras existentes. Además, el descubrimiento de este novedoso concepto de EPC ha echado por tierra el dogma anterior que sugería que la vasculogénesis sólo podía producirse durante la embriogénesis. De hecho, se ha visto que tanto la vasculogénesis como la angiogénesis pueden tener un papel sinérgico en la revascularización postnatal. (19)

Las células progenitoras endoteliales pueden ser consideradas como un tipo de células madre derivadas de la médula ósea, con capacidad proliferativa y migratoria, aunque con una capacidad de diferenciación limitada casi exclusivamente a linaje endotelial. Su función principal es la de reparar el endotelio de los vasos sanguíneos del organismo. (20) La vasculogénesis y la angiogénesis podrían constituir mecanismos complementarios para la neovascularización postnatal, y las CPEs podrían estar en el centro de este proceso. Como hemos visto anteriormente, aunque la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente desempeña un papel beneficioso en muchos procesos fisiológicos, como la cicatrización de heridas, también contribuye al crecimiento tumoral y a la metástasis. Sin embargo, muchos aspectos del papel que desempeñan las CPEs en la angiogénesis tumoral y de su reclutamiento siguen sin estar claros. (18)

Los tumores y las condiciones isquémicas producen factores de crecimiento que modulan la angiogénesis, como el VEGF-A y el bFGF. La liberación de estos factores de crecimiento pro-angiogénicos y el microambiente tumoral hipóxico reclutan CPEs de la médula ósea, las cuales entran en la circulación sanguínea y son atraídas hacia las zonas de liberación de dichos factores de crecimiento, como en la periferia del tumor, como podemos observar en la *Figura 4*. Por otra parte, los factores de crecimiento también son capaces de activar CPEs residentes en el tumor, como se ve representado en la *Figura 5*. Una vez en la zona tumoral, estas CPEs se diferencian en células endoteliales, participando en la formación de nuevos vasos, o producen factores de crecimiento angiogénicos. (18)(19)(2)

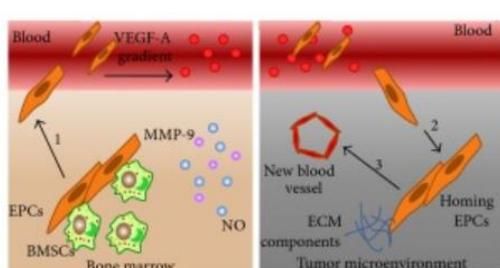


Figura 4. Células progenitoras endoteliales accediendo a la vasculatura, siendo reclutadas hacia el microambiente tumoral (18)

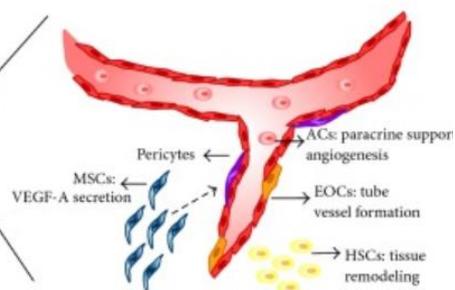


Figura 5. Activación de células progenitoras endoteliales residentes en el tumor (18)

Las CPEs circulantes se desplazan siguiendo los gradientes del factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), una quimiocina que estimula la migración celular hacia el lecho tumoral, incorporándose posteriormente a los vasos nacientes, diferenciándose en células endoteliales maduras para proporcionar soporte estructural y liberando una serie de citoquinas para promover la angiogénesis. (21)

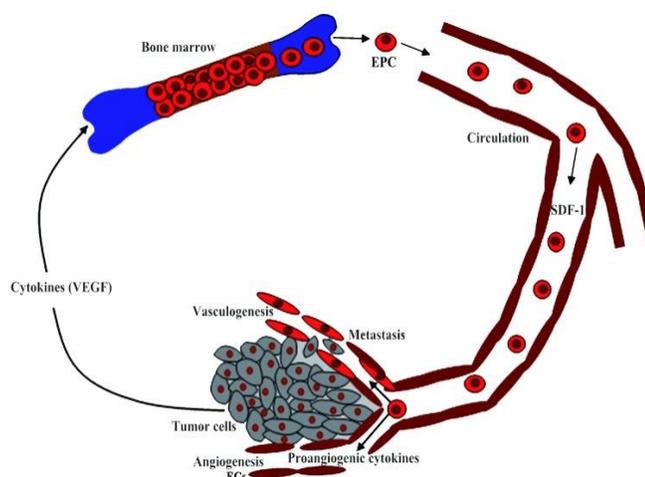


Figura 6. Reclutamiento de CPEs hacia el lecho tumoral (21)

Las líneas celulares endoteliales tipo ECFC (endothelial colony forming cells) utilizadas en el desarrollo de este TFG pueden ser consideradas como modelo de las CPEs por su capacidad altamente proliferativa y fenotipo inmaduro que conserva marcadores de pluripotencia. Se obtienen de precursores circulantes en sangre tanto de adultos como en sangre de cordón umbilical mediante técnicas selectivas de cultivo celular. Estas células serán consideradas en este trabajo como un modelo de CPEs capaces de promover angiogénesis tumoral en el cáncer pancreático.

### 3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

La angiogénesis se trata de un proceso crucial en el desarrollo y progresión tumorales dentro del cáncer pancreático. La realización de un co-cultivo entre células tumorales pancreáticas y células endoteliales progenitoras podría ser de ayuda para estudiar el proceso angiogénico en el cáncer de páncreas, y poder estudiar posibles drogas que sirvan de ayuda en la terapia de esta enfermedad.

Los principales objetivos dentro de este TFG serán los siguientes:

- a) Realizar la puesta a punto de métodos de co-cultivo entre células primarias de tumores derivados de paciente y células progenitoras endoteliales tipo ECFC como modelo de células angiogénicamente activas. Es necesario encontrar unas condiciones óptimas de cultivo celular en las cuales ambas líneas celulares sean capaces de sobrevivir y proliferar.
- b) Estudiar la capacidad de autorrenovación de un cultivo de células tumorales pancreáticas, mediante el uso de sus medios basales, de los medios utilizados con las células endoteliales progenitoras, y de medios condicionados.
- c) Determinar posibles efectos a nivel morfológico de las señales producidas por células tumorales sobre progenitores endoteliales y viceversa, mediante el uso de medios condicionados.
- d) Estudiar el proceso angiogénico que llevan a cabo las células progenitoras endoteliales bajo distintas condiciones, utilizando tanto sus medios basales como medios condicionados de células tumorales, y poder por tanto estudiar posibles alteraciones angiogénicas.

Para alcanzar estos objetivos, se desarrollarán técnicas de cultivo básicas y se realizarán ensayos celulares para analizar la viabilidad, proliferación y capacidad angiogénica.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Material biológico**

En el desarrollo de todos los experimentos llevados a cabo se han utilizado cuatro líneas celulares distintas. Por una parte, dos de ellas son líneas de células tumorales de cáncer de páncreas; Miapaca y Bxpc3. Miapaca es una línea celular establecida, humana y tumoral, cuyo origen se encuentra en el páncreas y es altamente usada en la investigación contra este cáncer y en el desarrollo de terapias efectivas. La línea Miapaca presenta alelos mutantes en los genes KRAS y TP53.

Bxpc3 también se trata de una línea celular tumoral pancreática ampliamente utilizada en el estudio de adenocarcinomas pancreáticos y su consecuente tratamiento. Presentan una morfología epitelial y crecen adheridas a la superficie en monocapa, al igual que la línea Miapaca. Sin embargo, estas carecen de mutación en el gen KRAS, algo muy común en cánceres pancreáticos, y tienen una alta expresión de marcadores de células madre cancerosas.

Por otra parte, se utilizaron dos líneas de células progenitoras endoteliales tipo ECFC (endothelial colony forming cells) obtenidas tanto a partir de muestras de sangre de adultos sanos (BH20), como de sangre de cordón umbilical (C2.1). Ambas líneas celulares son de carácter primario y crecen en monocapa, tienen una morfología epitelial poligonal, y se generaron a partir de precursores circulantes sanguíneos mediante procedimientos de cultivo celular en condiciones selectivas. Conservan características de células progenitoras, como son la alta capacidad proliferativa y marcadores de pluripotencia (CD34, CD133), pero su evolución está dirigida hacia una clara diferenciación endotelial pudiendo incorporarse al endotelio vascular y participar en procesos angiogénicos. La diferencia principal entre las ECFCs de origen de adulto y de cordón umbilical es su menor potencial proliferativo asociado a un fenotipo más diferenciado hacia células endoteliales maduras. Estas células se utilizaron entre los pases 5 y 9.

## 4.2. Mantenimiento

En cuanto a los medios en los que crecen estas líneas celulares, la información queda representada en la *Tabla 1*.

Tipo de línea celular	Medio de cultivo	Suplementación
<b>Células tumorales pancreáticas (Miapaca y Bxpc3)</b>	RPMI 1640 Gibco	- 10% FBS - Penicilina/Streptomicina
	DMEM/F12 Gibco (medio de esferas)	- B27 - bFGF - Penicilina/Streptomicina
<b>Células progenitoras endoteliales tipo ECFC (BH20 y C2.1)</b>	EGM-2 MV Lonza (Endothelial growth medium-2 Microvascular)	- 5% FBS - hFGF-B - VEGF - R3-IGF-1 - Ácido ascórbico - hEGF - Gentamicina/Anfotericina - Hidrocortisona

*Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para cada línea celular*

La razón de suplementar el medio con FBS es debido a su alto contenido de hormonas y lípidos. Respecto al medio EGM-2 MV, uno de los suplementos proporcionados por parte de la casa comercial es la hidrocortisona, sin embargo, solo los medios utilizados para cultivar las células procedentes de sangre de adulto serán suplementados con este componente. La razón de esto se encuentra en que las células de cordón, en presencia de hidrocortisona, crecen a velocidades demasiado rápidas.

Para el mantenimiento y expansión de las células es necesario trabajar en condiciones de esterilidad, y esto se consigue en campanas de flujo vertical. Tanto las líneas celulares tumorales como las progenitoras endoteliales crecen en forma de monocapa adheridas a la superficie del flask con el que trabajamos, en este caso frascos de cultivo de  $75 \text{ cm}^2$ . Miapaca y Bxpc3 crecen a velocidades altas y alcanzan la confluencia entre ellas muy rápido, por lo que tendremos que hacerles pases al menos dos veces por semana. Por otra parte, las células endoteliales tipo ECFC crecen a un ritmo más moderado, y alcanzan la confluencia al cabo de una semana aproximadamente, esto depende del pase del cultivo celular con el que se trabaje.

Para la expansión o el pase de las líneas celulares, el proceso varía ligeramente entre las líneas tumorales y las endoteliales. En cuanto a las tumorales, el medio de los flask en los que se encuentra nuestro cultivo celular, es retirado por aspiración, llevándonos células muertas, restos celulares y sustancias producidas por las células. Se lava el flask con PBS sin calcio ni magnesio, y tras retirarlo se añaden 4 mL de tripsina. Incubamos las células con la enzima durante aproximadamente 5

minutos a 37°C, tiempo suficiente para que las células se despeguen de la superficie del flask. A continuación, añadimos el doble de medio RPMI con suero que de tripsina, 8 ml, para detener la acción peptidasa de la enzima. Hacemos la dilución necesaria con RPMI para el pase del cultivo, y el resto lo centrifugamos a 1200 rpm durante 5 minutos en tubos falcon de 15 ml. Tras esto, aspiramos el sobrenadante y resuspendemos el pellet en 1 ml de medio, si la concentración celular fuese muy alta podríamos añadir más volumen de medio. Esto nos facilitaría el posterior contaje de células con la cámara de Neubauer. Con el dato de la densidad celular obtenido, podríamos calcular el volumen necesario a tomar para realizar distintos experimentos.

Existen pequeñas diferencias en el pase de las líneas progenitores endoteliales con respecto a lo explicado anteriormente. En lugar de tripsina utilizamos acutasa, una enzima no tan agresiva como la tripsina, y la dejamos actuar a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Es importante realizar el paso intermedio de lavar el flask con PBS, antes de la acción de la acutasa. La razón de que el PBS no contenga ni calcio y magnesio, es para debilitar la adherencia celular. Esto es porque tanto las células endoteliales como las tumorales son adherentes y tienen unas estructuras en su pared celular que les permiten adherirse, siendo estas estructuras y adherencia dependientes de Ca y Mg. Por último, se neutraliza la acción de la acutasa con medio EGM-2 MV. Para determinar la densidad celular de nuestro cultivo, el caso de las líneas progenitoras endoteliales, se emplea la tinción con Azul Trypan, un colorante que únicamente penetra en las células cuya membrana está dañada, indicando que están muertas. En la cámara de Neubauer se añade la mezcla en proporción 1:1 del cultivo celular y de azul de Trypan respectivamente. En el caso de las células tumorales pancreáticas no es necesario la tinción porque se ve claramente.

### **4.3. Ensayo de proliferación celular**

Este tipo de ensayo es realizado tanto con las líneas tumorales pancreáticas como con las líneas progenitoras endoteliales. La finalidad es poder cuantificar cómo crecen las células en distintas condiciones. En cuanto a las células tumorales, el procedimiento consiste en plaquear tres placas de 96 pocillos con 5000 células por pocillo y dejarlas crecer durante 24h, que será cuando activaremos con distintas condiciones, en este caso con distintos medios de cultivo. Esto lo haremos retirando el medio basal, RPMI, por aspiración, y sustituyéndolo por otro medio distinto. Los medios utilizados a lo largo de los distintos experimentos han sido los siguientes: RPMI, medio de esferas, EGM2-MV 5% FBS sin hidrocortisona, EGM2-MV 5% FBS con hidrocortisona, EGM2-MV 1% FBS sin hidrocortisona, EGM2-MV 1% FBS con hidrocortisona, medio condicionado de células C2.1 con EGM-2 MV 1% FBS, y por último medio condicionado de células BH20 con EGM-2 MV 1% FBS.

El medio condicionado se trata de un medio de cultivo celular en el que previamente ha crecido otra línea celular distinta a la con la que queremos trabajar. En este caso, para la obtención de medio condicionado de células endoteliales, el procedimiento es el siguiente. Se ha de recoger el medio de cultivo en el que las líneas progenitoras endoteliales han crecido, y este es centrifugado a 1200rpm durante 10 minutos para eliminar cualquier posible resto celular. Desecharemos el pellet y el sobrenadante obtenido será el medio condicionado, el cual será guardado a -80°C y que descongelaremos cuando necesitemos. Es interesante introducir el medio condicionado en estos ensayos de proliferación para poder estudiar cómo afectan las sustancias producidas por la otra

línea celular a la línea celular con la que nosotros trabajamos, evaluando de esta forma las posibilidades de realizar un co-cultivo con ambas líneas celulares.

Una de las placas, la placa control, no será activada con los diferentes medios, y será medida con un tiempo de 0h con resazurin y posteriormente teñida con cristal violeta. Las otras dos placas sí serán activadas y medidas con resazurin y teñidas con cristal violeta a los 2 y 7 días respectivamente. Para cuantificar los datos obtenidos de estos experimentos se utilizó el equipo espectrómetro de placas Synergy HC (Biotek), tanto para las medidas de fluorescencia como de absorbancia.

El ensayo de viabilidad celular de resazurina consiste en un método de fluorescencia que detecta la actividad metabólica celular. Este componente se trata de un indicador redox que ayuda a detectar la viabilidad celular. Existe una reducción química del medio de cultivo a causa del crecimiento celular, lo que lleva al indicador redox a virar de un estado no oxidado (no fluorescente, azul) a su forma reducida (fluorescente, roja). En el experimento de resazurina se utilizó una excitación en torno a 530 nm y se detectó la emisión fluorescente en torno a 590 nm.

La resazurina actúa a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , pero el stock se encuentra a una concentración 10000  $\mu\text{M}$ . Por tanto, optimizando el número de pocillos que queremos medir con este indicador redox y sabiendo que son 100  $\mu\text{L}$  de resazurin por pocillo, podremos saber mediante una regla de tres la cantidad de resazurin necesaria. Por ejemplo, para medir una placa de 96 pocillos con este compuesto, y optimizando con 10 pocillos de exceso:

$$106 \text{ pocillos} * 100 \frac{\mu\text{L}}{\text{pocillo}} = 10600 \mu\text{L}$$

$$10000 \mu\text{M} * V_0 = 50 \mu\text{M} * 10600 \mu\text{L}$$

$$V_0 = 53 \mu\text{L de resazurin llegando a } 10600 \mu\text{L con PBS}$$

Una vez añadimos los 100  $\mu\text{L}$  en cada pocillo, dejamos incubar durante una hora a 37°C, y medimos en el lector de placas la fluorescencia observada, la cual se correlacionará con el número de células. Tras esto, teñimos la placa con cristal violeta y a la media hora aclaramos y dejamos secar durante unos días.

Para cuantificar los datos de la tinción cristal violeta, se ha de preparar una mezcla de SDS 1%. El SDS es un detergente que se une a proteínas y ácidos nucleicos. Añadiremos 100  $\mu\text{L}$  en cada pocillo y al agitador. Mediremos la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm con el lector de placas. La finalidad de la tinción con cristal violeta es medir la cantidad de células presentes.

#### **4.4. Ensayo de formación de esferas (SFA) de líneas tumorales pancreáticas**

Las células madre cancerígenas son una subpoblación de células identificadas en la mayoría de tumores, y son responsables de la iniciación, recurrencia y potencial metastásico del tumor debido a su habilidad de auto regeneración y diferenciación en múltiples tipos de células tumorales.

Este ensayo se trata de un método in vitro cuya finalidad es cuantificar la capacidad de autorrenovación de un cultivo mediante la expansión clonal. Para ello, se ha de cultivar una línea

celular en condiciones libres de suero y no adherentes, para que las células madre cancerígenas sean las únicas capaces de sobrevivir y expandirse de forma clonal para formar esferas. El número de esferas obtenido se correlacionará con la capacidad de autorrenovación de dicha línea celular.

El procedimiento es el siguiente. Plaqueamos 300000 células por pocillo de la línea celular Bxpc3 en una placa de 6 pocillos, y las dejamos proliferar durante 24h. Tras esto activaremos cada uno de los pocillos con diferentes condiciones, en nuestro caso, con diferentes medios de cultivo. A las 48h de activar, tripsinizaremos cada uno de los pocillos con 1 ml de tripsina, dejaremos incubar durante 5 min a 37°C, y añadiremos 2 ml de PBS para detener la acción de la tripsina. Traspasaremos estos 3ml de cada pocillo a tubos falcon, que serán centrifugados a 1200rpm durante 5 minutos, y posteriormente resuspendemos el pellet en 1 ml de medio de esferas.

Haremos el conteo de células de cada una de las distintas condiciones que tenemos, y plaquearemos ahora 300000 células por pocillo en una placa de polyhema, de tal forma que no puedan crecer adheridas en monocapa y puedan formar esferas. A los 7 días contaremos las esferas formadas en cada una de las condiciones.

#### **4.5. Ensayo de curva de crecimiento de células endoteliales**

Con este ensayo lo que buscamos es poder representar a través de una curva de crecimiento cómo crecen las células progenitoras endoteliales a lo largo de los días en distintas condiciones.

Se plaquean 8 placas de 24 pocillos con 5000 células por pocillo, 4 placas corresponden a las células endoteliales de adulto, y las otras 4 a las de cordón. Al plaquear se utilizará el medio basal que utilizan estas células para proliferar, el EGM-2 MV con 5% FBS, y en el caso de las células de adulto se le añadirá al medio la hidrocortisona. A las 24h activaremos y a cada una de las placas de cada línea celular le corresponderá un medio: EGM-2 MV 5% FBS, EGM-2 MV 1% FBS, RPMI y medio de esferas DMEM.

En estas placas multiwell de 24 pocillos, la primera columna de cada una de las placas será el control (t=0h) y será fijada con glutaraldehído al 1%, es decir, esta no será activada, pero el resto sí. Iremos fijando a distintos tiempos (t=0h, t=24, t=48, t=5días, t=7días, t=9días) y cuando ya esté fijada toda la placa, teñiremos con cristal violeta.

El proceso de fijación de un pocillo es el siguiente. Retiramos el medio del pocillo y lavamos con 1 ml de PBS con Ca y Mg. Retiramos el PBS y fijamos las células adheridas a la superficie con 200 microlitros de glutaraldehído 1% durante 10 minutos a 37°C. Tras esta incubación, hay que lavar tres veces seguidas el pocillo con 1 ml de PBS, y dejar el PBS del último lavado en caso de que queden pocillos por fijar días posteriores.

Cuando todos los pocillos estén fijados, habrá que teñir con cristal violeta para obtener los datos cuantitativos y poder así representar los datos en la curva de crecimiento. Para la tinción con cristal violeta, añadimos 200 µL del colorante y lo dejamos actuar durante aproximadamente 15 minutos, y posteriormente limpiamos la placa eliminando el cristal violeta y sumergiendo en agua. Una vez la placa se encuentre completamente seca, al cabo de unos pocos días, disolvemos el colorante que ha quedado al fondo de cada pocillo con acético al 10%. Traspasaremos cada uno de los pocillos a

una placa de 96 por duplicado, para hacer la lectura de la absorbancia. Ya podrán hacerse las gráficas correspondientes a las curvas de crecimiento de cada línea celular con los diferentes medios.

#### **4.6. Ensayo de viabilidad de líneas progenitoras endoteliales tipo ECFC**

En este experimento buscamos observar la viabilidad de cada línea celular en diferentes condiciones. Cultivamos una placa de 96 pocillos con células de la línea celular BH20 y otra con células C2.1 y las dejamos crecer unos días con medio EGM-2 MV 1% FBS, hasta que alcanzan aproximadamente un 80% de confluencia.

Activaremos cada una de las columnas con diferentes condiciones de medio, algunos serán medios puros y otros serán mezclas de diferentes medios. Todas las condiciones son las siguientes:

1. 100% EGM-2 MV 1% FBS
2. 100% EGM-2 MV 5% FBS
3. 100% RPMI
4. 100% medio de esferas
5. 50% EGM-2 MV 1% FBS + 50% RPMI
6. 50% EGM-2 MV 1% FBS + 50% medio de esferas
7. 50% EGM-2 MV 5% FBS + 50% RPMI
8. 50% EGM-2 MV 5% FBS + 50% medio de esferas
9. 25% EGM-2 MV 1% FBS + 75% RPMI
10. 25% EGM-2 MV 1% FBS + 75% medio de esferas
11. 25% EGM-2 MV 5% FBS + 75% RPMI
12. 25% EGM-2 MV 5% FBS + 75% medio de esferas

A los tres días de activar ambas placas con las diferentes condiciones, mediremos la fluorescencia con resazurin y teñiremos con cristal violeta.

#### **4.7. Ensayo de angiogénesis de líneas progenitoras endoteliales**

En el ensayo de angiogénesis se busca estudiar la capacidad de las células endoteliales de organizarse en estructuras tubulares reminiscentes de capilares sanguíneos, en distintas condiciones de cultivo. Estos ensayos se realizan en placas especiales de angiogénesis (Ibidi  $\mu$ -Slide Angiogenesis) cuya base será una matriz comercializada como Cultrex Base Membrane Extract.

El Cultrex consiste en una membrana basal soluble extraída del tumor Engelbreth-Holm-Swarm, la cual al solidificarse a temperatura ambiente forma una estructura similar a la de la membrana basal en cuanto a la composición, estructura y propiedades físicas. En definitiva, Cultrex es un hidrogel que proporciona a las células endoteliales una superficie de muy baja rigidez que les hace comportarse de una manera diferente que cuando se cultivan en las superficies superrígidas convencionales. En estas condiciones se detiene la proliferación y se estimula la organización de las células para producir estructuras tubulares. Los componentes más destacables de esta matriz son el colágeno IV, la laminina y el proteoglicano de heparán sulfato.

En placas de angiogénesis añadimos 50  $\mu$ L de matrigel a cada uno de los pocillos y dejamos incubar durante al menos 30 minutos para que el matrigel gelifique, que será sobre la cual crecerán las células. Este matrigel se guarda a unas condiciones de baja temperatura a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y un día antes del ensayo lo cambiamos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Este tubo de extracto de membrana basal (matrigel), una vez sacado de los  $4^{\circ}\text{C}$ , lo tenemos que seguir manteniendo a una baja temperatura mientras lo añadimos en los pocillos dado que cuando aumenta la temperatura comienza a gelificar. Es importante evitar la formación de burbujas en este proceso.

Plaquearemos 10000 células por pocillo con un volumen de 50  $\mu$ L en cada uno, y destinaremos una placa de angiogénesis para células C2.1 y otra para células BH20. A las 20/22 horas fijaremos todos los pocillos de las placas de angiogénesis con glutaraldehído 1%, teñiremos con un colorante, y podremos realizar fotos con la lupa para ver en qué condiciones las células endoteliales han formado capilares.

#### **4.8. Estadística**

A casi todos los resultados obtenidos a lo largo de los experimentos realizados en este TFG les hemos aplicado diferentes tests estadísticos con la finalidad de poder ver si nuestros resultados muestran diferencias significativas entre las diferentes condiciones utilizadas o no.

Es necesario realizar un test de normalidad a cada uno de los experimentos realizados, por separado, teniendo en cuenta que cada uno de ellos se ha realizado un número  $n$  de veces. En este contexto hay dos opciones:

- No se trata de una distribución normal. En caso de querer comparar un control con un único tratamiento realizaríamos un test Mann & Whitney, mientras que si queremos comparar un control con diversos tratamientos, realizaríamos un test Kruskal Wallis-Dunn's.
- Se trata de una distribución normal. En caso de querer comparar un control con un único tratamiento realizaríamos un test t-student, mientras que si queremos comparar un control con diversos tratamientos, realizaríamos un test ANOVA-Bonferroni.

### **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **5.1. Ensayo de proliferación celular de líneas tumorales pancreáticas**

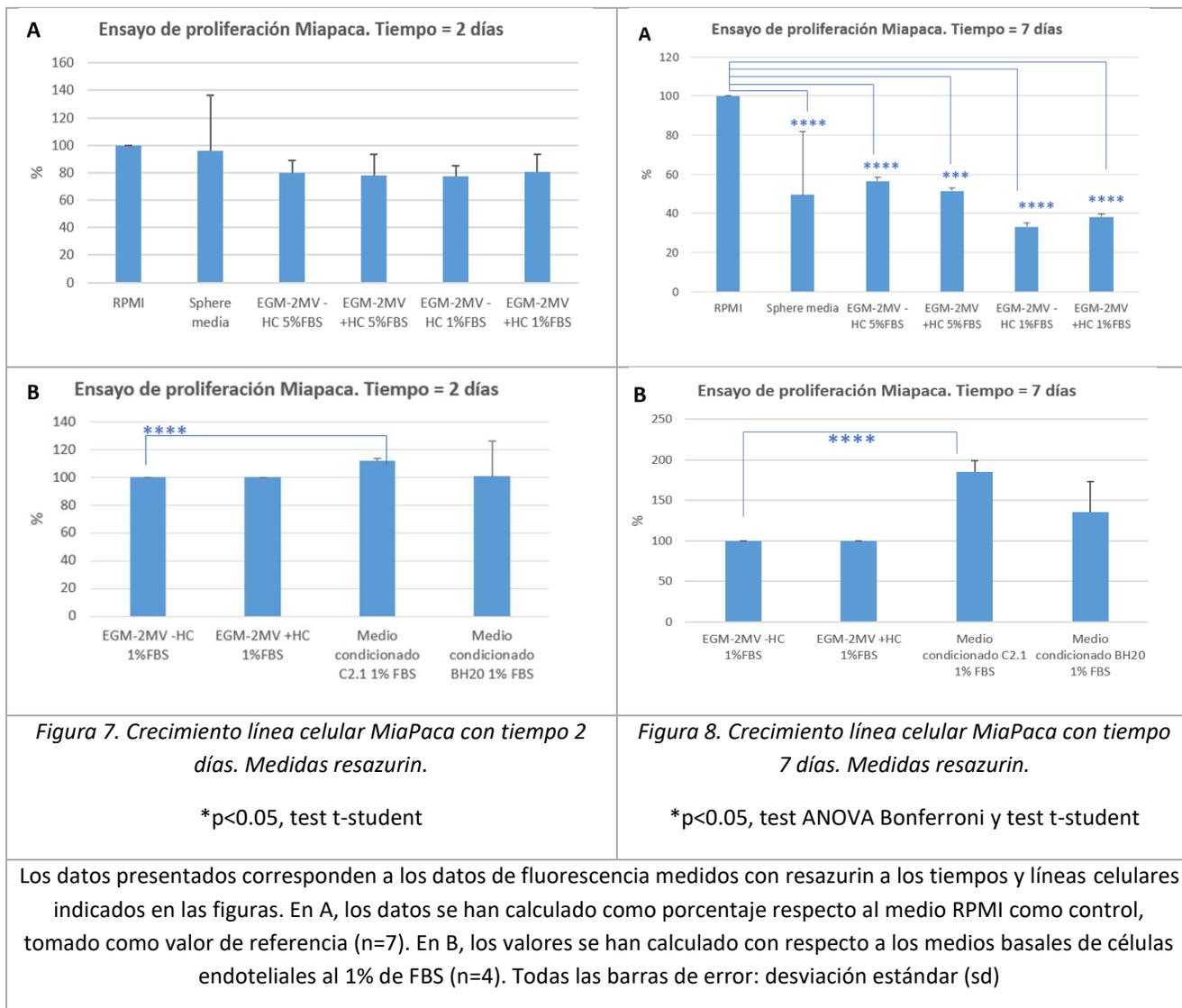
##### **5.1.1. Ensayo de viabilidad celular de MiaPaca y Bxpc3 (medidas resazurin)**

El objetivo de este experimento estaba encaminado a conocer cómo crecen estas líneas celulares, tanto con sus propios medios de cultivo, como con los medios de células progenitoras endoteliales y los medios condicionados por estas; y poder por tanto encontrar unas condiciones favorables para un posible co-cultivo de células tumorales con células progenitoras endoteliales tipo ECFC.

En la *Figura 7* podemos observar la proliferación de MiaPaca a los 2 días. En este caso, no existen prácticamente diferencias significativas en la proliferación celular entre los distintos medios utilizados, es decir, a un tiempo de 2 días, podríamos decir que MiaPaca prolifera de forma similar independientemente del medio de cultivo utilizado. Sin embargo, en *Figura 7.B* sí que observamos

que las células cultivadas con medio condicionado al 1% FBS de C2.1, presentan una significativamente mayor proliferación que aquellas cultivadas con EGM-2 MV 1%FBS -HC.

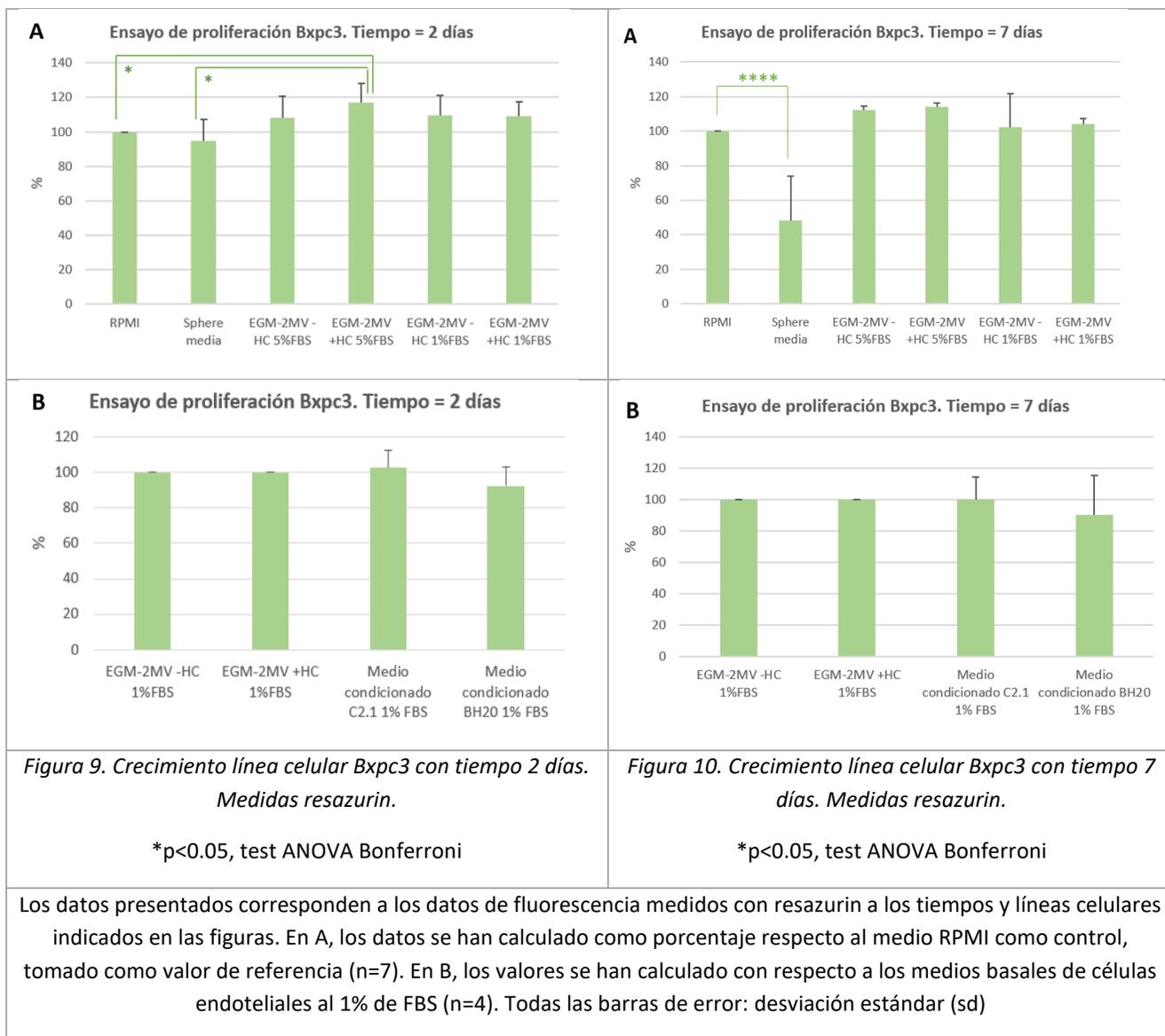
En la *Figura 8* se representan los mismos resultados, pero referentes a los 7 días. En la *Figura 8.A* se ve como MiaPaca presenta notables diferencias de proliferación dependiendo del medio de cultivo utilizado. Con cualquiera de los medios de cultivo probados, muestra una proliferación menor que con el uso de RPMI. Cabe destacar que a los 7 días se sigue manteniendo la tendencia proliferativa de MiaPaca al utilizar el medio condicionado al 1% FBS de C2.1, comparando con aquellas cultivadas con EGM-2 MV 1%FBS -HC, como se puede ver en la *Figura 8.B*.



Por otra parte, en las figuras *Figura 9* y *Figura 10* se aprecia la tendencia proliferativa de la línea celular Bxpc3. En la *Figura 9* podemos observar la proliferación de Bxpc3 a los 2 días. Los únicos resultados concluyentes en esta situación es que, como se ve en *Figura 9.A*, el uso del medio EGM-

2 MV 5%FBS +HC proporciona una mayor proliferación de esta línea celular que si utilizamos los medios RPMI o de esferas.

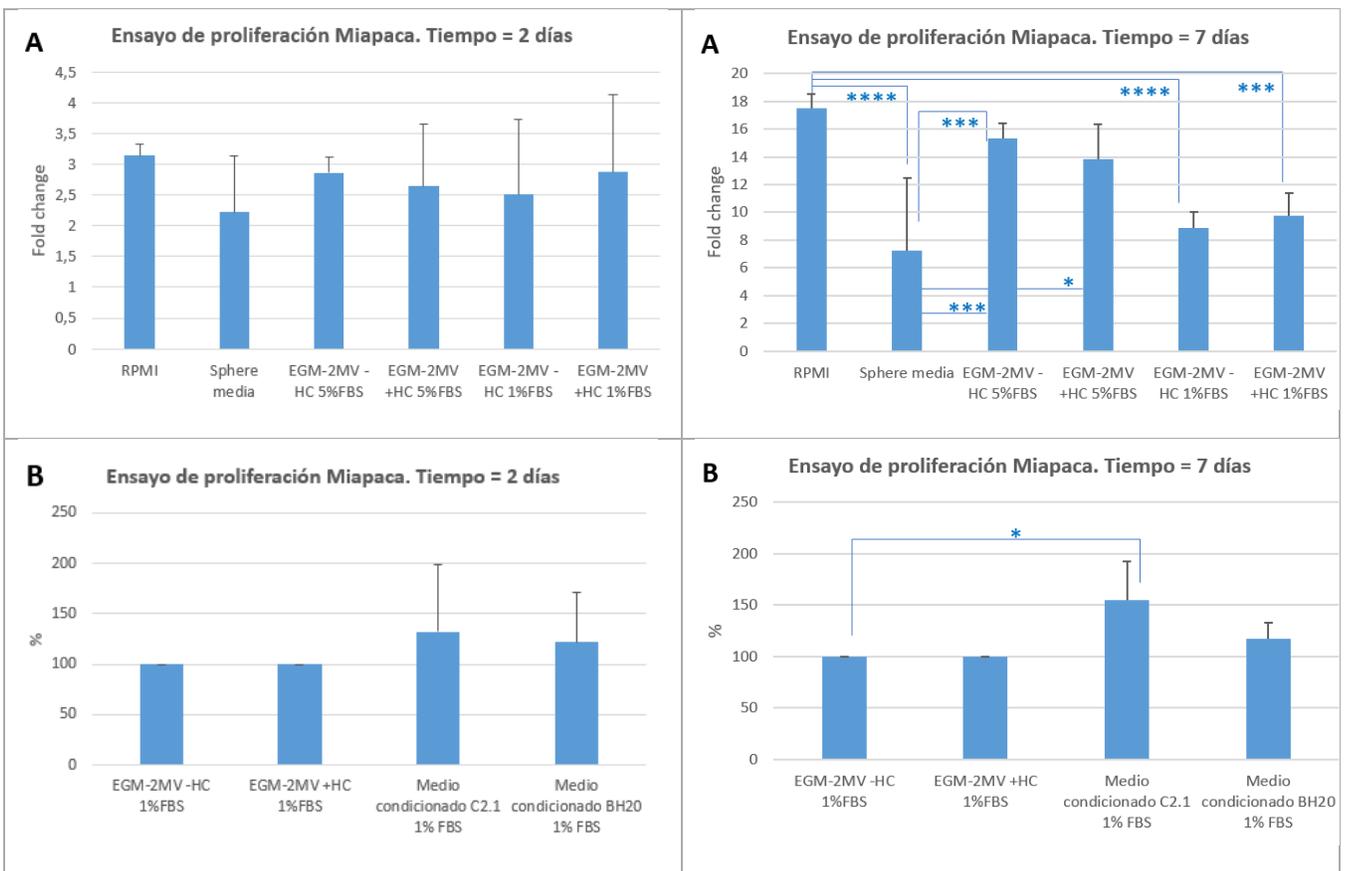
En la *Figura 10* se representan los mismos resultados, pero referentes a los 7 días. En la *Figura 10.A* se ve como Bxpc3 cultivadas con medio de esferas presentan un crecimiento significativamente menor que aquellas cultivadas con medio RPMI. En el caso de esta línea celular, los medios condicionados de células endoteliales no parecen afectar a la proliferación celular de una forma significativa.



### 5.1.2. Estudio de la proliferación celular de MiaPaca y Bxpc3 (Medidas cristal violeta)

El 'fold change' es una medida que hace referencia al crecimiento y proliferación de una línea celular al cabo de un número determinado de días con respecto a un tiempo original. En este caso, estudiamos cuánto crecen MiaPaca y Bxpc3 a los 2 y 7 días con respecto al control a las 0 horas.

En la *Figura 11.A* se puede observar el ‘fold change’ de la línea MiaPaca a los 2 días en función de los medios de cultivo utilizados, mientras que en la *Figura 12.A* se observan los mismos resultados pero referentes a los 7 días. Se podría decir que a los 2 días MiaPaca no presenta diferencias significativas de proliferación entre los diferentes medios de cultivo, pero a los 7 días sí muestra numerosas diferencias notables, y prolifera de forma distinta en función del medio utilizado. Los medios de células endoteliales al 1% de FBS, junto con el medio de esferas, inducen a una menor proliferación que el medio RPMI, a los 7 días. En las figuras *Figura 11.B* y *Figura 12.B* podemos observar cómo afectan los medios condicionados de células endoteliales a la proliferación de MiaPaca a los 2 y 7 días respectivamente. A los 2 días no se aprecian diferencias significativas, pero a los 7 días podemos confirmar una mayor proliferación de esta línea celular al utilizar medio condicionado de C2.1 al 1% FBS que con el uso de con EGM-2 MV 1%FBS -HC.



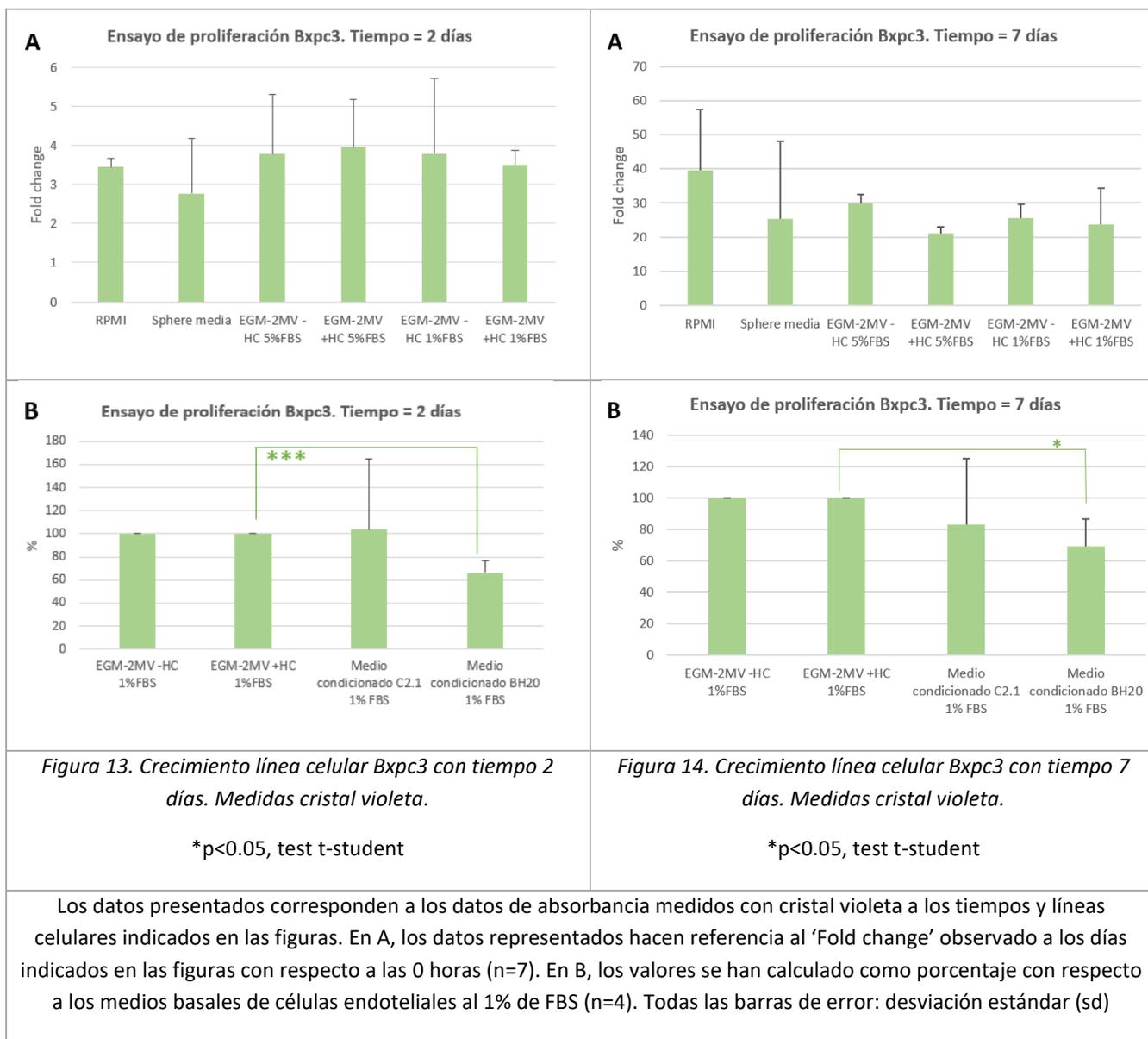
*Figura 11. Crecimiento línea celular MiaPaca con tiempo 2 días. Medidas cristal violeta.*

*Figura 12. Crecimiento línea celular MiaPaca con tiempo 7 días. Medidas cristal violeta.*

\*p<0.05, test ANOVA Bonferroni y test t-student

Los datos presentados corresponden a los datos de absorbancia medidos con cristal violeta a los tiempos y líneas celulares indicados en las figuras. En A, los datos representados hacen referencia al ‘Fold change’ observado a los días indicados en las figuras con respecto a las 0 horas (n=7). En B, los valores se han calculado como porcentaje con respecto a los medios basales de células endoteliales al 1% de FBS (n=4). Todas las barras de error: desviación estándar (sd)

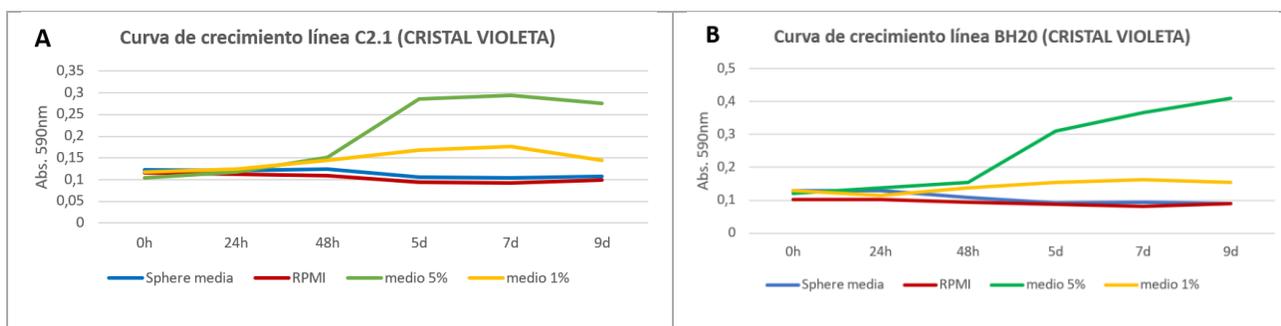
Por otra parte, estudiamos los mismos resultados pero referentes a la línea celular Bxpc3. En *Figura 13.A* y *Figura 14.A* se observan las veces de inducción de Bxpc3 en función de cada condición a los 2 y 7 días respectivamente. A ninguno de los dos tiempos podemos decir que existan diferencias significativas en la proliferación de esta línea celular, es decir, que Bxpc3 crece de forma similar independientemente del medio de cultivo utilizado. Por otra parte, en las *Figura 13.B* y *Figura 14.B* observamos el efecto de los medios condicionados de células endoteliales sobre la proliferación de Bxpc3 a los mismos tiempos. A los 2 días vemos cómo Bxpc3 muestra una menor proliferación con el uso del medio condicionado de células de adulto BH20 que con el uso de EGM-2 MV 1%FBS +HC, y los datos obtenidos a los 7 días nos harían confirmar esta tendencia en la proliferación.



## 5.2. Curva de crecimiento de líneas progenitoras endoteliales

En la *Figura 17* se representan las gráficas correspondientes a las curvas de crecimiento de las líneas progenitoras endoteliales. Este ensayo se realizó con la finalidad de poder estudiar cómo crecen estas líneas con los distintos medios de cultivo tanto a un corto como a largo plazo.

A corto plazo, en las primeras 24 horas, los medios de cultivo no parecen interferir en la proliferación celular, y no se observan diferencias significativas entre medios de cultivo. Sin embargo, a partir de las 24 horas sí que se observan cambios en la proliferación de cada línea celular en función del medio con el que han sido cultivadas. A este largo plazo, tanto la línea C2.1, *Figura 17.A*, como la línea BH20, *Figura 17.B*, muestran una mayor proliferación con el uso de los medios endoteliales: EGM-2 MV 5%FBS -HC y EGM-2 MV 5%FBS +HC; mientras que con los medios RPMI y de esferas no es que no exista una proliferación, si no que puede observarse incluso una disminución en la densidad celular.



*Figura 17. Curvas de crecimiento líneas progenitoras endoteliales: C2.1 y BH20*

*No se realizó un test estadístico sobre los datos obtenidos porque se considera que es un número muy bajo de repeticiones, sin embargo, en ambos casos se muestra el mismo patrón en la curva. (n=2)*

## 5.3. Ensayo de formación de esferas

En el ensayo de formación de esferas, el número de esferas contadas en un cultivo celular sería directamente proporcional al número de células madre tumorales al inicio del ensayo en condiciones de falta de anclaje al sustrato.

En la *Figura 18* se recogen los datos del número de esferas contadas en los distintos cultivos celulares de la línea Bxpc3. Podemos observar muchas diferencias significativas entre las distintas condiciones de medios con los que hemos cultivado nuestras células. En la *Figura 18.A* se observa que al utilizar el medio RPMI, EGM-2 MV 5%FBS +HC o EGM-2 MV 5%FBS -HC nos proporciona un mayor número de esferas observadas que si se utiliza el medio de cultivo EGM-2 MV 1%FBS +HC al cultivar las Bxpc3. Por otra parte, con el uso de EGM-2 MV 5%FBS +HC se aprecia un mayor número de esferas que con el medio de esferas. Sin embargo, el uso de medios condicionados de células progenitoras endoteliales no parece afectar notablemente a la capacidad de autorrenovación de las células madre tumorales del cultivo, como se ve en la *Figura 18.B*.

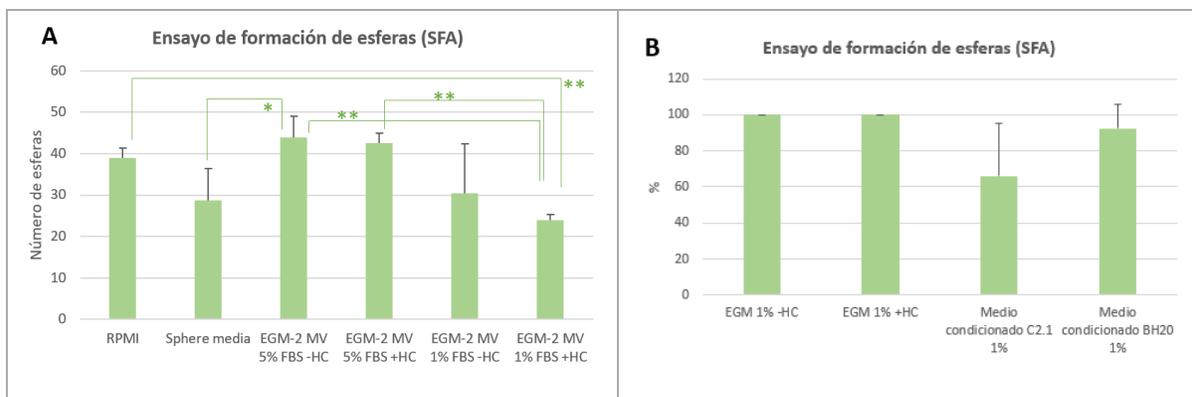


Figura 18. Ensayo de formación de esferas con línea celular Bxpc3

\*p<0.05, test ANOVA Bonferroni

En A, los datos representados hacen referencia al número de esferas observado a los 7 días de su cultivo (n=7). En B, los valores se han calculado como porcentaje con respecto a los medios basales de células endoteliales al 1% de FBS (n=4). Todas las barras de error: desviación estándar (sd)

#### 5.4. Ensayo de viabilidad de líneas progenitoras endoteliales tipo ECFC

El objetivo principal de este TFG es encontrar unas condiciones favorables en las que realizar un co-cultivo de células tumorales de páncreas y células progenitoras endoteliales, consideradas como modelo de células angiogénicamente activas.

En este ensayo de viabilidad se realiza un cultivo de células progenitoras endoteliales con diferentes medios de cultivos, pero en este caso, realizando combinaciones de medios de células endoteliales con medios de células tumorales.

En la *Figura 19* confirmamos que los medios de cultivo puros de células tumorales no permiten la proliferación de las células endoteliales. Por otra parte, podría resultar de interés seguir estudiando y probando alguna de las combinaciones de medios utilizadas en este experimento, dado que, al incluir medios de ambas líneas celulares, podría facilitar el co-cultivo buscado. Sería también necesario cultivar las células tumorales pancreáticas con estas combinaciones para ver si estas serían capaces de proliferar con estas condiciones.

Para las células C2.1, observamos en la *Figura 19.A* que algunas de las combinaciones que permiten una buena viabilidad y crecimiento celular serían las siguientes:

- 50% EGM-2 MV 1%FBS + 50% medio de esferas
- 50% EGM-2 MV 5%FBS + 50% medio de esferas
- 25% EGM-2 MV 5%FBS + 75% medio de esferas

Por otra parte, podemos ver en la *Figura 19.B* que las células BH20 que no presentan una viabilidad ni proliferación tan altas en comparación con la línea C2.1, que se tratan de células con una mayor

capacidad proliferativa. Una combinación de interés para esta línea celular sería 50% EGM-2 MV 1%FBS + 50% medio de esferas.

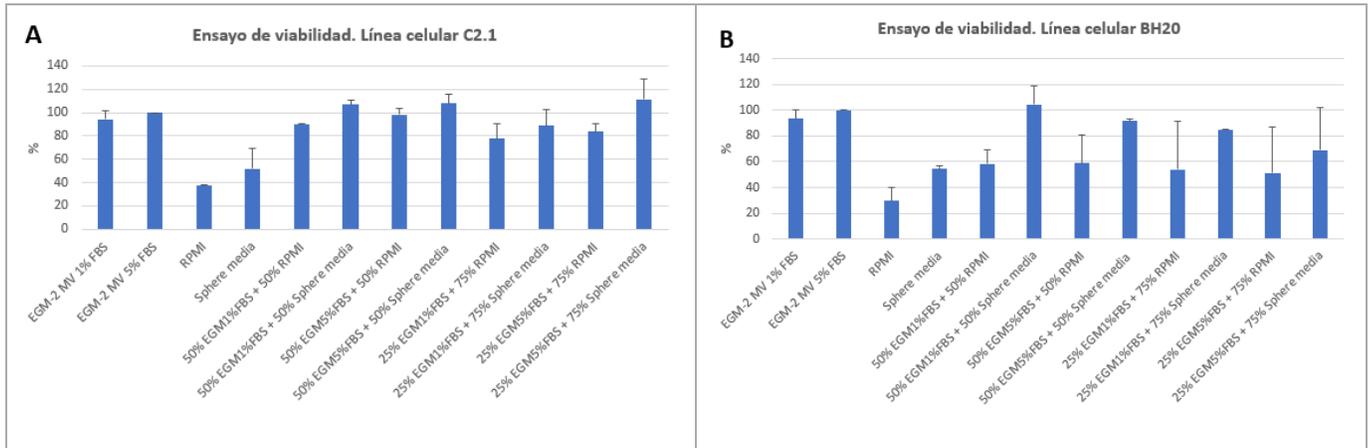


Figura 19. Ensayo de viabilidad de las líneas progenitoras endoteliales bajo distintas condiciones de medios.

Los datos presentados corresponden a los datos de fluorescencia medidos con resazurin a los 3 días de las líneas celulares indicadas en las figuras. En A y en B los datos se han calculado como porcentaje respecto al medio EGM-2 MV 5% FBS como control, tomado como valor de referencia. Todas las barras de error: desviación estándar (sd)

No se ha aplicado un test estadístico. (n=2) Pero el patrón de proliferación se mantiene en ambos experimentos.

### 5.5. Ensayo de angiogénesis

El objetivo del ensayo de angiogénesis realizado era comparar el efecto de medios condicionados por líneas celulares de cáncer de páncreas sobre la capacidad para desarrollar procesos angiogénicos de células endoteliales progenitoras.

En cuanto al ensayo de angiogénesis de la línea celular derivada de sangre de cordón, C2.1, obtuvimos los resultados representados en la *Figura 20*. Se puede observar que esta línea celular forma estructuras angiogénicas, es decir, podemos ver la formación de bastantes estructuras tubulares, mediante el uso del medio EGM-2 MV 1% FBS (*Figura 20.A*). Este medio es el basal con el que crecen habitualmente. En la *Figura 20.B* también se ve la formación de estructuras tubulares con el uso del medio RPMI, aunque no existen tantas estructuras en comparación con el caso anterior. Por otro lado, no se aprecia apenas la formación de capilares en el caso del uso de los medios condicionados de MiaPaca y Bxpc3, como vemos en *figura 20.C* y *figura 20.D* respectivamente. Parece que el medio RPMI disminuye la capacidad angiogénica de las células, pero en pequeña medida. Sin embargo, los medios condicionados de MiaPaca y Bxpc3 parecen impedir apreciablemente el desarrollo de procesos angiogénicos en las células derivadas de sangre de cordón umbilical, lo cual permitiría hipotetizar que factores secretados al medio por las células tumorales serían capaces de inhibir o modular dichos procesos angiogénicos.

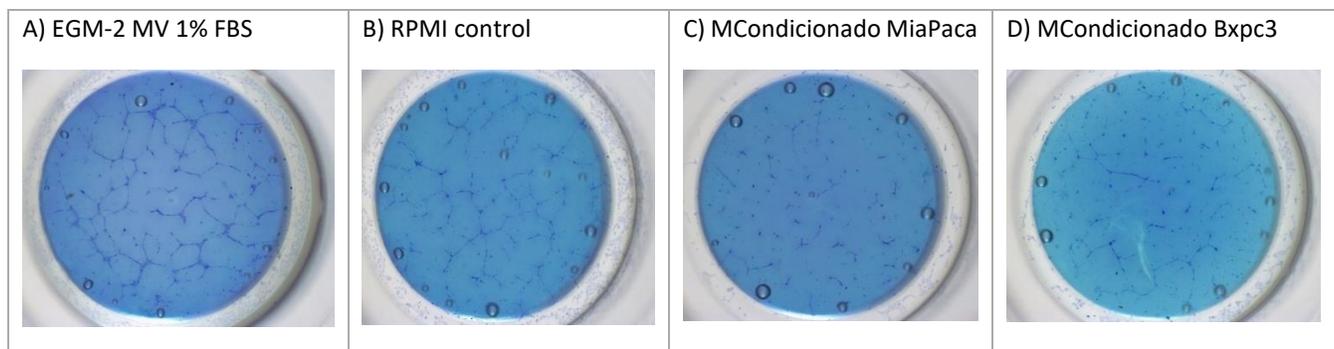


Figura 20. Ensayo de angiogénesis de las células C2.1

El ensayo fue realizado una única vez, y las fotos fueron tomadas a las 22 horas de su cultivo en la placa de angiogénesis.

En la *Figura 21* se encuentran recogidas las fotos referentes a la formación de estructuras tubulares por parte de la línea celular BH20. En general, las células de adulto (BH20) parecen generar estructuras tubulares más robustas, forjadas y conectadas que las células de cordón umbilical (C2.1). En el caso de esta línea celular cabe destacar cómo afectan los medios condicionados al proceso angiogénico. Por otra parte, cabe destacar que, en células de cordón, la exposición al medio RPMI no condicionado (*Figura 20.B*) no tiene gran influencia sobre el desarrollo del proceso angiogénico, mientras que en las células de adulto sí da lugar a un menor desarrollo de aparición de estructuras (*Figura 21.B*). Por último, ambos medios condicionados por células tumorales tienen un efecto negativo sobre las células de cordón umbilical, mientras que para las células de adulto el medio condicionado por MiaPaca permitiría desarrollar estructuras mejor que el medio RPMI no condicionado. Podría decirse que el medio condicionado por Bxpc3 inhibiría el proceso angiogénico de manera similar para células de cordón y de adulto.

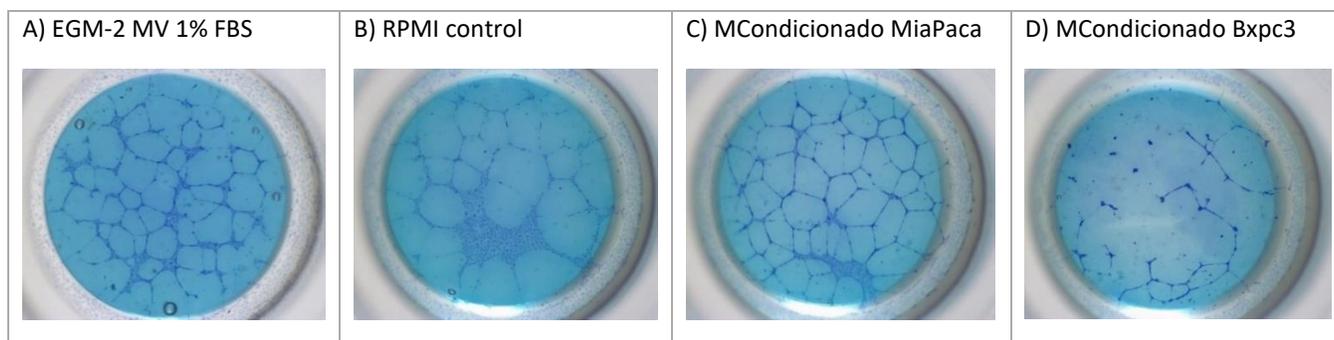


Figura 21. Ensayo de angiogénesis de las células BH20

El ensayo fue realizado una única vez, y las fotos fueron tomadas a las 22 horas de su cultivo en la placa de angiogénesis.

## 6. DISCUSIÓN

Todos los resultados obtenidos a lo largo de los experimentos realizados en este TFG nos encaminarían a la búsqueda y estudio de unas condiciones favorables para realizar el co-cultivo de células tumorales pancreáticas y células progenitoras endoteliales, utilizadas como modelo de células angiogénicamente activas.

Las líneas tumorales de páncreas, aunque a largo plazo puedan mostrar ciertas diferencias significativas en la proliferación celular en función del medio de cultivo utilizado, siempre muestran una tasa de proliferación creciente. Esto significa que se tratan de unas líneas celulares bastante tolerantes a las distintas condiciones probadas sobre ellas. En este contexto, la línea Bxpc3 parece ser más tolerante y adaptarse mejor a las distintas condiciones que MiaPaca, lo cual podría indicarnos que Bxpc3 podría ser la línea tumoral indicada para la realización del co-cultivo. Sin embargo, los ensayos de angiogénesis parecen mostrar que el medio condicionado de la línea Bxpc3 no permite la formación de estructuras tubulares por parte de las células endoteliales, lo cual nos permitiría hipotetizar que los factores secretados al medio por Bxpc3 podrían impedir la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes por parte de las células progenitoras endoteliales. Debido a este problema, podríamos inclinarnos hacia el uso de la línea MiaPaca para el co-cultivo, porque, aunque muestre mayores diferencias significativas entre medios, ninguno de los ellos frena la proliferación. Además, el medio condicionado de células MiaPaca sí que parece permitir el proceso angiogénico por parte de las células BH20, que parecen llevar a cabo el proceso angiogénico mejor que la línea C2.1. Los experimentos de este TFG también mostraron que, en un principio, factores secretados por células de adulto BH20 no parecen interferir en el crecimiento de dicha línea celular tumoral.

Las células progenitoras endoteliales muestran mayores problemas a la hora de proliferar en medios diferentes a su medio basal correspondiente que las líneas tumorales. Es por esto por lo que una posibilidad para realizar el co-cultivo en cuestión (MiaPaca con BH20) sería mediante el uso de medio EGM-2 MV 5% FBS con hidrocortisona. Por una parte, permite una óptima proliferación de células BH20 al tratarse de su medio de cultivo basal, y por otra, también se ha visto que no existen diferencias significativas entre utilizar medio RPMI o EGM-2 MV 5% FBS con hidrocortisona a la hora de cultivar células MiaPaca. Además, el uso de este medio no interfiere en la autorrenovación de las células madre tumorales de nuestro cultivo.

## 7. CONCLUSIONES

- MiaPaca parece ser una línea celular más selectiva que Bxpc3 en cuanto a las condiciones óptimas para proliferar.
- Factores secretados al medio por células derivadas de cordón umbilical C2.1 parecen aumentar y estimular la proliferación de células MiaPaca, y factores secretados por células de adulto BH20 parecen dificultar la proliferación de células tumorales Bxpc3.
- Las líneas tumorales pancreáticas son más tolerantes a adversidades en las condiciones de cultivo que las líneas progenitoras endoteliales. Por tanto, para la realización de un co-cultivo entre ambas líneas, sería interesante fijarse o tener más en cuenta el conseguir unas condiciones favorables para las endoteliales y poder observar en ellas una proliferación, ya que en las tumorales siempre observamos proliferación independientemente del medio utilizado.
- Los factores secretados por células endoteliales no parecen en principio afectar a la capacidad de autorrenovación de las células madre cancerígenas pancreáticas.
- Los factores secretados por las células tumorales pancreáticas podrían ser capaces de inhibir o modular los procesos angiogénicos llevados a cabo por las células derivadas de sangre de cordón umbilical.

## CONCLUSIONS

- MiaPaca appears to be a more selective cell line than Bxpc3 in terms of optimal conditions for proliferation.
- Factors secreted into the medium by C2.1 umbilical cord-derived cells appear to enhance and stimulate the proliferation of MiaPaca cells, and factors secreted by adult BH20 cells appear to hinder the proliferation of Bxpc3 tumor cells.
- Pancreatic tumor lines are more tolerant to adversities in culture conditions than endothelial progenitor lines. Therefore, in order to carry out a co-culture between the two lines, it would be interesting to focus on achieving favorable conditions for the endothelial lines and to be able to observe proliferation in them, since we always observe proliferation in the tumor lines regardless of the medium used.
- Factors secreted by endothelial cells do not appear in principle to affect the self-renewal capacity of pancreatic cancer stem cells.
- Factors secreted by pancreatic tumor cells might be able to inhibit or modulate angiogenic processes carried out by cord blood-derived cells.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Pancreatic Cancer Action Network – Research, Patient Support, Resources [Internet]. Pancreatic Cancer Action Network. 2021 [cited 19 November 2021]. Available from: <https://www.pancan.org/>
2. Annese T, Tamma R, Ruggieri S, Ribatti D. Angiogenesis in Pancreatic Cancer: Pre-Clinical and Clinical Studies. *Cancers*. 2019;11(3):381.
3. Murakami T, Hiroshima Y, Matsuyama R, Homma Y, Hoffman R, Endo I. Role of the tumor microenvironment in pancreatic cancer. *Annals of Gastroenterological Surgery*. 2019;3(2):130-137.
4. Ho W, Jaffee E, Zheng L. The tumour microenvironment in pancreatic cancer — clinical challenges and opportunities. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2020;17(9):527-540.
5. Diccionario de cáncer del NCI [Internet]. Instituto Nacional del Cáncer. 2021 [cited 12 November 2021]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/microambiente-tumoral>
6. Alsina-Sanchis E, Mülfarth R, Fischer A. Control of Tumor Progression by Angiocrine Factors. *Cancers*. 2021;13(11):2610.
7. Componentes celulares del microambiente tumoral [Internet]. Research Gate. 2021 [cited 10 November 2021]. Available from: [https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Componentes-celulares-del-microambiente-tumoral-Modificado-a-partir-del\\_fig1\\_334404657](https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Componentes-celulares-del-microambiente-tumoral-Modificado-a-partir-del_fig1_334404657)
8. Xing F. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Frontiers in Bioscience*. 2010;15(1):166.
9. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban R, Goggins M. Pancreatic cancer. *The Lancet*. 2011;378(9791):607-620.
10. Sahin I, Turen S, Santapuram P, Sahin I. The tumor microenvironment of pancreatic adenocarcinoma and immune checkpoint inhibitor resistance: a perplex relationship. *Cancer Drug Resistance*. 2020;.
11. Adair T, Montani J. Angiogenesis. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2021.
12. ANGIOGÉNESIS - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019 [Internet]. Seom.org. 2021 [cited 23 November 2021]. Available from: <https://www.seom.org/43-Socios%20-%20Formaci%C3%B3n%20y%20Recursos/Bases%20de%20la%20Oncolog%C3%ADa/157-angiogenesis?start=0>
13. Zhang Z, Ji S, Zhang B, Liu J, Qin Y, Xu J et al. Role of angiogenesis in pancreatic cancer biology and therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;108:1135-1140.
14. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *BioMed Research International*. 2015;2015:1-13.
15. Sánchez Socarrás V. Papel de la Angiogénesis en el crecimiento tumoral. SCIELO [Internet]. 2021 [cited 16 November 2021];. Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002001000300010](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002001000300010)
16. Archivo:Angiogenesis.jpg - Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. Es.wikipedia.org. 2021 [cited 23 November 2021]. Available from: <https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Angiogenesis.jpg>

17. Jun J, Rathore A, Younas H, Gilkes D, Polotsky V. Hypoxia-Inducible Factors and Cancer. *Current Sleep Medicine Reports*. 2017;3(1):1-10.
18. Marçola M, Rodrigues C. Endothelial Progenitor Cells in Tumor Angiogenesis: Another Brick in the Wall. *Stem Cells International*. 2015;2015:1-10.
19. Garmy-Susini B, Varner J. Circulating endothelial progenitor cells. *British Journal of Cancer*. 2005;.
20. CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES (CEPs) - IBIAN Technologies [Internet]. IBIAN Technologies. 2021 [cited 23 November 2021]. Available from: <https://www.ibiantech.com/celulas-progenitoras-endoteliales-ceps/>
21. Zhao X, Liu H, Li J, Liu X. Endothelial progenitor cells promote tumor growth and progression by enhancing new vessel formation. *Oncology Letters*. 2016;12(2):793-799.