

PAPEL DEL TEJIDO ADIPOSO EN LAS PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES DEL CÁNCER DE PÁNCREAS

Trabajo Final de Máster

ALBA ROYO GARCÍA

Máster en Biología Molecular y Celular

Directora: Patricia Sancho Andrés

Co-directora: Marta Mascaraque Checa

Instituto de Investigación Sanitaria Aragón, IISA

Grupo de Investigación: Metabolismo y Células Madre Tumorales

Zaragoza, Junio 2022



Universidad
Zaragoza

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer la gran acogida que he tenido en el grupo de la Dra. Patricia Sancho “Metabolismo y Células Madre Tumoraes”, así como el hecho de incluirme en una de sus principales líneas de investigación. Además, me gustaría dar las gracias a la Dra. Sancho por su tiempo y dedicación para que este proyecto fuera posible, por ser mi supervisora y directora del trabajo. Gracias a la confianza depositada en mí desde un primer momento, ha hecho que me convierta en una persona independiente en el laboratorio. Del mismo modo, me gustaría agradecer a mi co-directora, la Dra. Marta Mascaraque por todo el apoyo y ayuda que me ha prestado en el desarrollo de este trabajo. Gracias por resolver mis dudas y darme los mejores consejos.

Por otro lado, agradezco al resto de miembros del grupo, Pilar Espiau, Paula Martín, Isabel Villaoslada, Beatriz Parejo y María Blasco por su constante apoyo durante la realización del presente trabajo. Además, la unión y el buen ambiente que existe en el grupo son increíbles. Gracias por todos los momentos que hemos pasado juntas en el laboratorio durante todo este tiempo. Estas prácticas me han permitido crecer tanto profesional como personalmente, además de seguir adquiriendo conocimientos relacionados con el cáncer de páncreas y su metabolismo.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia y mi pareja por todo el apoyo constante que me han dado desde el primer momento.

LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ADP	Adenocarcinoma ductal pancreático
AGs	Ácidos grasos
ATP	Adenosín trifosfato (del inglés, <i>adenosine triphosphate</i>)
CPT1	Carnitina palmitoil transferasa 1 (del inglés, <i>Carnitine Palmitoyltransferase 1</i>)
CSCs	Células madre tumorales (del inglés, <i>cancer stem cells</i>)
EMT	Transición epitelio-mesénquima (del inglés, <i>epithelial-mesenchymal transition</i>)
FACS	Separación de células activadas por fluorescencia (del inglés, <i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i>)
FASN	Sintasa de ácidos grasos (del inglés, <i>Fatty Acid Synthase</i>)
FATP	Proteína de transporte de ácidos grasos (del inglés, <i>Fatty Acid Transport Protein</i>)
FBS	Suero fetal bovino (del inglés, <i>fetal bovine serum</i>)
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés, <i>fibroblast growth factor</i>)
GLs	Gotas lipídicas
hMSC	Células madre mesenquimales humanas (del inglés, <i>Human Mesenchymal Stem Cells</i>)
MCA	Medio condicionado de adipocitos
MCM	Medio condicionado de mesenquimales
PDXs	Xenoinjertos derivados de pacientes (del inglés, <i>Patient-Derived Xenografts</i>)
TAGs	Triacilglicéridos
TCA	Ciclo del ácido tricarbóxico (del inglés, <i>tricarboxylic acid cycle</i>)

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS.....	3
1.1.1 LA OBESIDAD COMO PRINCIPAL FACTOR DE RIESGO EN EL ADP.....	3
1.2 CÉLULAS MADRE TUMORALES	4
1.3 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DEL ADP.....	5
1.3.1 METABOLISMO LIPÍDICO	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 CULTIVOS PRIMARIOS DE XENOINJERTOS DERIVADOS DE PACIENTES.....	12
3.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS	13
3.3 MANTENIMIENTO, TRIPSINIZACIÓN Y PASE DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE PDXs Y hMSC	15
3.3.1 CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS	15
3.3.2 RECUENTO CELULAR Y SIEMBRA PARA EXPERIMENTOS	16
3.4 CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN DE hMSC A ADIPOCITOS	16
3.5 COCULTIVO DE ESFERAS DE PDXs CON ADIPOCITOS	17
3.6 ANÁLISIS DE DATOS HUMANOS	18
3.7 DIFERENCIACIÓN Y ACUMULACIÓN LIPÍDICA.....	18
3.7.1 TINCIÓN ORO.....	18
3.7.2 CONTENIDO DE TAGs	19
3.8 ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	19
3.9 CARACTERIZACIÓN A NIVEL DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	20
3.9.1 EXTRACCIÓN DE ARN.....	20
3.9.2 TRANSCRIPCIÓN REVERSA.....	21
3.9.3 RT-qPCR	22
3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	24
4.2 EFECTO DEL MCA SOBRE EL FENOTIPO CSC.....	25
4.3 PUESTA A PUNTO DE LAS CONDICIONES DEL SISTEMA DE COCULTIVO	26
4.4 EFECTOS FENOTÍPICOS EN RESPUESTA AL COCULTIVO	29

4.4.1	EFFECTOS FENOTÍPICOS EN ADIPOCITOS EN RESPUESTA AL COCULTIVO	30
4.4.2	EFFECTOS FENOTÍPICOS Y FUNCIONALES EN ESFERAS DE ADP EN RESPUESTA AL COCULTIVO	32
5.	CONCLUSIONES	36
6.	CONCLUSIONS	37
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	38
8.	BIBLIOGRAFÍA	39
	ANEXO I	47

RESUMEN

El adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) es uno de los tumores más mortales con peor pronóstico, cuya incidencia se prevé que aumente en la próxima década. La obesidad constituye un factor de riesgo importante que puede influir promoviendo la progresión tumoral. Por otro lado, su agresividad intrínseca, potencial metastásico y quimioresistencia, se debe, en gran medida, a la subpoblación de células madre tumorales (CSCs) que contiene. Las CSCs pancreáticas son altamente dependientes del metabolismo lipídico, lo que favorece el fenotipo de CSC. En particular, los triacilglicéridos (TAGs) almacenados en gotas lipídicas constituyen una fuente principal energética para las células cancerosas. Estudios previos han asociado la captación de lípidos del microambiente tumoral con la progresión tumoral del ADP. Por ello, el objetivo de este trabajo es estudiar la comunicación entre los adipocitos y las CSCs en cáncer de páncreas.

En el presente estudio se ha determinado por análisis bioinformático una sobre-expresión de genes del metabolismo lipídico en el tejido de ADP. La incubación de cultivos primarios de ADP con medio condicionado de adipocitos redujo el contenido de CD133⁺ e incrementó en esta subpoblación el contenido lipídico. Como consecuencia, se optó por un cocultivo indirecto entre esferas de ADP y adipocitos. Por un lado, el contenido de TAGs en el sobrenadante de cocultivos incrementó, mientras que en los adipocitos en cocultivo hubo una menor acumulación de TAGs. Además, en las esferas de ADP hubo un ligero incremento en el contenido lipídico de las CD133⁺. Por otro lado, no hubo diferencias en el contenido de CD133⁺ de las esferas provenientes de cocultivo, confirmado por la expresión de los genes de pluripotencia. Por último, los genes de EMT, SLUG y ZEB1 se sobre-expresaron. Además, se determinó que los lípidos derivados de los adipocitos podrían ser captados por el transportador CD36, sobre-expresado en esferas de ADP.

En conclusión, los adipocitos desempeñan un papel importante sobre la funcionalidad de las CSCs pancreáticas, así como induciendo cambios metabólicos en las mismas. De hecho, los adipocitos actúan como donadores de lípidos en las células de ADP, pero el destino de los mismos no está claro ya que existen indicios de un comportamiento diferencial entre líneas celulares. Como resultado, esta puesta a punto ha demostrado que existe una comunicación entre los adipocitos y las CSCs de ADP, lo que incita a profundizar más en el papel del metabolismo lipídico y concretamente del tejido adiposo en el ADP.

Palabras clave: Adenocarcinoma ductal de páncreas; células madre tumorales; adipocitos; metabolismo lipídico; lípidos; ácidos grasos

ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most lethal tumours with the worst prognosis, the incidence of it is expected to increase in the next decade. Obesity is an important risk factor that can influence tumour progression. On the other hand, its intrinsic aggressiveness, metastatic potential and chemoresistance are largely due to the subpopulation of tumour stem cells (CSCs) it contains. Pancreatic CSCs are highly dependent on lipid metabolism, which favours the CSC phenotype. In particular, triacylglycerides (TAGs) stored in lipid droplets constitute a major energy source for cancer cells. Previous studies have associated lipid uptake from tumour microenvironment with PDAC tumour progression. Therefore, the aim of this work is to study the communication between adipocytes and CSCs in pancreatic cancer.

In the present study, an overexpression of lipid metabolism genes in PDAC tissue was determined by bioinformatics analysis. Incubation of primary PDAC cultures with conditioned adipocyte medium reduced the CD133⁺ content and increased the lipid content in this subpopulation. As a consequence, an indirect coculture between PDAC spheres and adipocytes was chosen. On the one hand, the TAGs content in the co-culture supernatant increased, whereas in the co-cultured adipocytes there was lower TAGs accumulation. In addition, there was a slight increase in the lipid content of CD133⁺ in PDAC spheres. On the other hand, there was no difference in the CD133⁺ content from coculture's spheres, confirmed by the expression of pluripotency genes. Finally, EMT, SLUG and ZEB1 genes were overexpressed. Moreover, it was determined that adipocyte-derived lipids could be taken up by the CD36 transporter which was over-expressed in PDAC spheres.

In conclusion, adipocytes play an important role on the functionality of pancreatic CSCs, as well as inducing metabolic changes on them. In fact, adipocytes act as lipid donors in PDAC cells, but the fate of lipids is not clear since there is evidence of differential behaviour between cell lines. As a result, this set-up has demonstrated that there is communication between adipocytes and PDAC CSCs, prompting further investigation in the role of lipid metabolism and specifically adipose tissue in PDAC.

Keywords: pancreatic ductal adenocarcinoma; cancer stem cells; adipocytes; lipid metabolism; lipids; fatty acids

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS

El adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP) es una enfermedad extremadamente letal a corto plazo debido, entre otros factores, a su elevada quimioresistencia y a la falta de terapias eficaces. El ADP se considera uno de los tumores sólidos más agresivos y es la forma más común de cáncer de páncreas, representando más del 90% de todas las neoplasias pancreáticas (1). Actualmente se trata de uno de los cánceres más letales a nivel mundial, constituyendo la séptima causa de muerte relacionada con el cáncer (2,3), con una tasa de supervivencia global a 5 años del 10% tras el diagnóstico (4).

La eficacia y el éxito de los tratamientos del ADP vienen determinados, principalmente, por el estadio de la enfermedad tras el diagnóstico. Hoy en día, la cirugía junto con la quimioterapia es la única opción curativa disponible para pacientes con ADP. No obstante, el 80-90% de los pacientes son diagnosticados en estadios avanzados/metastásicos de la enfermedad y la mayoría de ellos mueren en los 12 meses siguientes al diagnóstico debido a la falta de terapias efectivas (4–6). Teniendo en cuenta su creciente incidencia, extrema agresividad y falta de tratamientos eficaces, se prevé que el cáncer de páncreas se convierta en la segunda causa más frecuente de muertes por cáncer en 2030 (4,7,8). Dos de los factores de riesgo más importantes y con gran implicación en el desarrollo del ADP, son la obesidad (9,10) y el síndrome metabólico (11).

Ciertos estudios han demostrado que el 95% de los pacientes con ADP tienen mutaciones comunes en el oncogén KRAS que conducen a una activación constante de su vía de señalización. La mutación de KRAS es el evento genético iniciador del ADP que, a su vez impulsa el crecimiento y mantenimiento de la progresión del tumor pancreático (12,13). Además, las proteínas RAS desempeñan un papel importante en procesos clave como la proliferación, la diferenciación celular, la migración, la evasión del sistema inmune y la apoptosis (7,12). La mutación de KRAS también controla tanto la tumorigénesis como la reprogramación metabólica (14,15), de hecho, recientemente se ha evidenciado que el oncogén KRAS controla el almacenamiento y utilización de los ácidos grasos (AGs) (16).

1.1.1 LA OBESIDAD COMO PRINCIPAL FACTOR DE RIESGO EN EL ADP

La obesidad está asociada a un mayor riesgo de padecer diferentes tipos de cáncer, incluido el de páncreas (17). Diversos estudios han evidenciado que la obesidad y el consumo de dietas ricas en grasas incrementan notablemente la incidencia y mortalidad del cáncer de páncreas (18–20). Por ello, se considera uno de los factores de riesgo más importantes en el desarrollo del ADP (9,10), particularmente en pacientes con un incremento de la adiposidad abdominal (21).

Se ha descrito que la mayoría de los pacientes con ADP presentan un exceso de peso en el momento del diagnóstico (22). El aumento del peso corporal y del tejido graso vienen acompañados por una inflamación crónica sistémica, cambios metabólicos sistémicos,

desequilibrios hormonales (citoquinas, adipoquinas, factores de crecimiento) y una gran disfunción vascular (23). Además, el páncreas es un órgano rodeado de tejido adiposo, componente estromal importante involucrado en la invasión extrapancreática del ADP (24). De hecho, la invasión de grasa peripancreática en humanos se asoció con un mal pronóstico en pacientes con ADP (25).

Por tanto, la disponibilidad de nutrientes en el microambiente tumoral favorecen el crecimiento tumoral, la invasión y metástasis en modelos de ADP (24,26). En conjunto, todos estos factores agravan el resultado de los pacientes con cáncer de páncreas, por lo que es necesario desarrollar nuevos enfoques terapéuticos.

1.2 CÉLULAS MADRE TUMORALES

Una de las características que define el ADP es la presencia de distintos niveles de heterogeneidad intratumoral (27). El ADP se caracteriza por su elevada quimioresistencia a las terapias convencionales, la rápida recaída tras tratamiento y la formación de metástasis en órganos secundarios, principalmente en hígado y pulmón. Todo ello se atribuye a una subpoblación específica de células cancerosas con propiedades iniciadoras del tumor, conocidas como células madre tumorales (CSCs, del inglés, *cancer stem cells*) pancreáticas (28).

Las CSCs se caracterizan por ser capaces de autorenovarse, es decir, llevar a cabo una división celular ilimitada conservando su identidad de célula madre, y por otro lado la capacidad de dar lugar a células diferenciadas de proliferación limitada (28,29). Además, estas células son las promotoras del proceso tumorigénico en el páncreas, desde la iniciación, expansión y progresión de la formación del tumor hasta la posible aparición de metástasis (29,30).

La figura 1 refleja que las CSCs se caracterizan por dar lugar a las diferentes progenies diferenciadas dentro de cada subclon del tumor primario, lo que constituye la heterogeneidad intraclonal. Las CSCs evolucionan a través de alteraciones genéticas y en respuesta a señales del microambiente, dando lugar a subclones de CSCs con distinta funcionalidad (29). Tanto las CSCs como las células diferenciadas pueden llevar a cabo una transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés, *epithelial-mesenchymal transition*) y adquirir movilidad e invadir otras partes del organismo (Figura 1) (29). No obstante, las CSCs son las únicas capaces de iniciar lesiones secundarias en otros órganos, es decir, de producir metástasis. Esto se debe a que estas células pueden sobrevivir en el torrente sanguíneo como células tumorales circulantes (29,31).

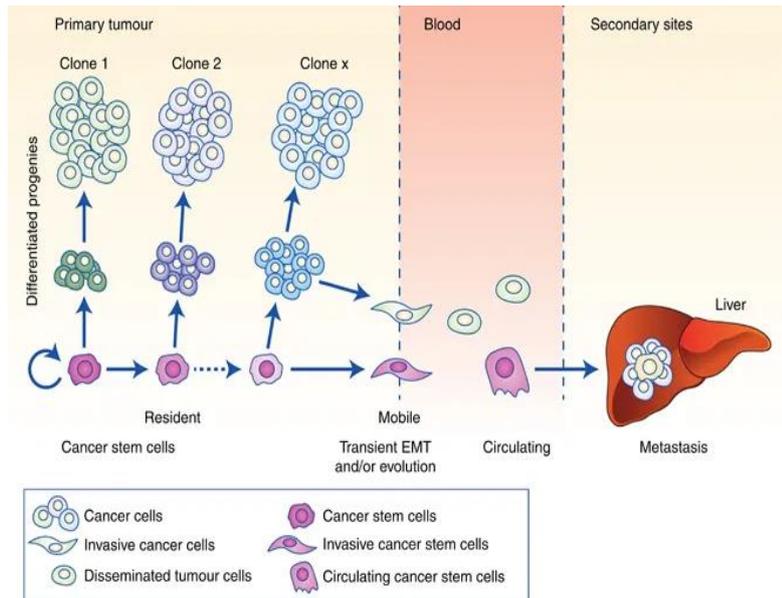


Figura 1. Concepto de CSCs en la progresión del cáncer y metástasis (29). Las CSCs y sus progenies diferenciadas dentro de cada subclon forman la heterogeneidad intraclonal. Se refleja la capacidad de las CSCs de dar lugar a células diferenciadas con proliferación limitada, así como la iniciación de lesiones secundarias.

Por tanto, dado que las CSCs constituyen una de las principales fuentes de resistencia y metástasis en pacientes con ADP debido a su capacidad de EMT, identificar vulnerabilidades en estas células es crucial para diseñar estrategias terapéuticas más eficaces contra el ADP.

1.3 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DEL ADP

Un rasgo distintivo de los tumores de ADP es la presencia de un estroma denso desmoplásico que puede constituir hasta el 90% del volumen del tumor (32–34), impidiendo una correcta vascularización. Todo ello genera un microambiente hipóxico donde predominan la falta de oxígeno y nutrientes, causando estrés metabólico (35). En consecuencia, las células tumorales llevan a cabo una reprogramación metabólica, rasgo distintivo del cáncer, necesaria para impulsar el crecimiento y la división celular (35,36).

Cuando las células cancerosas se encuentran en estas condiciones, incrementan la absorción de nutrientes y potencian el flujo de las vías anabólicas. Las células de ADP tienen un programa metabólico único, caracterizado por un mayor consumo de glucosa y glutamina, captación de lípidos y proteínas, y reutilización de componentes intracelulares a través de la autofagia (37–39). Recientemente, nuestro grupo ha propuesto una clasificación del ADP en términos metabólicos generales como glucolítico o lipogénico (40), con un pronóstico diferencial (41).

La glucólisis ha sido considerada hasta el momento clave en el metabolismo del cáncer. No obstante, cada vez son más los estudios que demuestran la alta dependencia de numerosos tipos de células tumorales de la respiración mitocondrial (42,43). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que las CSCs pancreáticas son sustancialmente sensibles a fármacos dirigidos a la mitocondria, debido a su gran

dependencia de la fosforilación oxidativa (44,45). El metabolismo oxidativo permite abastecer las altas demandas energéticas de las CSCs pancreáticas. Principalmente, se debe a su capacidad de utilizar un gran rango de sustratos para producir energía mediante el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA, del inglés, *tricarboxylic acid cycle*) (42,44). En consecuencia, las CSCs pancreáticas son capaces de proliferar, promover la recurrencia de la enfermedad, desarrollar metástasis y producir resistencia a fármacos antitumorales (42).

1.3.1 METABOLISMO LIPÍDICO

Los tumores de ADP son altamente dependientes del metabolismo lipídico (46,47). Se ha demostrado que una dieta alta en grasa acelera el crecimiento tumoral y el proceso de metástasis en modelos murinos de ADP (26,47). Los lípidos actúan en las células tumorales a tres niveles diferentes: a) proporcionan una de las principales fuentes de energía para estimular el crecimiento celular (48,49); b) actúan como moléculas de señalización para activar vías intracelulares implicadas en la regulación del crecimiento (27,46) y c) son imprescindibles para la formación de la membrana celular durante la proliferación, al ser uno de los principales componentes (27,46,48). De forma general las células tumorales poseen dos fuentes principales de lípidos: lípidos exógenos y lípidos de síntesis endógena, obtenidos mediante la lipogénesis.

Las principales fuentes exógenas de lípidos en forma de AGs son: la dieta, la síntesis hepática o bien liberados por el tejido adiposo (46,47). La importación de AGs exógenos requiere de la glicoproteína o transportador de membrana CD36, así como de proteínas de unión a los AGs (lipoproteínas) (Figura 2) (49,50). Estudios recientes han puesto de manifiesto el papel de CD36 en la importación de AGs a las células cancerosas y en la regulación de la β -oxidación mitocondrial en varios tipos de tumores, como el cáncer gástrico (51), cáncer de próstata (52), carcinoma oral y cáncer de ovario (53). La β -oxidación es una vía bioenergética muy importante en diferentes tipos de cáncer ya que favorece la proliferación, metástasis y resistencia al tratamiento (49,54).

La familia de transportadores lipídicos FATP (del inglés, *Fatty Acid Transport Protein*)/SLC27A (compuesto por seis miembros) expresados en la membrana de las células tumorales, también tienen un papel clave en la captación de AGs de cadena larga exógenos (55,56). Las proteínas FATP se expresan de forma diferencial en una gran variedad de tejidos y células (55,56). De hecho, se ha evidenciado que la proteína FATP1 está sobreexpresada en melanomas e implicada en la captación de lípidos liberados por adipocitos, incrementando la progresión, crecimiento e invasión del melanoma (57). Por otro lado, una expresión alta de la FATP4 se ha asociado con la tumorigenesis y progresión tumoral en carcinoma de células renales de células claras (58) y en cáncer de mama (59).

La síntesis *de novo* de lípidos, es decir, la lipogénesis es la otra principal fuente de AGs de las células tumorales. Ciertos estudios han determinado que las células de ADP presentan una lipogénesis altamente activada (47), mediante la cual se obtienen más del 93% de los AGs-triacilglicéridos (TAGs) gracias a los diferentes enzimas involucrados (60). La

sobreexpresión de estos enzimas, principalmente la adenosina trifosfato-citrato liasa y la sintasa de AGs (FASN, del inglés, *Fatty Acid Synthase*) resulta en la activación de la lipogénesis. Estos enzimas utilizan el citrato mitocondrial proveniente del TCA como sustrato para la producción de AGs tales como ácido oleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico y ácido mirístico (Figura 2) (47,49,60).

De hecho, la expresión alta del enzima FASN se ha asociado con una escasa respuesta tras el tratamiento con gemcitabina (quimioterapia convencional para el ADP) en células de cáncer de páncreas, y con un mal pronóstico en pacientes con ADP (47,60). Además, la capacidad tumorigénica y de auto renovación de las CSCs así como la supervivencia, se ha relacionado con una elevada síntesis *de novo* de lípidos en diferentes cánceres (61–64).

Así pues, el aumento de la captación y reciclaje de lípidos (37,65), así como un metabolismo aberrante de los AGs, se han asociado a la progresión tumoral en estadios avanzados y mal pronóstico en pacientes de cáncer de páncreas (46,66). Como consecuencia, el metabolismo lipídico se ha convertido en un objetivo interesante para diseñar nuevas estrategias terapéuticas contra las CSCs, de hecho, en los últimos años se han probado varios compuestos contra éste (27).

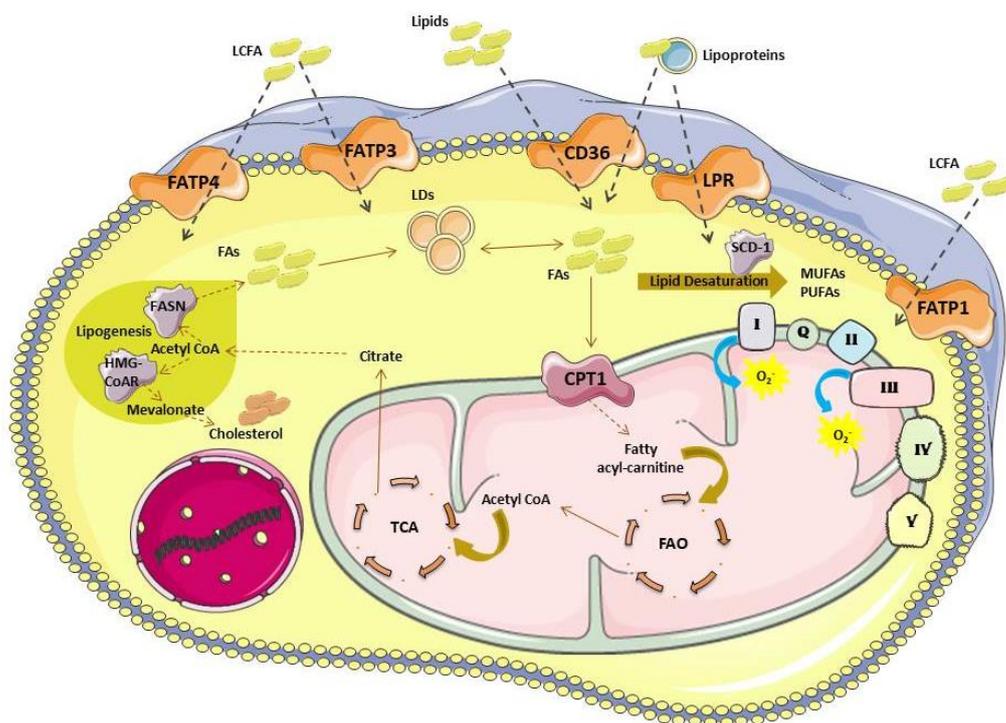


Figura 2. Vías metabólicas involucradas en el metabolismo lipídico de las CSCs. FATP1 (*Fatty acid transport 1*); FATP3 (*Fatty acid transport 3*); FATP4 (*Fatty acid transport 4*); LCFA (*Long-chain fatty acid*); LPR (*Lipoproteins*); SCD-1 (*Stearoyl-CoA desaturase-1*); FASN (*Fatty Acid Synthase*); CPT1 (*Carnitine Palmitoyltransferase I*); TCA (*Tricarboxylic acid cycle*); FAO (*Fatty acid oxidation*). Figura adaptada de (26).

1.3.1.1 GOTAS LIPÍDICAS COMO FUENTE LIPÍDICA INTERNA

Las gotas lipídicas (GLs) son unos orgánulos intracelulares dinámicos que se encuentran en el citoplasma celular con funciones clave para la homeostasis lipídica y energética (Figura 2) (67,68). Las GLs almacenan moléculas de TAGs formadas por modificación de los AGs mediante las acil-CoA sintetasas. Después, los AGs se esterifican y dan lugar a los TAGs que junto con esteres de colesterol forman las GLs (67,68).

Los lípidos contenidos en las GLs son catabolizados por lipólisis mediante la acción de diferentes lipasas, las cuales hidrolizan de forma secuencial los TAGs en AGs libres (67,69). De este modo, estos AGs se pueden movilizar hacia diferentes compartimentos celulares como la mitocondria, donde tiene lugar la β -oxidación para producir energía en forma de adenosín trifosfato (ATP, del inglés, *adenosine triphosphate*) (27). Algunos de los reguladores de la β -oxidación mitocondrial tienen un papel clave en la movilización de los AGs. Una de ellas es la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1, del inglés, *Carnitine Palmitoyltransferase 1*), enzima mitocondrial responsable de la translocación de los AGs del citosol a la mitocondria a través de la membrana mitocondrial externa (42,49). De hecho, se ha determinado una mayor expresión de la isoforma CPT1A en tumores pancreáticos quimiorresistentes (70).

Por tanto, las GLs sirven como una fuente de sustratos lipídicos y energía para las células cancerosas, en particular para la β -oxidación en situaciones de estrés nutricional (49,67) y estrés hipóxico (49). Teniendo en cuenta que las GLs regulan diferentes procesos celulares, no es de extrañar que en los últimos años se hayan asociado una acumulación de GLs con: a) la progresión y agresividad del cáncer (60,67,71); b) un aumento de la agresividad tumoral (72); c) la resistencia a la quimioterapia (73) y d) la capacidad de invasión celular (71).

Las GLs favorecen no sólo el crecimiento tumoral, sino también la quimioresistencia, metástasis y recaída de la enfermedad en múltiples cánceres (49,71,73), procesos estrechamente relacionados con las CSCs (69). Así pues, algunas de las funciones de las CSCs están reguladas por la β -oxidación como el mantenimiento de la pluripotencia, quimiorresistencia (74) y capacidad metastática (75) tras reducir los niveles de especies reactivas de oxígeno (76). Es decir, se ha demostrado que existe una relación directa entre el contenido de GLs y el carácter de pluripotencia en diferentes cánceres como el de páncreas (77,78), ovario (79), mama (80) y colorrectal (77). De hecho, Tirinato *et al* (81) demostraron que las CSCs colorrectales separadas en alto o bajo contenido de GLs formaban tumores en ratones inmunodeprimidos, aunque eran más pequeños en el caso de un bajo contenido de GLs. Por tanto, observaron que las células con un alto contenido de GLs aumentan el potencial tumorigénico (81). En consecuencia, las GLs desempeñan un papel fundamental en la progresión tumoral pancreática.

1.3.1.2 ADIPOCITOS COMO FUENTE LIPÍDICA EXÓGENA

Los adipocitos constituyen el tipo celular más especializado en el almacenamiento lipídico en GLs, constituidas principalmente en forma de TAGs (85). A partir de estos se lleva a cabo la lipólisis para obtener los AGs (82). Además, son células endocrinas capaces de producir múltiples hormonas y quimioquinas (23,82). Entre las principales moléculas secretadas por los adipocitos incluyen adipoquinas como la leptina o adiponectina, así como otros factores derivados como IL-6 o TNF- α (23,83). Matsuda. M *et al* (84) demostraron que el aumento en pacientes obesos de la insulina, adipoquinas y del estrés oxidativo son responsables del inicio y progresión del cáncer de páncreas.

Se han descrito dos mecanismos principales por los cuales los adipocitos influyen en el crecimiento de las células cancerosas. Por un lado, los adipocitos secretan adipocitoquinas responsables de activar diferentes vías de señalización que promueven el crecimiento de las células tumorales (50), la EMT (83,84), y, específicamente, la leptina tiene la capacidad de activar dianas que potencian la renovación de las CSCs y la quimioresistencia (74). Por otro lado, los adipocitos modifican el metabolismo de las células tumorales mediante la liberación de metabolitos y biomoléculas con el objetivo de potenciar su crecimiento (50).

En general, las moléculas solubles liberadas desde los depósitos de grasa presentes en los adipocitos, podrían tener un impacto en el microambiente pancreático tumoral (23). De hecho, ciertos estudios han revelado que las interacciones entre células tumorales y adipocitos situados en el microambiente tumoral pueden proporcionar lípidos a las células cancerosas e incrementar el crecimiento de los cánceres de mama (85), ovario (86), próstata (87) y páncreas (9,88). Además, la elevada captación de lípidos se asocia con un peor pronóstico de los pacientes con ADP (9).

Por tanto, dado las condiciones tan austeras que se encuentran en el microambiente tumoral, los adipocitos podrían actuar como una fuente de nutrientes para las CSCs pancreáticas. Gyamfi. J *et al* (50) recientemente han demostrado que las células de cáncer de mama se aprovechan de los sustratos energéticos provenientes de los adipocitos del entorno tumoral. Este proceso se lleva a cabo mediante la importación de AGs a través del transportador CD36, activando diferentes vías de señalización que impulsan la progresión del tumor. Del mismo modo, Zhang. M *et al* (57) han evidenciado que los lípidos derivados de adipocitos adyacentes son transferidos a las células de melanoma a través de la proteína FATP1, que resulta en la alteración del metabolismo de las células tumorales.

En conjunto, se sugiere que las CSCs necesitan captar, almacenar y metabolizar AGs para conservar su capacidad tumorigénica y metastásica. Además, el tejido adiposo tiene un papel central como nexo entre la obesidad y el riesgo de desarrollar ADP. Por lo tanto, estos datos sugieren que la disponibilidad de lípidos y la señalización del tejido adiposo contribuyen a la progresión del ADP. Por ello, se decide estudiar la comunicación entre los adipocitos y las CSCs de cáncer de páncreas (Figura 3).

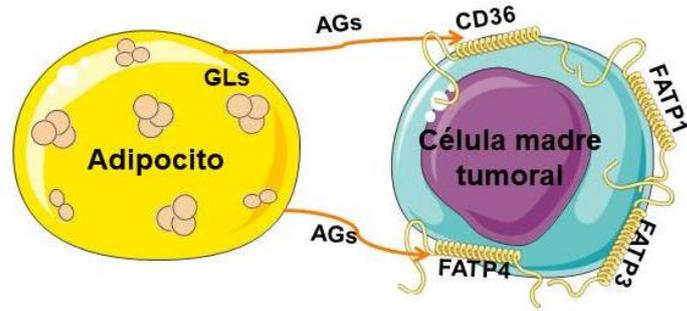


Figura 3. Resumen gráfico de la comunicación entre los adipocitos y las CSCs pancreáticas. Se representan los adipocitos como almacenamiento de GLs y donadores de AGs a las CSCs. Del mismo modo, se representan las CSCs expresando diferentes transportadores de membrana de AGs.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estudios previos del grupo de investigación indican que el metabolismo y la señalización de lípidos tienen un papel esencial en la agresividad del cáncer de páncreas, favoreciendo distintas características del fenotipo de las CSCs. Entre ellas destaca la tumorigenicidad, quimioresistencia y capacidad metastásica. Por tanto, nuestra hipótesis es que la presencia de adipocitos en el microambiente tumoral pancreático favorece el fenotipo agresivo de las CSCs, al proporcionar AGs que pueden utilizarse como fuente de energía, almacenamiento o bien como activadores de la señalización a través de mediadores lipídicos.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo es estudiar la comunicación entre los adipocitos y las CSCs en cáncer de páncreas. De acuerdo a lo anterior se plantean los siguientes objetivos:

- Elaborar un patrón de genes del metabolismo lipídico que se sobre-expresen en el tejido de ADP y se correlacionen con una firma de pluripotencia y EMT
- Evaluar si hay diferencias en cultivos primarios de ADP a nivel de pluripotencia y acúmulo lipídico al cultivarlas con medio condicionado de adipocitos (MCA)
- Comparar si existen diferencias entre cocultivos directos e indirectos de esferas de cultivos primarios de ADP con adipocitos
- Valorar los efectos fenotípicos en los adipocitos en respuesta al cocultivo en función del acúmulo lipídico
- Estudiar los efectos fenotípicos y funcionales en esferas de cultivos primarios de ADP en respuesta al cocultivo a nivel de pluripotencia, acúmulo lipídico y expresión génica

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CULTIVOS PRIMARIOS DE XENOINJERTOS DERIVADOS DE PACIENTES

Con el objetivo de obtener las células utilizadas en este estudio, el grupo de investigación tiene una fuente ilimitada de cultivos primarios derivados de tumores humanos de ADP. Los xenoinjertos derivados de pacientes (PDXs, del inglés, *Patient-Derived Xenografts*) con ADP (185 y 265) se obtuvieron del Biobanco del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas de España (CNIO), Madrid, España. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Johns Hopkins.

Los fragmentos de tumores fueron implantados subcutáneamente en ambos costados de ratones inmunodeprimidos FOXN1-nu/nu (Laboratorios Janvier, Francia) antes de su uso *in vitro*. Una vez que estos presentaban un crecimiento considerable del tumor, se sometieron a cirugía donde se extirparon los tumores correspondientes a las diferentes líneas primarias (185 y 265). A continuación, se disociaron los tumores y se establecieron los cultivos primarios *in vitro*.

En primer lugar, se cubrió una placa de Petri con 10 mL de gelatina al 2% (Merck Millipore, Alemania) y se incubó a temperatura ambiente aproximadamente 1 hora. En paralelo, los tumores se disgregaron mecánicamente (aplastados con una jeringa) y posteriormente se disgregaron enzimáticamente mediante la acción secuencial de 3 mL de colagenasa P (Roche Diagnostics, Suiza) (1,5 mg/mL en medio Eagle modificado por Dulbecco con mezcla de nutrientes Ham's F12 (DMEM-F12, del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Ham's F-12 Nutrient Mixture*) (Gibco™, ThermoFisher Scientific, Reino Unido) durante 30 minutos a 37°C, y 3 mL de tripsina 1X (Corning®, EE.UU) durante 3 minutos a 37°C. Cada reacción se detuvo con 10 mL de medio Instituto Conmemorativo Roswell Park 1640 (RPMI 1640, del inglés, *Roswell Park Memorial Institute 1640*) (Gibco™, ThermoFisher Scientific, Reino Unido) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco™, ThermoFisher Scientific, Reino Unido) y 50 unidades/mL de penicilina/estreptomina (Corning®, EE.UU), lo que se denominó medio completo, y se centrifugó a 1800 rpm durante 10 minutos en la centrifuga 5810R (Eppendorf®, España).

A continuación, las muestras se filtraron a través de un tamiz celular de 100 µM (Falcon™, ThermoFisher Scientific, Reino Unido) y de 40 µM (Falcon™, ThermoFisher Scientific, Reino Unido) secuencialmente, con el objetivo de aislar las células tumorales. Finalmente, la suspensión celular se centrifugó en las mismas condiciones anteriores y el *pellet* se resuspendió en 10 mL de medio DMEM-F12 suplementado con 2% de B27 (Gibco™, ThermoFisher Scientific, Reino Unido), 50 unidades/mL de penicilina/estreptomina y 20 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante (bFGF) (Pan-Biotech, GmbH, Alemania), lo que se denominó medio DMEM-F12 completo. El B27 es un suplemento que se añade al medio de cultivo en sustitución al FBS presente en el medio RPMI 1640 completo. Se caracteriza por favorecer el crecimiento celular, ya que aporta factores de crecimiento, vitaminas y proteínas necesarias para las células.

Seguidamente, la suspensión celular se transfirió a la placa de Petri con gelatina, previamente lavada con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco™, ThermoFisher Scientific, Reino Unido). La placa se incubó durante 1 hora y 15 minutos a 37°C en el incubador (Nuair, EE.UU), con el objetivo de que los fibroblastos se quedaran fijados a la gelatina y las células de ADP permanecieran en suspensión. Por último, la suspensión celular se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos y el *pellet* se resuspendió en 15 mL de medio RPMI 1640 completo y se incubaron a 37°C en un flask T75 (ThermoFisher Scientific, EE.UU). Así pues, se obtienen los cultivos primarios de los PDXs (185 y 265) (Figura 4).

Todo el procedimiento se realizó en cabina de flujo laminar de clase II (Nuair, USA). Los cultivos primarios se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Con la finalidad de tener en cuenta la heterogeneidad intertumoral y validar los resultados obtenidos, los experimentos se llevaron a cabo con 2 cultivos primarios de PDXs.

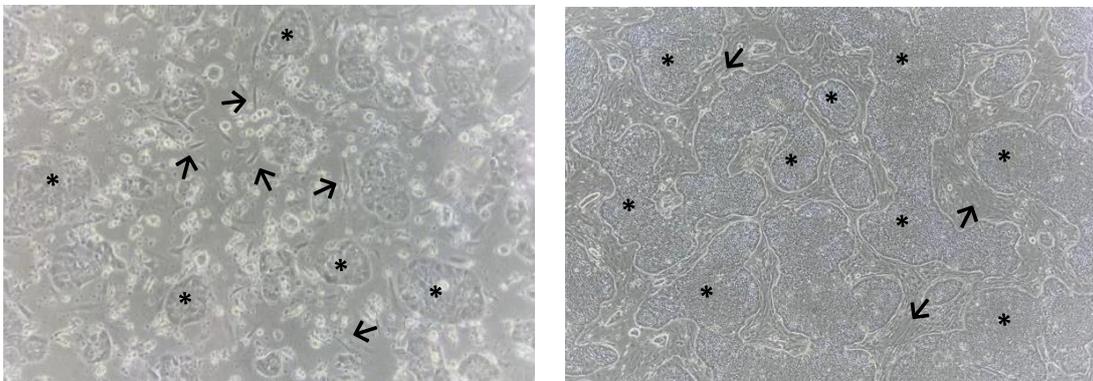


Figura 4. Cultivo primario establecido de la línea celular 185. Izquierda: Se observan colonias celulares (*) y fibroblastos (→). Derecha: Las colonias formadas son más grandes y el número de fibroblastos es menor tras realizar una tripsinización diferencial durante tres días.

3.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS

Para conseguir células madre mesenquimales humanas (hMSC), pacientes pertenecientes al servicio de cirugía general y aparato digestivo del Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza), se sometieron a una cirugía bariátrica. A partir de esta se obtuvieron biopsias de tejido graso subcutáneo (SC) derivados de dichos pacientes (78SC y 74SC). Todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito y el estudio fue aprobado por el Comité de Revisión Institucional de Ética de Aragón (CEIC-A). Las muestras y los datos de los pacientes incluidos en este estudio fueron proporcionados por el Biobanco del Sistema de Salud de Aragón (PT20/00112), integrado en la Red Nacional de Biobancos de España, y se procesaron siguiendo procedimientos operativos estándar con la correspondiente aprobación de los Comités Ético y Científico. Las muestras fueron donadas por parte del Biobanco del Sistema de Salud de Aragón al grupo de investigación AdipoFat, el cual nos cedió las líneas celulares de estudio.

En la tabla 1 se reflejan los datos pertinentes de los pacientes de los cuales derivan las líneas celulares de estudio.

Tabla 1. Datos de los pacientes a partir de los cuales se obtienen las líneas celulares de estudio. IMC: Índice de masa corporal; SC: Subcutáneo.

PACIENTE	TEJIDO	SEXO	INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	IMC	ENFERMEDADES CRÓNICAS
78	SC	Masculino	ByPass gástrico	57,8 Kg/m ²	Hipercolesterolemia, Hipertensión arterial y obesidad ginoide
74	SC	Femenino	Sleeve gástrico	50,9 Kg/m ²	Dislipemia

A partir de las muestras de tejido graso que darán lugar a cada línea celular, se procedió a su digestión con el objetivo de obtener hMSC o fibroblastos. En primer lugar, los fragmentos de grasa subcutánea se cortaron en trozos y se digirieron mediante medio de digestión, medio DMEM bajo en glucosa (Gibco™, ThermoFisher Scientific, Reino Unido) que contiene 1 mg/mL de glucosa, 1 mM de piruvato de sodio, 4 mM de glutamina y suplemento de 1,5 mg/mL de colagenasa (Sigma-Aldrich, EE.UU), 10 mg/mL de albumina de suero bovino (Sigma-Aldrich, EE.UU) y 120 µL de penicilina/estreptomicina (ThermoFisher Scientific, Reino Unido) durante 1h a 37°C en agitación. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos y se lisaron los glóbulos rojos mediante el tampón de lisis celular (NaOH 0,2 M (Emsure®, Merck Millipore, Alemania) con SDS al 10% (ThermoFisher Scientific, Reino Unido)) durante 2 minutos a temperatura ambiente e invirtiendo manualmente. Seguidamente, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se *pellet* se lavó con PBS. Después, se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones y las muestras se resuspendieron en 2 mL de medio DMEM bajo en glucosa suplementado con 10% de FBS. Se transfirieron a una placa de 6 pocillos (ThermoFisher Scientific, EE.UU) y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Una vez establecidas las células se transfirieron a un flask T75. De este modo, se obtienen los cultivos primarios de hMSC (Figura 5).

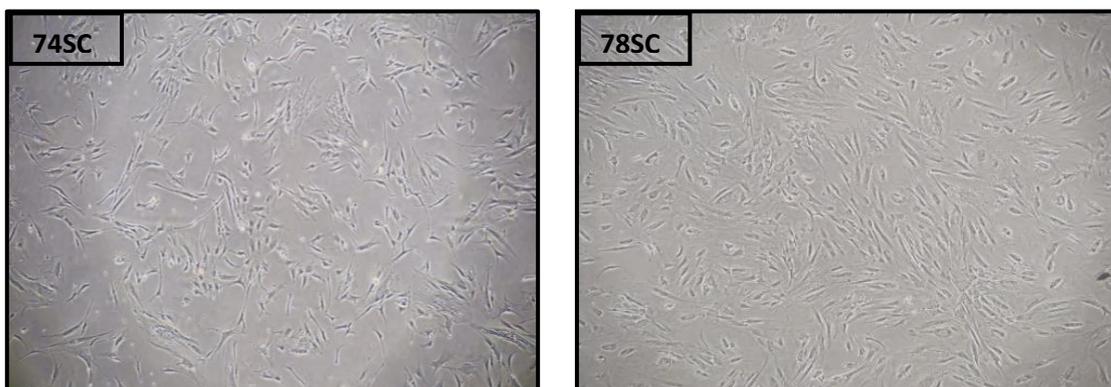


Figura 5. Cultivos primarios de las líneas hMSC 74SC y 78SC sin diferenciar.

3.3 MANTENIMIENTO, TRIPSINIZACIÓN Y PASE DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE PDXs Y hMSC

Tanto los PDXs como las células hMSC se caracterizan por ser células que crecen en adherencia, por ello, se cultivaron en flasks T75 en 10 mL de medio RPMI 1640 completo o medio DMEM bajo en glucosa, respectivamente. Se realizó un seguimiento de la proliferación de las células cada semana mediante su visualización en el microscopio binocular invertido Nikon Eclipse TS100 (BIRIDEN, Uruguay), con sus consecuentes cambios de medio. Las células se manipularon en cabina de flujo laminar de clase II, y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

Una vez las células alcanzaron una confluencia del 80% o superior, se realizó una tripsinización y resiembra a un flask o placa nueva, proceso conocido como pase. En primer lugar, se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS. Seguidamente, se añadió 4 mL/flask de tripsina 1X suplementada con 0,2% de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Alfa Aesar, ThermoFisher Scientific, EE.UU) en PDXs o 2 mL/flask de tripsina-EDTA (0,05%) 1X (Gibco™, ThermoFisher Scientific, Reino Unido) en hMSC, y se incubó 5 minutos a 37°C. La tripsina junto con el EDTA (compuesto quelante) favorece la disociación de los PDXs debido a la escisión de las proteínas de la membrana de adhesión. Como resultado, las células se encuentran en suspensión. Seguidamente, se añadió 8 mL/flask de medio RPMI 1640 completo (PDXs) o 4 mL/flask de medio DMEM bajo en glucosa (hMSC) para neutralizar el efecto de la tripsina. A continuación, se recogió el volumen total.

En función del proceso que se quería realizar se hacía una dilución para mantener las células en cultivo y expandirlas, se congelaron y/o se llevó a cabo el conteo de las mismas para sembrar y realizar experimentos. En el primer caso, se cogió el volumen necesario de suspensión celular y se pasó a un flask nuevo, completando el volumen hasta 10 mL con medio RPMI 1640 completo o DMEM bajo en glucosa. Después, los flask se incubaron a 37°C.

3.3.1 CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS

Para mantener un *stock* de los diferentes cultivos primarios se congelan células de forma rutinaria cuando se encuentran en pases bajos.

En primer lugar, para la congelación de células se siguió el proceso de tripsinización descrito en el apartado anterior. La suspensión celular se centrifugó a 1200 rpm 5 minutos y el *pellet* se resuspendió en 1 mL de FBS suplementado con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, EE.UU) en PDXs o 1 mL de medio DMEM alto en glucosa (Gibco™, ThermoFisher Scientific, Reino Unido), que contiene 4,5 mg/mL de glucosa, 1 mM de piruvato de sodio, 4 mM de glutamina suplementado con 10% de FBS y 5% de DMSO en hMSC. El DMSO es un agente crioprotector que protege a las células durante la congelación. Seguidamente, la suspensión celular se transfirió a un criotubo (ThermoFisher Scientific, EE.UU), en el caso de las hMSC se congelaron entre 200.000-250.000 células/criotubo, el cual se congeló a -80°C en el recipiente de congelación Mr. Frosty™ Cryo 1°C Freezing

Container (NALGENE®, EE.UU). El Frosty contiene isopropanol, lo que permite congelar las células a una velocidad próxima a $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, velocidad óptima para su conservación. Pasadas 24h, el criotubo se puede almacenar por un tiempo largo en tanques de nitrógeno líquido.

En segundo lugar, el proceso de descongelación de las células provenientes del nitrógeno líquido debe ser rápido debido a la presencia de DMSO, ya que resulta tóxico para las células a temperatura ambiente. Los criotubos se llevaron al baño de agua SUB Aqua Pro (Nirco, España) a 37°C hasta que la suspensión celular se descongeló. Seguidamente, el contenido del criotubo se vertió a un tubo y se añadieron 9 mL de medio RPMI 1640 completo o medio DMEM bajo en glucosa. Después, se centrifugó y el *pellet* se resuspendió en 1 mL de medio RPMI 1640 completo o medio DMEM bajo en glucosa y se sembró en un flask T25 (ThermoFisher Scientific, EE.UU) completando hasta 5 mL de medio RPMI 1640 completo o medio DMEM bajo en glucosa.

3.3.2 RECUENTO CELULAR Y SIEMBRA PARA EXPERIMENTOS

Tras llevar a cabo la tripsinización, se resembraron las células para realizar los diferentes experimentos. Para ello, la suspensión celular se centrifugó 5 minutos a 1200 rpm y el *pellet* se resuspendió en medio RPMI 1640 completo o medio DMEM bajo en glucosa. A continuación, se realizó el conteo con 10 μL de suspensión celular en una cámara de recuento Blaubrand™ Neubauer (ThermoFisher Scientific, EE.UU). Una vez conocida la densidad celular, se calculó el volumen necesario en función del número de células requeridas para realizar un experimento determinado. En el caso de las hMSC se sembraron entre 200.000-300.000 células/placa de 6 pocillos en 2 mL/pocillo de DMEM bajo en glucosa para posteriormente diferenciarlas.

3.4 CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN DE hMSC A ADIPOCITOS

Cuando las células alcanzaron la confluencia en las placas de 6 pocillos, se recogió medio y se utilizó como medio condicionado de mesenquimales (MCM). Posteriormente, los pocillos se lavaron dos veces con PBS y se realizó la diferenciación de hMSC a adipocitos mediante medio de diferenciación DMEM alto en glucosa suplementado con 500 μM Isobutyl-1-Methylxanthine (Sigma-Aldrich, EE.UU), 1,67 μM Insulina (Novo Nordisk, España), 1 μM Dexamethasone (Sigma-Aldrich, EE.UU), 1 μM Rosiglitazone (Sigma-Aldrich, EE.UU) y 10% de FBS. El medio se cambió cada 3 días.

Pasados los 6 días de diferenciación, cuando se obtuvieron los adipocitos (Figura 6), el medio se retiró y se cambió por medio DMEM alto en glucosa que contiene 4,5 mg/mL de glucosa, 1 mM de piruvato de sodio, 4 mM de glutamina y 10% de FBS. Las células se incubaron durante 3-4 días en dicho medio y se utilizaron dependiendo del experimento realizado. Este medio de mantenimiento se recogió a tiempos diferentes y se utilizó como MCA. Todas las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO_2 .

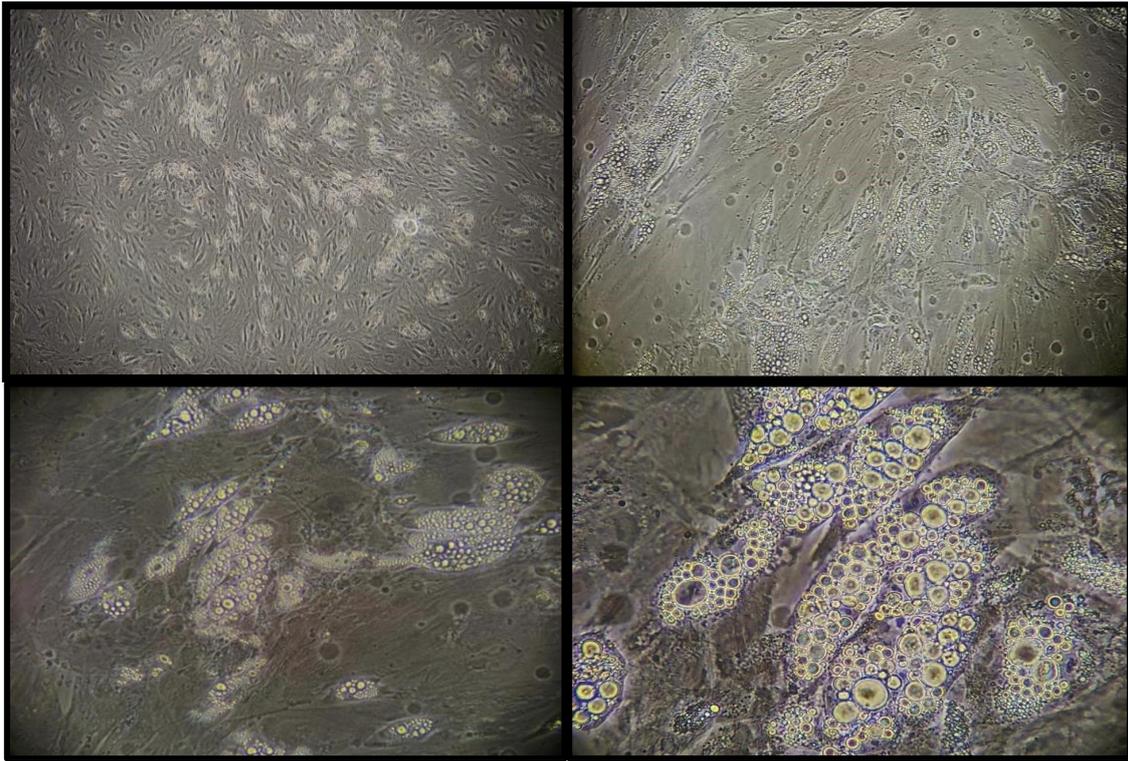


Figura 6. Adipocitos obtenidos tras el proceso de diferenciación de la línea 745C. Aumentos: 4X; 10X; 20X; 40X.

3.5 COCULTIVO DE ESFERAS DE PDXs CON ADIPOCITOS

Para estudiar la interacción entre los adipocitos y esferas de PDXs de cáncer de páncreas, se llevaron a cabo cocultivos de ambos tipos celulares. Previamente, se realizó la puesta a punto de las diferentes condiciones de cultivo, donde la condición óptima para ambos tipos celulares establecida fue de medio DMEM-F12 al 5% de FBS.

Al mismo tiempo que los adipocitos se diferenciaban, se sembraron 4-5 millones de células/flask (PDXs) en 40-50 mL de medio DMEM-F12 al 2% de B27 en flask T75 no adherentes. Estos flask habían sido previamente recubiertos con un 10% de poly-2-hidroxietilmacrilato (polyHEMA, Sigma-Aldrich, EE.UU). Este polímero impide la adhesión de las células en las placas, fomentando la formación de esferas en suspensión. El polyHEMA se preparó disolviendo la cantidad necesaria en etanol absoluto (VWR Chemicals BDH, Avantor, EE.UU) a una concentración final de 10 mg/mL. Posteriormente, se añadieron 5 mL/flask y se incubaron a 37°C toda la noche. Una vez sembradas las células en los flask de polyHEMA, las esferas se formaron al cabo de 7 días.

Cuando los adipocitos estaban listos para realizar experimentos, se realizó el cocultivo de dos formas diferentes. Por un lado, se llevó a cabo un cocultivo directo: las esferas de PDXs se cocultivaron sobre los adipocitos en placas de 6 pocillos en 2 mL de medio DMEM-F12 al 5% de FBS. Por otro lado, se realizó un cocultivo indirecto en insertos de cultivo celular Thermo Cc Insert Md24 8My Dim 8/13 mm (ThermoFisher Scientific,

EE.UU). Tras 48h se analizó la comunicación entre los adipocitos o hMSC y las esferas de PDXs de ADP mediante diferentes técnicas que serán explicadas posteriormente, tinción *Oil Red O* (ORO) (Sigma-Aldrich, EE.UU), cuantificación de TAGs, análisis por citometría de flujo y expresión génica.

3.6 ANÁLISIS DE DATOS HUMANOS

Los datos de expresión del tejido humano de ADP y del tejido normal se analizaron utilizando el servidor web GEPIA2 (muestras provenientes de las bases de datos TCGA y GTEx). El coeficiente de correlación de Pearson (R) se calculó para estudiar la asociación de los genes reflejados en la Figura 7 con: una firma de pluripotencia definida por la expresión combinada de los genes NANOG, KLF4, SOX2 y OCT4 y una firma EMT definida por la expresión de los genes SNAIL, SLUG y ZEB1.

3.7 DIFERENCIACIÓN Y ACUMULACIÓN LIPÍDICA

Para confirmar la diferenciación de los adipocitos y observar los depósitos de lípidos acumulados en dichas células, se realizaron dos tipos de ensayos de tinción de lípidos. Estas técnicas se llevaron a cabo tras el cocultivo de los adipocitos o hMSC con los PDXs, con el objetivo de cuantificar el contenido lipídico.

3.7.1 TINCIÓN ORO

Por un lado, se usó ORO, colorante utilizado para la tinción de triglicéridos, lípidos neutros y gotas lipídicas en diferentes tipos celulares. Los adipocitos y hMSC se tiñeron con ORO tras 48h de cocultivo. En primer lugar, se fijaron en formalina al 10% (EMD Millipore Corporation, Alemania) durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se lavaron con 2 mL/pocillo de isopropanol al 60% (VWR Chemicals BDH, Avantor, EE.UU) dos veces durante 30 segundos y se dejaron secar completamente. Antes de la tinción con ORO se preparó una solución *stock* (3,5 mg/mL) en isopropanol y se incubó a TA toda la noche. La solución *stock* se diluyó en agua para obtener la solución de trabajo (2,1 mg/mL), la cual se dejó agitar durante 20 minutos a temperatura ambiente. La solución se filtró con un filtro de 0,2 μm (Fisherbrand™, ThermoFisher Scientific, EE.UU) antes de teñir las células.

Cuando las placas estaban secas, las células se tiñeron con 1 mL/pocillo de la solución de trabajo ORO y se incubaron a temperatura ambiente en agitación durante 20 minutos. Después, las células fijadas se lavaron con agua destilada y se observaron y adquirieron imágenes mediante el microscopio invertido. Finalmente, se secaron las placas y el colorante se diluyó en 3 mL/pocillo de isopropanol al 100% durante 10 minutos. A continuación, se recogió el isopropanol y se transfirió a placas de 96 pocillos donde se cuantificó midiendo la absorbancia a 500 nm por espectrofotometría en el lector de placas Synergy HT (BioTek Instruments, EE.UU). Las medidas se realizaron por triplicado.

3.7.2 CONTENIDO DE TAGs

Por otro lado, se cuantificó el contenido de TAGs de los adipocitos o hMSC provenientes del cocultivo, o bien los TAGs del sobrenadante. En primer lugar, se preparó una curva estándar con diluciones ½ en tampón de lisis NP-40 ((Octylphenoxy) polyethoxyethanol) (SIGMA Life Science, EE.UU) al 5% a partir de un control externo de suero (149 mg/dL) proveniente del departamento de Bioquímica del Hospital Universitario Miguel Servet.

A continuación, las células se trataron con 300 µL/pocillo de tampón de lisis NP-40 al 5%, y con ayuda de un rascador se retiraron de la superficie de la placa. El contenido se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Se recogieron 50 µL de sobrenadante para determinar la concentración de proteínas con el kit de ensayo de proteínas Pierce™ BCA según las instrucciones del proveedor (ThermoFisher Scientific, EE.UU). Se preparó una curva estándar de BSA (Sigma-Aldrich, EE.UU) entre 0-2 µg/µL y se cuantificó la concentración de proteínas a una absorbancia de 620 nm mediante el espectrofotómetro. Con los datos obtenidos se normalizó el contenido de TAGs.

A continuación, las muestras se vortearon y se calentaron durante 5 minutos a 80°C en el termobloque AccuBlock™ Digital Dry Bath (Labnet International, EE.UU). Después, se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos y en el sobrenadante se cuantificó el contenido de TAGs mediante un reactivo enzimático de color proveniente del departamento de Bioquímica del Hospital Universitario Miguel Servet (Beckman Coulter, EE.UU). Según el protocolo, se añadieron 125 µL/pocillo de la mezcla de reactivos R1 y R2 en una proporción 4:1 respectivamente, junto con 20 µL de muestra. La placa se incubó durante 5 minutos a 37°C en oscuridad. Por último, se midió la absorbancia a 630 nm utilizando el lector de placas Synergy HT. Las medidas se realizaron por triplicado.

3.8 ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo o separación de células activadas por fluorescencia (FACS, del inglés, *Fluorescent Activated Cell Sorter*) permite estudiar diferentes características metabólicas y expresión de biomarcadores. En la tabla 2 se recogen las tinciones realizadas, los fluorocromos utilizados así como los canales de emisión de las diferentes sondas.

Tabla 2. Sondas utilizadas en los ensayos de citometría de flujo. APC: Alociocianina; PE: Ficoeritrina.

SONDA	FLUOROCROMO	CANAL EMISIÓN	FUNCIÓN
Anti-CD133	APC	FL6 (661 nm)	Expresión de CD133, marcador específico de CSCs
LD540	PE	FL2 (578 nm)	Cuantificación del contenido de las GLs
Zombie Violet	-	FL9 (405 nm)	Exclusión de células no viables

Los PDXs incubados con MCA o las esferas de PDXs en cocultivo con los adipocitos o hMSC durante 48h, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos, el *pellet* se lavó con PBS

y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto. El *pellet* se resuspendió en 50 μ L de tampón de bloqueo (2% FBS, 0,5% BSA en 1x PBS) durante 15 minutos en hielo y agitación. Después, las células se tiñeron durante 30 minutos en hielo, oscuridad y agitación con 50 μ L de anticuerpo anti-CD133 conjugado con APC (diluido 1/200; Biolegend, EE.UU) o con el anticuerpo control de Inmunoglobulina G1 (Biolegend, EE.UU). Durante los últimos 15 minutos, se añadió 1 μ L/muestra de la sonda LD540-PE (0,5 mg/mL) (Obtenido de Luca Tirinato (King Abdullah University of Science and Technology)) con el objetivo de cuantificar el contenido de las GLs.

A continuación, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 minuto y se resuspendieron en 100 μ L de PBS con Zombie Violet (1/400) (Biolegend, EE.UU). El Zombie Violet se utilizó para excluir las células no viables mediante su internalización en células con la membrana dañada. Todas las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Finalmente, a partir del citómetro de flujo (Gallios, Beckman Coulter, EE.UU) se adquirieron hasta 50.000 células por muestra. Los resultados se analizaron con el software Flowing v.2.5.1 (Turku, Finland).

3.9 CARACTERIZACIÓN A NIVEL DE EXPRESIÓN GÉNICA

A partir de las esferas de PDXs provenientes de los cocultivos con adipocitos o hMSC, se analizó la expresión génica.

3.9.1 EXTRACCIÓN DE ARN

Pasadas las 48h de cocultivo se realizó la extracción de ARN de las células bajo la campana de seguridad nivel 2 Filtair 824 (Captair chem, Erlab, España). En primer lugar, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron con 750 μ L de tripsina durante 5 minutos, la reacción se paró con 750 μ L de medio RPMI 1640 completo y se centrifugaron a 13000 rpm durante 2 minutos en la centrifuga Spectrafuge 24D (Labnet International, EE.UU). Después, en función del *pellet* se añadieron 500 μ L o 1 mL de Tioisocianato de guanidina (Trizol®, Invitrogen, EE.UU) y se dejó incubar por 5 minutos.

Pasado este tiempo, se comenzó el primer paso de la extracción donde se llevó a cabo la precipitación del ARN. La suspensión de células se trasvasó a un *phasemaker* (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, EE.UU) con el objetivo de separar el ARN del resto de ácidos nucleicos y proteínas que puedan estar presentes en la muestra. Estos *ependorfs* contienen un polímero que separa en tres fases las muestras, una fase acuosa superior, la interfase y la fase orgánica inferior. Seguidamente, se añadieron 200 μ L de cloroformo por cada mL de trizol, las muestras se agitaron durante 15 segundos y se dejaron incubar durante 2-3 minutos. Después, se centrifugaron en la centrífuga Eppendorf™ 5415R (Eppendorf, Alemania) a 12000 rcf durante 15 minutos a 4°C. La capa acuosa superior que contiene el ARN se transfirió a un nuevo *ependorf* y se añadieron 500 μ L de isopropanol por cada mL de trizol para precipitar el ARN. Las muestras se vortearon e incubaron a -20°C toda la noche.

Tras dicha incubación, se llevó a cabo el segundo paso de extracción que consiste en el lavado del ARN. Las muestras se centrifugaron a 12000 rcf durante 10 minutos a 4°C y el *pellet* se resuspendió en 1 mL de etanol al 70%. Después, se vortearon y se centrifugaron a 7500 rcf durante 5 minutos a 4°C. A continuación, el *pellet* se resuspendió en 1 mL de etanol absoluto. Las muestras se centrifugaron en las mismas condiciones, el *pellet* se dejó secar y se solubilizó con 20-50 µL de agua ultra pura (H₂O up) (Qiagen, Germany). Por último, el ARN extraído se cuantificó con el espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific, EE.UU).

3.9.2 TRANSCRIPCIÓN REVERSA

A partir de las concentraciones obtenidas de las muestras, se realizaron los cálculos necesarios para llevar a cabo la digestión de ADN y posterior retrotranscripción de ARN a ADN.

Por un lado, se realizó la digestión con la enzima desoxirribonucleasa (dsDNasa) de las muestras. Se preparó un volumen total de 10 µL, se añadió 1 µg del ARN extraído de cada muestra junto con 1 µL de dsDNasa (ThermoFisher Scientific, EE.UU) y 1 µL de buffer de dsDNasa 10X (ThermoFisher Scientific, EE.UU), completando el volumen con H₂O up (Tabla 3). Seguidamente, se realizó la primera incubación de la reacción a 37°C durante 2 minutos en el termociclador MyCycler™ Thermal Cycler System (BioRad, EE.UU).

Por otro lado, el ARN se retrotranscribió mediante el kit Maxima™ cDNA H Minus Synthesis Master Mix (5X) (ThermoFisher Scientific, EE.UU). El kit contiene la enzima transcriptasa reversa Maxima H Minus y H₂O up. En los 10 µL de la reacción anterior, se añadieron 6 µL de H₂O up y 4 µL de la enzima, obteniendo un volumen de 20 µL (Tabla 3). A continuación, la reacción se incubó en el termociclador durante 10 minutos a 25°C, 15 minutos a 50°C y 5 minutos a 85°C. Finalmente, el ADNc puro se diluyó en 180 µL de H₂O up para realizar la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR, del inglés, *Real time quantitative Polymerase Chain Reaction*).

Tabla 3. El número de reacciones, los reactivos, la cantidad de reactivo por tubo y la cantidad total de cada mezcla se describen en la tabla.

	REACTIVOS	VOLUMEN MIX (µL/tubo)	VOLUMEN TOTAL (µL/muestra)
DIGESTIÓN CON dsDNasa	1 µg ARN extraído	8	10
	Buffer dsDNasa 10X	1	
	dsDNasa	1	
RETROTRANSCRIPCIÓN CON Maxima Master Mix	H ₂ O up	6	10
	Maxima™ cDNA H Minus Synthesis Master Mix	4	
			20

3.9.3 RT-qPCR

La RT-qPCR es una técnica utilizada para amplificar y cuantificar genes de interés en muestras de ADN con cebadores específicos y una sonda fluorescente. En este caso se utilizó la sonda SYBR Green, molécula fluorescente capaz de asociarse al ADN. Por tanto, el número de moléculas de ADN amplificadas puede cuantificarse con la intensidad de la señal fluorescente en tiempo real. De este modo, cuanto mayor es la cantidad de ADN en la muestra, se producirá mayor fluorescencia.

Las RT-qPCR se llevaron a cabo en el dispositivo StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, EE.UU) en unas condiciones experimentales específicas: se utilizó la PowerUp™ SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, EE.UU) para detectar el ADN de doble cadena, y diferentes cebadores o *primers* para amplificar la secuencia diana de cada gen (ANEXO I). La reacción de RT-qPCR se realizó en placas de 96 pocillos MicroAmp® AGst (0,1 mL) (Applied Biosystems®, ThermoFisher Scientific, EE.UU). En primer lugar, se preparó una *master mix* compuesta por 5 µL de SYBR Green y 0,5 µL de cada uno de los cebadores directo y reverso específicos para cada gen de interés. A continuación, se cargaron 4 µL/pocillo de las muestras de ADNc por duplicado, y posteriormente, se añadieron 6 µL/pocillo de cada *master mix*.

Después, las placas se cubrieron con cubiertas adhesivas ópticas (Applied biosystems®, ThermoFisher Scientific, EE.UU) y se centrifugaron a máxima velocidad durante 3 minutos. Por último, se establecieron las condiciones experimentales y se colocó la placa en el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ y se realizó la RT-qPCR en 1 hora aproximadamente. Durante el proceso se realizaron las etapas que se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Etapas transcurridas durante la reacción de RT-qPCR.

ETAPAS DE REACCIÓN	
Iniciación	50°C → 2' 95°C → 2'
Desnaturalización	95°C → 3''
Hibridación/Extensión	50°C → 2'
Curva de <i>melting</i>	95°C → 15''; 50°C → 2'

Finalmente, se analizó la curva de *melting* de cada gen para comprobar que no se habían formado productos no específicos. Además, se ajustó el umbral del número de ciclos (C_t , del inglés, *cycle threshold*). Un valor bajo de C_t , se corresponde con una cantidad inicial mayor del gen de interés en la muestra. Por último, se calculó la expresión relativa de cada gen con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ mediante el gen constitutivo HPRT como control endógeno.

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las representaciones gráficas y el análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU). Las diferencias estadísticas se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba *post hoc* de Bonferroni cuando se cumplían las condiciones pertinentes paramétricas. El análisis de variables no paramétricas (cuando presentaban diferencias significativas para el test de Shapiro-Wilk) se realizó mediante la prueba de Friedman con Dunn's *post-test* para evaluar la existencia de diferencias entre todas las condiciones. Los datos se expresaron como las medias con barras de error que representan los errores estándar de la media (SEM) de al menos 3 experimentos. En todas ellas el valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo y las diferencias significativas se clasificaron en: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

En primer lugar, se realizó un análisis bioinformático utilizando el servidor web GEPIA2 para determinar la expresión relativa de algunos genes que regulan el metabolismo lipídico, a partir de los datos transcripcionales de páncreas humano normal y tejido de ADP. Entre ellos se incluyen los genes implicados en el transporte de AGs en diversos tejidos (CD36, SLC27A1, SLC27A3 y SLC27A4) y en el metabolismo de los mismos (FASN y CPT1A). Los genes de transportadores de AGs se escogieron debido a que diferentes estudios han determinado que están involucrados con la acumulación lipídica en células tumorales (53,57,58). De hecho, a excepción de CD36 el resto de genes mostraron un incremento estadísticamente significativo en el tejido tumoral de ADP en comparación con el tejido normal (Figura 7). No obstante, se escogió dicho gen ya que se ha demostrado que el transportador CD36 tiene un papel muy importante en la captación de AGs en las células cancerosas y en la regulación de la β -oxidación en diversos tipos de cáncer, como el gástrico (51), de ovario (53), de próstata (52) y carcinoma hepatocelular (89).

Por otro lado, la expresión de los genes estudiados está correlacionada positivamente y de forma estadísticamente significativa con las firmas genéticas de pluripotencia y EMT, a excepción de CD36 (Tabla 5). En general, estos resultados sugieren que existe una asociación entre el metabolismo lipídico y las firmas relacionadas con las CSCs pancreáticas y la agresividad. De hecho, están en consonancia con estudios que demuestran un papel crucial del metabolismo lipídico en la progresión tumoral del ADP (46) y en la funcionalidad de las CSCs pancreáticas (63).

En consecuencia, nos propusimos estudiar la interacción entre el metabolismo lipídico en lo que respecta al papel del tejido adiposo del microambiente tumoral y las propiedades de las CSCs pancreáticas.

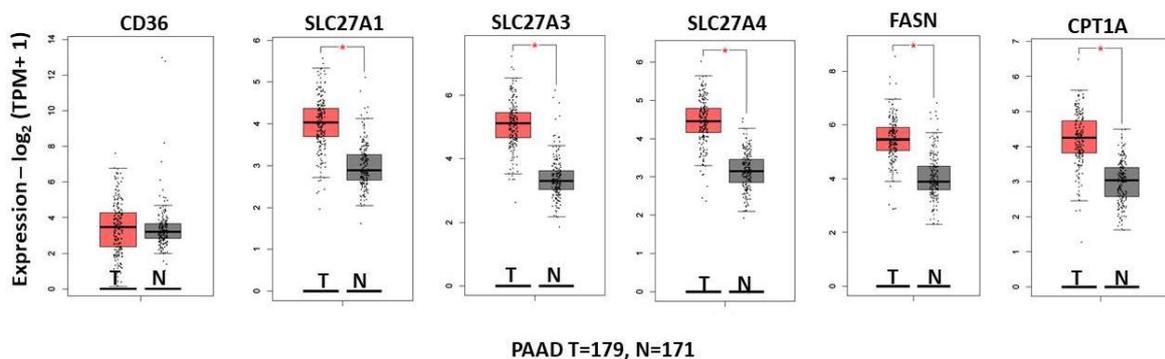


Figura 7. El metabolismo lipídico está asociado a la agresividad en el ADP humano. Expresión relativa de algunos genes que regulan el metabolismo lipídico en páncreas normal humano (N) y tejidos de ADP (T), utilizando las bases de datos TCGA y GTEx mediante el servidor GEPIA2. TPM (del inglés, *transcripts per million*). * $p < 0,05$.

Tabla 5. Correlación de la expresión de los genes implicados en el metabolismo lipídico con las firmas genéticas de pluripotencia (NANOG, KLF4, SOX2 y OCT4) y EMT (SNAIL, SLUG y ZEB1). Correlación obtenida de las bases de datos TCGA y GTEx mediante el servidor GEPIA2.

GEN	Pluripotencia (R)	Pluripotencia (p-valor)	EMT (R)	EMT (p-valor)
CD36	-0,18	0,00079	-0,14	0,0079
SLC27A1	0,63	<0,0001	0,56	<0,0001
SLC27A3	0,55	<0,0001	0,49	<0,0001
SLC27A4	0,62	<0,0001	0,54	<0,0001
AGSN	0,41	<0,0001	0,43	<0,0001
CPT1A	0,55	<0,0001	0,62	<0,0001

4.2 EFECTO DEL MCA SOBRE EL FENOTIPO CSC

En primer lugar, para evaluar los efectos del tejido adiposo sobre el fenotipo de las CSCs pancreáticas, los cultivos primarios de ADP se incubaron con MCA. De este modo comprobamos si las señales adipocitarias promueven la agresividad y otras características asociadas a las CSCs que se han descrito en diferentes estudios (24,50). Para ello, se analizó mediante FACS el contenido en CD133⁺, marcador proteico de membrana expresado por las CSCs y el contenido de las GLs, mediante la sonda LD540. Ambos análisis se realizaron en los PDXs 185 y 265 tras la incubación durante 48h con MCA o MCM derivados de las líneas celulares 74SC y 78SC, provenientes de tejido graso subcutáneo. Dada la importancia de los adipocitos en otros tumores como los de mama y ovario (83,86), consideramos que estos adipocitos subcutáneos podrían promover el crecimiento y progresión del ADP.

Por un lado, en la figura 8A se observa una disminución significativa del contenido de CD133⁺ en las células de ADP cuando se incuban tanto con MCA como MCM respecto al control. Tras la incubación con MCA se podría esperar un incremento del contenido en CD133⁺, ya que como se ha descrito anteriormente la presencia de lípidos y/o mediadores lipídicos favorecen la funcionalidad de las CSCs (27). No obstante, estudios recientes han evidenciado que existen diferencias en los efectos sobre las células cancerosas cuando se compara la grasa visceral con la subcutánea (24). De hecho, se ha demostrado que la incubación con grasa visceral promueve significativamente la migración e invasión en modelos *in vitro* (24) e *in vivo* (90,91). Además, previamente nuestro grupo de investigación obtuvo resultados preliminares en los que observaron un aumento del porcentaje de células CD133⁺ tras la incubación con MCA derivado de líneas celulares provenientes de tejido graso visceral.

Por otro lado, la figura 8B muestra el contenido lipídico en las células de ADP. Se observa un incremento significativo del contenido lipídico en la subpoblación CD133⁺ al incubarse con el MCA proveniente de la línea 74SC pero no en la 78SC. Ello podría deberse al tiempo de diferenciación en que se recogieron los MCA, el cual fue mayor en el caso de la línea 74SC. Esta diferencia de tiempo puede hacer que los adipocitos acumulen un mayor

número de GLs o un contenido mayor de TAGs en las mismas. Asimismo, el incremento del contenido lipídico observado pareció ser mayor en la línea 185 frente a la 265, lo que se corresponde con que el PDX 185 se haya descrito como lipogénico. Como se trata de una línea con un metabolismo predominante lipogénico, sintetiza una mayor cantidad de TAGs a partir de AGs libres, por lo que se podría relacionar con una mayor acumulación de GLs (Figura 8B) tras la incubación con MCA.

Por último, no se observaron diferencias en el contenido lipídico de la subpoblación CD133⁻ de las células de ADP.

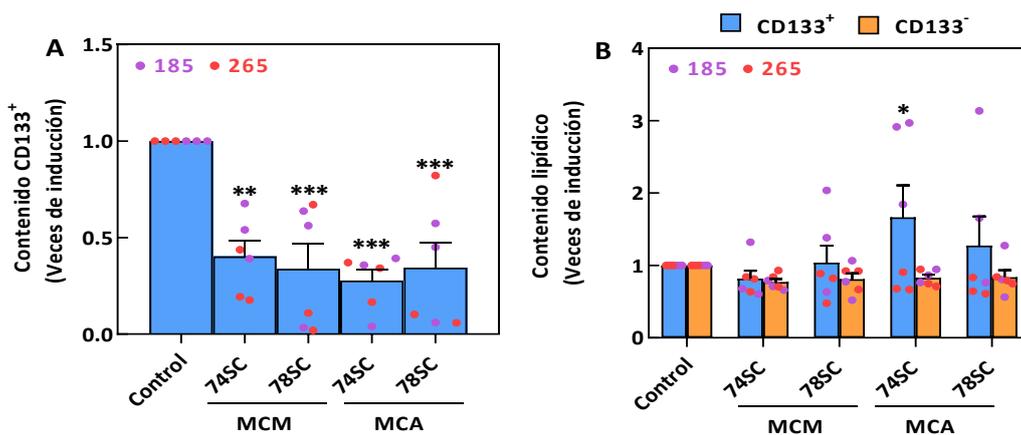


Figura 8. Efecto sobre el fenotipo CSC de ADP tras la incubación con MCA derivados de las líneas 74SC y 78SC durante 48h. A. Contenido de CD133⁺ en los PDXs de estudio. **B.** Contenido lipídico en las subpoblaciones CD133⁺ y CD133⁻ de los PDXs de estudio. *vs control (DMEM alto en glucosa). n=6.

4.3 PUESTA A PUNTO DE LAS CONDICIONES DEL SISTEMA DE COCULTIVO

Dado que no se observaron grandes diferencias tras la incubación de los PDXs de ADP con los MCA, se optó por llevar a cabo cocultivos directos e indirectos de adipocitos y esferas de PDXs de ADP durante 48h. Los cocultivos se realizaron con esferas de PDXs ya que tienen una mayor proporción de CSCs que un cultivo en adherencia, y así evaluar el fenotipo de las CSCs.

Para ello, se testaron diferentes condiciones de medios en ambos tipos celulares para elegir la condición óptima de cocultivo que conservara las características de las poblaciones celulares individuales y permitiera estudiar el efecto del cocultivo. Se usaron como control DMEM-F12 suplementado con 2% de B27 y FGF (medio de esferas) y DMEM alto en glucosa con 10% de FBS (medio de adipocitos) y además, se evaluaron los diferentes porcentajes de FBS utilizando medio DMEM-F12 suplementado con 10%, 5% y 2% de FBS y medio DMEM-F12 suplementado con 2% de B27. De este modo, se tuvieron en cuenta todos los factores que pudieran afectar al crecimiento de ambos tipos celulares.

La evaluación se llevó a cabo por un lado mediante microscopía de contraste de fase; no se observó diferencias entre los distintos medios en la morfología de las esferas ni de los

adipocitos (datos no mostrados). No obstante, se comprobó de forma cuantitativa mediante análisis por FACS de las esferas y cuantificación de TAGs y ORO en los adipocitos.

La figura 9A muestra que no hay diferencias significativas en el contenido de CD133⁺ en esferas del PDX 185 entre los medios de estudio. Del mismo modo, se estudió el contenido lipídico mediante la sonda LD540 en la misma línea celular en las subpoblaciones CD133⁺ y CD133⁻. La figura 9B refleja que existe un pequeño incremento en la condición DMEM-F12 + 10% FBS en ambas subpoblaciones respecto al medio de esferas control, mientras que las condiciones DMEM-F12 al 5% y 2% de FBS y medio de adipocitos control permanecen constantes en ambas subpoblaciones. Sin embargo, se observa una ligera disminución en el caso de DMEM-F12 + B27 respecto al medio de esferas tanto en la subpoblación CD133⁺ como en la CD133⁻.

Por otro lado, se estudió el contenido de TAGs y ORO en adipocitos de la línea 78SC con los distintos medios de estudio. En la figura 9C se observa un incremento del contenido de TAGs en el caso de DMEM-F12 + 10% FBS y una disminución en las condiciones de medio de esferas y adipocitos. El resto de condiciones estudiadas permanecieron constantes. Por último, la figura 9D refleja la cuantificación de la tinción del ORO en los adipocitos, mostrando que no existen cambios de los AGs acumulados en los adipocitos tras la tinción ORO entre condiciones.

Así pues, teniendo en cuenta los resultados de las diferentes técnicas utilizadas con el objetivo de seleccionar la condición óptima para ambos tipos celulares, se optó por el medio DMEM-F12 + 5% FBS. Se escogió dicho medio debido a que en todas las técnicas se obtuvieron valores constantes en comparación con los otros medios estudiados. Es cierto que la condición de DMEM-F12 + 2% FBS también tuvo valores constantes como el DMEM-F12 + 5% FBS, no obstante, se consideró que el porcentaje de 2% de FBS pudiera ser bajo para los adipocitos a largo plazo.

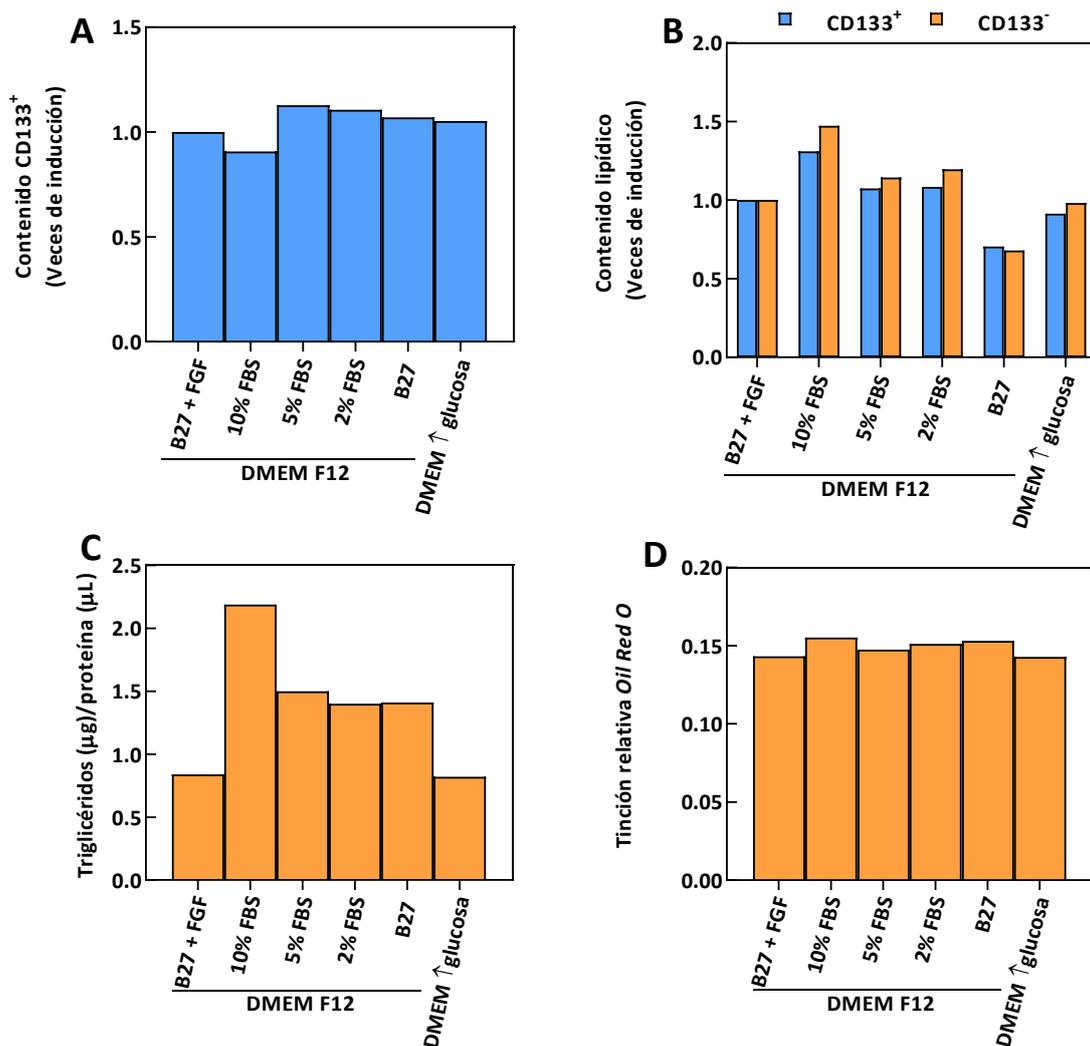


Figura 9. Puesta a punto de las condiciones de cultivo en esferas de PDXs de ADP y adipocitos tras 48h de incubación con los medios de estudio. A. Contenido de CD133⁺ en esferas del PDX 185. **B.** Contenido lipídico en las subpoblaciones CD133⁺ y CD133⁻ en esferas del PDX 185. **C.** Cuantificación del contenido de TAGs en la línea de adipocitos 78SC. Absorbancia medida a 630 nm. **D.** Cuantificación de los lípidos acumulados tras la tinción con ORO en la línea 78SC. Absorbancia medida a 500 nm. n=1.

Tras elegir el medio óptimo para el cocultivo, se llevó a cabo una comparación entre cocultivos directos e indirectos de esferas de PDXs de ADP (denotado como ADP) con adipocitos (denotado como adipo). En la figura 10A se muestra la cuantificación de TAGs en el sobrenadante comparando ambos tipos de cocultivos. No se observaron diferencias significativas entre un tipo de cocultivo y otro. Sin embargo, el cocultivo directo mostró una gran adherencia de las esferas a los adipocitos, lo que complicaba la posterior recogida y análisis de las mismas (Figura 10B). Por ello, se decidió estudiar la comunicación entre adipocitos y esferas de PDXs de ADP en cocultivo indirecto.

Sin embargo, se podría pensar que es necesario un contacto directo de ambos tipos celulares para que los AGs provenientes de los adipocitos sean transferidos a las células de

ADP. No obstante, varios estudios han indicado que los adipocitos pueden liberar AGs en el medio extracelular que pueden ser absorbidos por las células tumorales cercanas, sin necesidad de haber un contacto directo celular (57,86).

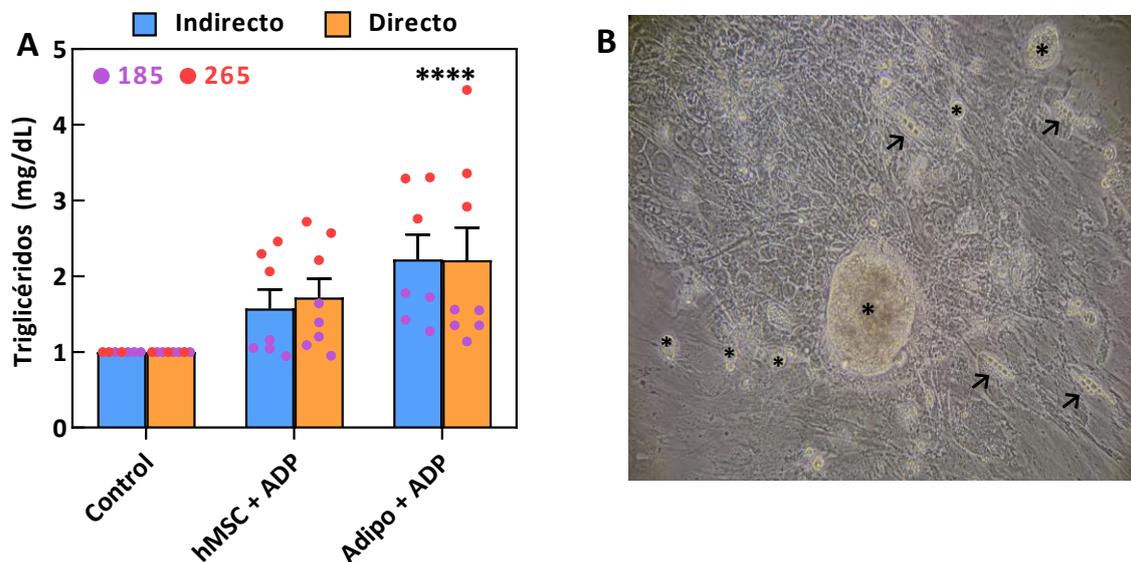


Figura 10. Comparación de cocultivo indirecto y directo. **A.** Cuantificación del contenido de TAGs presentes en el sobrenadante de cocultivos indirecto y directo de adipocitos y esferas de PDXs de ADP durante 48h. Absorbancia medida a 630 nm. **B.** Imagen representativa del cocultivo directo, se observan las esferas (*) y adipocitos (→). Magnificación 20X. *vs control (DMEM-F12 + 5% FBS). n= 7-8.

4.4 EFECTOS FENOTÍPICOS EN RESPUESTA AL COCULTIVO

Dado que una de las principales fuentes exógenas de AGs para las células son la liberación de estos por parte del tejido adiposo (46,47), se recogió el sobrenadante proveniente de cocultivos indirectos para estudiar el contenido de TAGs.

La figura 11 muestra un incremento significativo en el contenido de TAGs en el sobrenadante de la condición de cocultivo de adipocitos con esferas de ADP en comparación al control. Sin embargo, se podría esperar una reducción de los TAGs presentes en el sobrenadante al cocultivar los adipocitos con las esferas, ya que podría indicar que las esferas están captando dichos TAGs. No obstante, se ha de tener en cuenta que el *test* mide los TAGs presentes en el medio pero no AGs que es lo que liberan los propios adipocitos. En efecto, Okumura. T *et al* (24) determinaron que el cultivo indirecto de adipocitos con células cancerosas pancreáticas incrementó la concentración de AGs en el medio, indicando que las células cancerosas inducían lipólisis y promovían la liberación de AGs de los adipocitos. Por tanto, la presencia de células cancerosas afecta directamente a la funcionalidad de los adipocitos. En nuestro caso, en la figura 11 se observa que la presencia de esferas en el cocultivo produce un ligero incremento de TAGs en el medio si se compara con los adipocitos solos.

Por otro lado, la figura 11 muestra un comportamiento diferencial entre PDXs, ya que en las condiciones con esferas de ADP el sobrenadante proveniente del PDX 265 tiene unos niveles más elevados de TAGs que el del PDX 185. Así pues, ello podría indicar que fueran las propias esferas las que produjeran TAGs y los expulsaran al medio. De hecho, en la figura 11 se puede observar que el nivel basal de TAGs en las esferas solas de ADP es ligeramente más alto que en la propia condición de adipocitos. No obstante, se ha de tener en cuenta que dicho incremento en TAGs también se puede observar en la condición hMSC sin esferas de ADP. Por tanto, no se puede considerar que las esferas sean las responsables del mayor aumento de TAGs en el PDX 265.

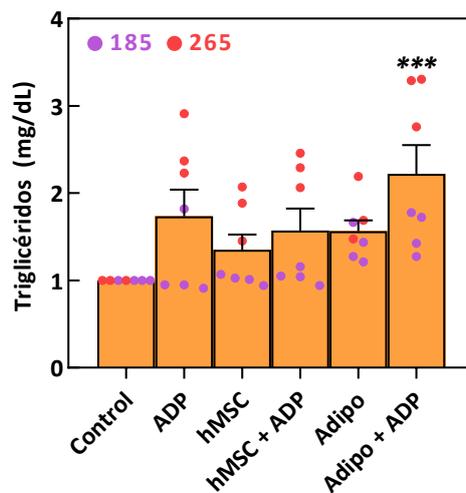


Figura 11. Cuantificación del contenido de TAGs presentes en el sobrenadante de cocultivos de adipocitos y esferas de PDXs de ADP durante 48h. Absorbancia medida a 630 nm. *vs control (DMEM-F12 + 5% FBS). n= 7-8.

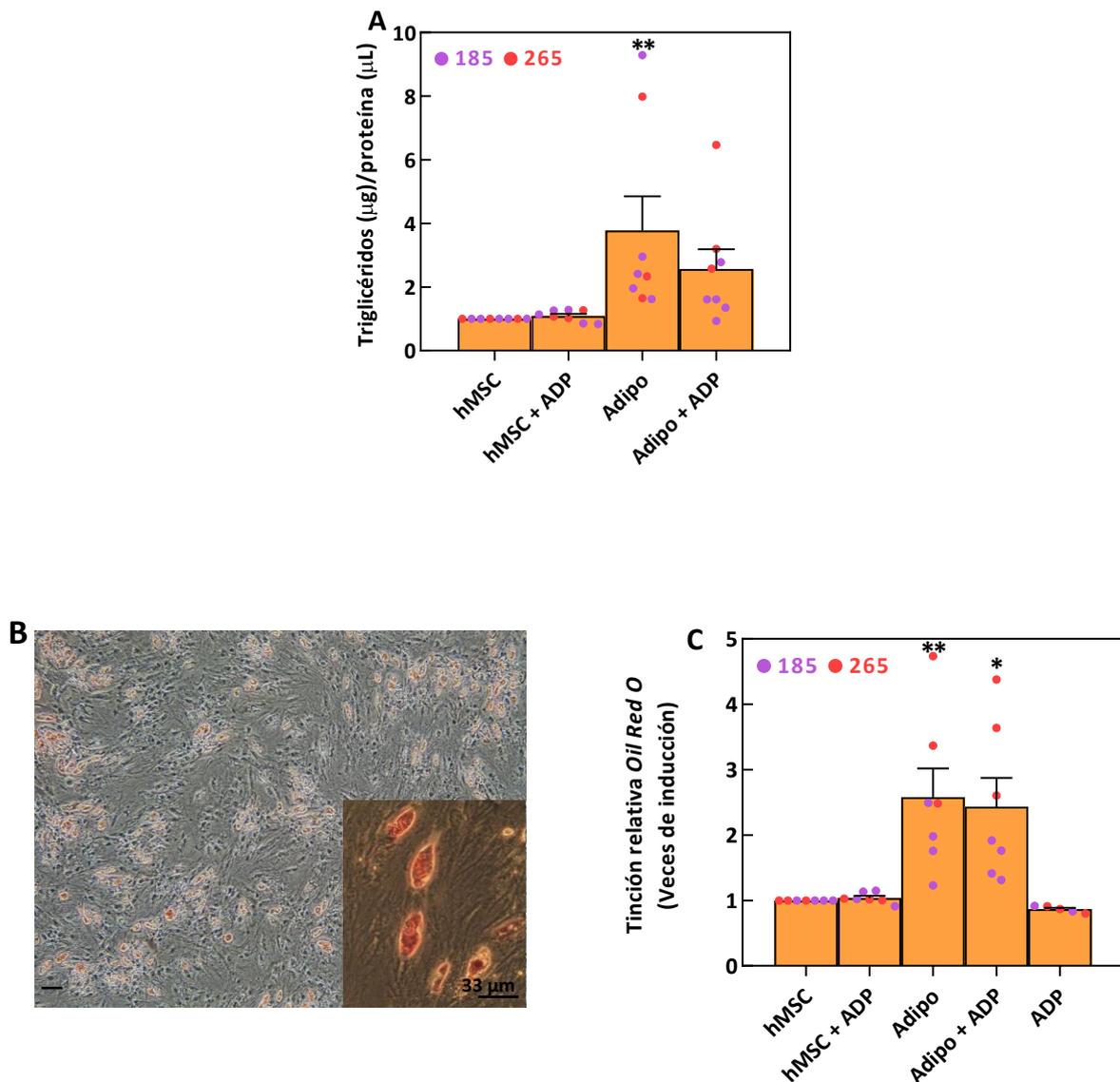
4.4.1 EFECTOS FENOTÍPICOS EN ADIPOCITOS EN RESPUESTA AL COCULTIVO

A continuación, se estudiaron los cambios fenotípicos que el cocultivo induce sobre los adipocitos en relación al acúmulo de lípidos, lo que permite ver si las células tumorales modifican las características de los adipocitos. Sin embargo, no se ha estudiado que factores lipolíticos secretados por las células de ADP son los responsables de realizar cambios morfológicos/fenotípicos en adipocitos.

En la figura 12A se refleja el contenido de TAGs presentes en los adipocitos. Se puede observar un incremento significativo de los TAGs presentes en los adipocitos en comparación con las hMSC, como era de esperar. Sin embargo, los resultados muestran un menor incremento del contenido de TAGs cuando los adipocitos son cocultivados con las esferas en comparación con los adipocitos solos. Ello puede deberse a que las esferas han inducido lipólisis en los adipocitos y estos han reducido su contenido intracelular de TAGs, tal y como se ha evidenciado en cocultivos de adipocitos con células de cáncer de mama (50,92), melanoma (57) y cáncer de páncreas (88). En conjunto, estos resultados demuestran que las células de ADP estimulan parcialmente la movilización de AGs de las reservas de TAGs de los adipocitos, lo que coincide con estudios previos (24,85).

Por otro lado, la figura 12B muestra una imagen representativa de la tinción de los adipocitos con ORO. En la figura 12C se observa un incremento significativo de la acumulación lipídica en los adipocitos y los adipocitos cocultivos con las esferas de ADP, respecto a las hMSC. No obstante, no se obtiene la disminución observada en los TAGs en el caso de los adipocitos cocultivos con esferas de ADP. Sin embargo, ello puede deberse a que la técnica de cuantificación de TAGs es más sensible que la tinción ORO.

Estudios recientes han determinado que los adipocitos cocultivos con células de cáncer de páncreas mostraron una notable reducción del tamaño de las GLs en comparación con los adipocitos solos (50,88,93). En cambio, en el presente trabajo no se obtuvieron diferencias del tamaño de las GLs entre ambas condiciones (datos no mostrados), lo que se puede atribuir al tiempo del cocultivo. Dichos estudios mantuvieron el cocultivo durante 5 o 8 días en comparación con nuestras 48h, por ello, se trata de una cuestión a tener en cuenta para futuros ensayos de cocultivo.



(Leyenda de la figura en la siguiente página)

Figura 12. Efectos observados en adipocitos en respuesta al cocultivo con esferas de PDXs de ADP. A. Cuantificación del contenido de TAGs presentes en los adipocitos de cocultivos durante 48h. Absorbancia medida a 630 nm. **B.** Imagen representativa de los adipocitos teñidos con ORO (4X), magnificación de 20X. Barra de escala, 33µm. **C.** Cuantificación de los lípidos acumulados tras la tinción con ORO. Absorbancia medida a 500 nm. *vs hMSC. n= 7-8.

4.4.2 EFECTOS FENOTÍPICOS Y FUNCIONALES EN ESFERAS DE ADP EN RESPUESTA AL COCULTIVO

Del mismo modo, también se estudiaron los efectos fenotípicos y funcionales que el cocultivo induce sobre las esferas de ADP, es decir, sobre las CSCs. Para ello, se analizó mediante FACS y RT-qPCR los cambios producidos en esta subpoblación celular.

En primer lugar, en la figura 13A no se observan diferencias significativas en el contenido de CD133⁺ entre las esferas solas o cocultivadas con hMSC o adipocitos, a diferencia de lo observado con los medios condicionados. En cuanto al contenido lipídico (Figura 13B) tampoco se observaron diferencias significativas, aunque se mostró un ligero incremento en la subpoblación CD133⁺ en los adipocitos cocultivados con esferas de ADP. Este incremento en el contenido lipídico de las esferas de ADP se puede relacionar con el observado en la figura 8B al incubar los PDXs con MCA derivado de la línea 74SC. No obstante, no existe una correlación entre que el mayor incremento del contenido lipídico sea en el PDX 185 con medios condicionados y en el PDX 265 tras el cocultivo con adipocitos.

Cabe destacar que en otros estudios de cocultivos de adipocitos con células tumorales sí que se ha obtenido una correlación evidente entre los resultados de las células cancerosas cultivadas con MCA y células cancerosas en cocultivo indirecto con adipocitos (24,57,93).

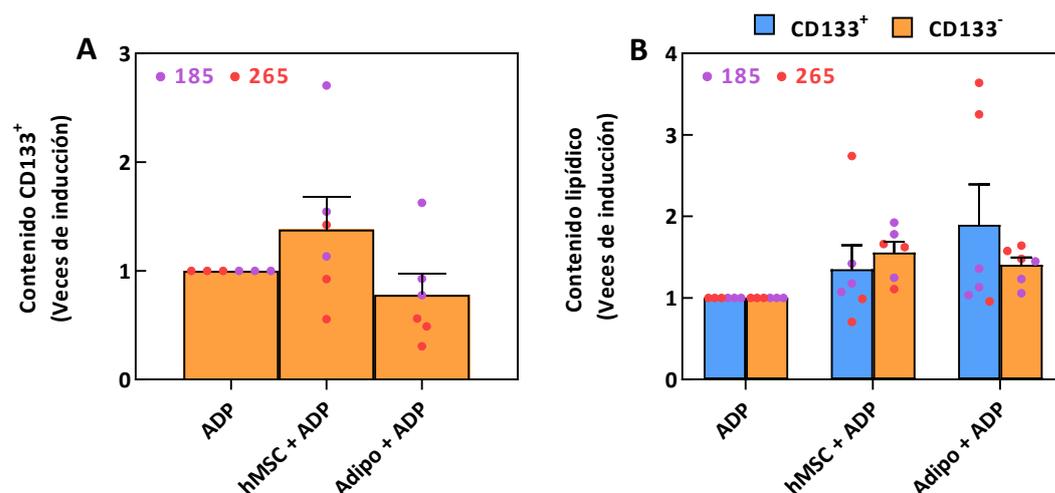


Figura 13. Efectos sobre el fenotipo en esferas de ADP, es decir CSCs, en respuesta al cocultivo. A. Contenido de CD133⁺ tras cocultivo de adipocitos con esferas de PDXs de ADP durante 48h. **B.** Contenido lipídico en las subpoblaciones CD133⁺ y CD133⁻ tras cocultivo de adipocitos con esferas de PDXs durante 48h. n=6.

A partir de las esferas de ADP provenientes del cocultivo se realizó un estudio de la expresión génica de dichas células. En primer lugar, se estudiaron los genes relacionados con la pluripotencia. La figura 14A indica que no existen cambios en la expresión de dichos genes en ninguna de las condiciones de estudio, lo que confirma los resultados obtenidos en el contenido de CD133⁺ en esferas de ADP.

Por otro lado, se estudiaron aquellos genes de EMT que formaban parte de la firma genética estudiada en los datos bioinformáticos. En la figura 14B se muestra un incremento significativo en dos de los genes estudiados, SLUG y ZEB1 en la condición del cocultivo de adipocitos con esferas de ADP. La expresión de ZEB1 también incrementa con el cocultivo de hMSC con esferas de ADP. De hecho, diferentes estudios han evidenciado que células de cáncer cocultivadas con adipocitos habían aumentado la expresión de genes asociados al estado de EMT (83,88,89), lo que indica un cambio hacia fenotipos CSC más mesenquimales (88,94). Este cambio fenotípico da lugar a una mayor migración, capacidad de invasión y resistencia a la apoptosis en otros tipos de cáncer (89), facilitando de este modo la progresión hacia un fenotipo metastásico (31,95,96). Por tanto, se podría considerar estudiar en un futuro estas propiedades asociadas al fenotipo CSC.

Finalmente, se estudió la expresión de los genes relacionados con el metabolismo lipídico en las esferas de ADP, en concreto transportadores de AGs y dos enzimas metabólicas importantes evaluados en el ensayo bioinformático. Tal y como se observa en la figura 14C, se obtuvo un incremento significativo en los niveles de expresión de CD36 en las esferas de ADP cocultivadas con adipocitos. Debido al destacado papel del transportador CD36 en la importación de AGs a las células cancerosas y en la regulación de procesos como la β -oxidación (53,89), no es de extrañar su incremento de expresión en esferas de ADP. Esta sobre-expresión del transportador CD36 se ha observado en cocultivos de células de diversos cánceres con adipocitos, los cuales lo relacionan con el metabolismo, la progresión y agresividad tumoral, todo ello asociado con el fenotipo CSC (50,53,89).

Sin embargo, en el ensayo bioinformático (Figura 7) fue el único gen en el que no se obtuvieron diferencias significativas en el tejido de ADP. Por tanto, estos resultados indican que los adipocitos son capaces de inducir cambios metabólicos en las CSCs pancreáticas, ya que las esferas de ADP cocultivadas con adipocitos muestran un incremento de la expresión del transportador CD36, relacionado con la captación y transporte de AGs. Este comportamiento observado en nuestro estudio, del mismo modo se determinó en células cancerosas de próstata cocultivadas con adipocitos (87). En conjunto, estas observaciones apoyan un modelo en el que las células cancerosas adaptan su metabolismo en respuesta a la disponibilidad de lípidos en el microambiente, procedentes de adipocitos adyacentes. Por otro lado, debido al importante papel del transportador CD36 en la importación de AGs en células tumorales, la inhibición del mismo con sulfo-N-succinil oleato (SSO), inhibidor de CD36, podría utilizarse como estrategia terapéutica contra las CSCs pancreáticas. De hecho,

Okumura. T *et al* (24) observaron una reducción del número de GLs en las células cancerosas pancreáticas tras tratarlas con SSO.

Dado que el CD36 se une a múltiples ligandos, depende en gran medida de cotransportadores para mediar el transporte específico de AGs al interior de las células, que suelen ser miembros de la familia FATP/SLC27A (56,97).

En el resto de genes de transportadores de AGs (SLC27A1, SLC27A3 y SLC27A4) estudiados no se observaron diferencias significativas en el cocultivo de adipocitos y esferas de ADP (Figura 14C), de forma contraria a lo que ocurre en otros tipos de cáncer (57). No obstante, se tendría que realizar un estudio a nivel proteico o de su actividad para confirmar los resultados observados. En efecto, en el ensayo bioinformático (Figura 7) se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre tejido de ADP y normal, sin embargo, se ha de tener en cuenta que son datos de tejidos de ADP derivados de pacientes con un valor de n muy grande. Además, nuestro estudio se centra en esferas de ADP provenientes de cocultivos, mientras que el ensayo bioinformático analiza muestras de tejidos. No obstante, se necesita un mayor número de replicados para obtener unas conclusiones decisivas.

En cuanto a la expresión del gen FASN tampoco se observaron diferencias significativas (Figura 14C). El FASN es la enzima lipogénica más ampliamente estudiada en las células de ADP. De hecho, se ha determinado una expresión elevada del gen que codifica FASN en cáncer de páncreas, y un nivel elevado de esta proteína se asocia con un mal pronóstico (66,98,99).

Sin embargo, lo que se podría esperar sería una disminución de su expresión, ya que varios estudios han evidenciado que las células no dependen tanto de la lipogénesis *de novo* cuando tienen una fuente exógena de lípidos (57,88). De hecho, otro estudio ha demostrado que la inhibición del transportador CD36 produjo un incremento de la expresión proteína FASN, necesaria para la síntesis de AGs (50).

Las células cancerosas muestran con frecuencia cambios en las enzimas implicadas en la β -oxidación de AGs. El paso que limita la velocidad de este proceso es la translocación de AGs a través de la membrana mitocondrial externa mediante el enzima CPT1 (42,49). Debido a las diferencias significativas observadas en el ensayo bioinformático (Figura 7), se estudió la expresión del enzima CPT1A, isoforma altamente expresada en tumores pancreáticos (70). Sin embargo, la figura 14C muestra que no se observaron diferencias significativas en el estudio de la expresión del gen CPT1A.

En efecto, se podría esperar un incremento de la expresión de CPT1A en caso de que las células cocultivadas utilizaran los lípidos derivados de los adipocitos para la β -oxidación de AGs. De hecho, se ha determinado que una expresión alta de la enzima CPT1A, indica una elevada producción de energía mediante la β -oxidación, es decir, ATP (57). No obstante, no se corresponde con nuestros resultados. Del mismo modo que en los transportadores de AGs, los resultados obtenidos se tendrían que confirmar a nivel proteico o de su actividad.

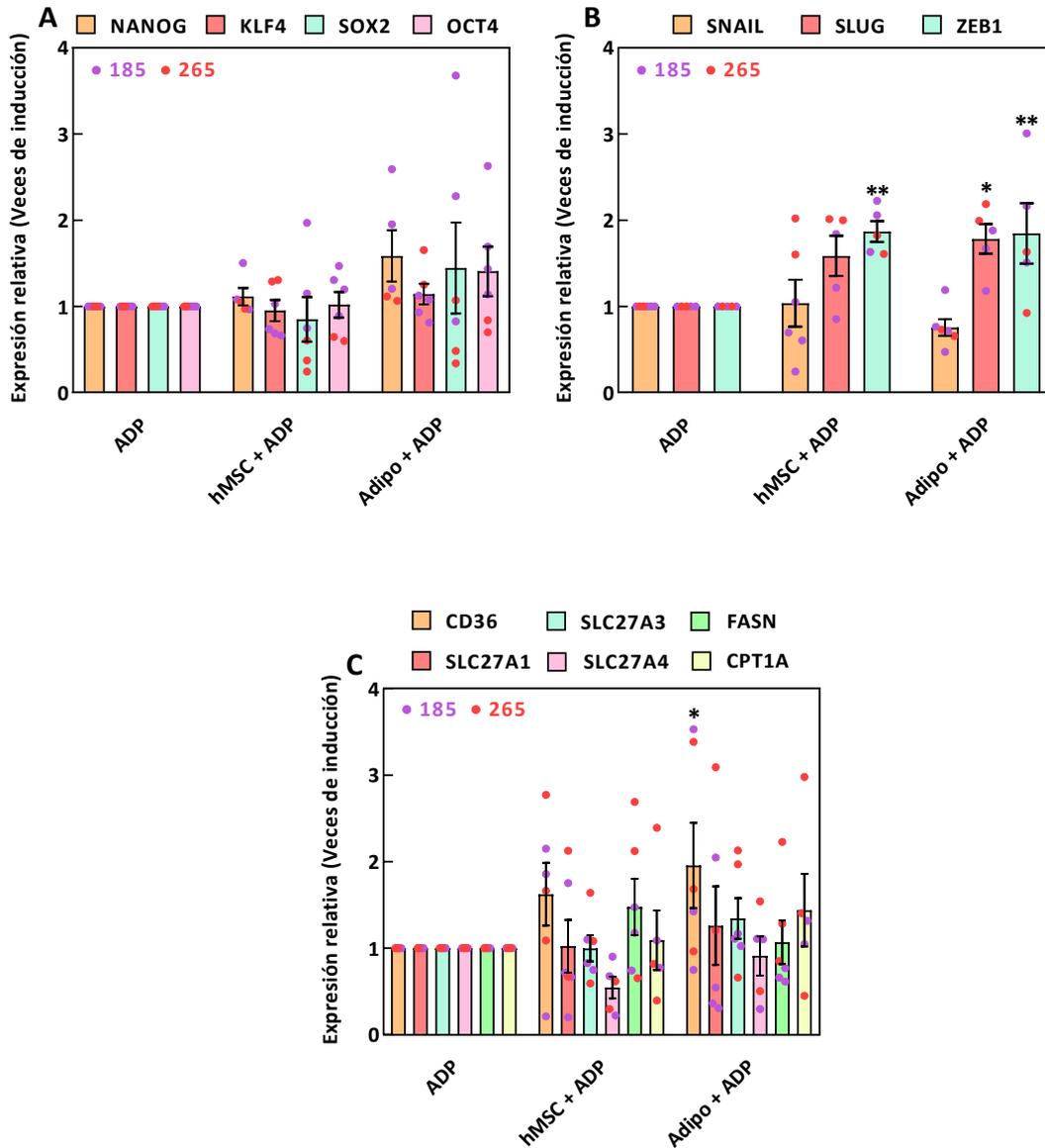


Figura 14. Expresión génica relativa de las esferas de ADP provenientes de cocultivo durante 48h. A. Genes de pluripotencia (NANOG, KLF4, SOX2 y OCT4). **B.** Genes de EMT (SNAIL, SLUG y ZEB1). **C.** Genes de transportadores de AGs (SLC27A1, SLC27A3 y SLC27A4) y dos enzimas del metabolismo lipídico (FASN y CPT1A). *vs ADP. n= 5-6.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas a partir del estudio realizado son las siguientes:

- Los genes estudiados del metabolismo lipídico se sobre-expresan en el tejido de ADP y se correlacionan positivamente con las firmas genéticas de pluripotencia y EMT.
- La incubación de los PDXs con MCA redujo el contenido de CD133⁺ e incrementó el contenido lipídico (solo en la línea 74SC) en la subpoblación CD133⁺. Además, existen indicios de un comportamiento diferencial entre PDXs.
- No hubo diferencias entre cocultivos directos e indirectos de esferas de ADP con adipocitos. Por tanto, se optó por el cocultivo indirecto debido a su fácil manejo en medio DMEM-F12 + 5% FBS.
- El contenido de TAGs incrementó en el sobrenadante de cocultivos. No obstante, en los adipocitos cocultivados con esferas de ADP se obtuvo una menor acumulación de TAGs. Además, en las esferas de ADP provenientes de cocultivo hubo un ligero incremento en el contenido lipídico de las CD133⁺, relacionado con el del MCA. Esto podría indicar que las esferas han inducido la liberación de AGs de los adipocitos, parte de los cuales han sido captados por las células CD133⁺.
- Las esferas de ADP provenientes de cocultivo con adipocitos no mostraron diferencias en el contenido de CD133⁺, confirmado por la expresión estable de los genes de pluripotencia. Por otro lado, se sobre-expresaron los genes ZEB1 y SLUG, asociados a un fenotipo CSC más mesenquimal e invasivo.
- Por último, los lípidos derivados de los adipocitos podrían ser captados por el transportador CD36, sobre-expresado en esferas de ADP. Por tanto, considerando el análisis bioinformático, los adipocitos son capaces de inducir cambios metabólicos en las CSCs pancreáticas.

En general, esta puesta a punto ha demostrado que existe una comunicación entre los adipocitos y las CSCs de ADP.

6. CONCLUSIONS

The conclusions obtained from the study are as follows:

- The studied lipid metabolism genes are overexpressed in PDAC tissue and correlate positively with pluripotency and EMT gene signatures.
- Incubation of PDXs with MCA reduced CD133⁺ content and increased lipid content (only in line 74SC) on CD133⁺ subpopulation. In addition, there are indications of differential behaviour between PDXs.
- There was no difference between direct and indirect cocultures of PDAC spheres with adipocytes. Therefore, indirect coculture was chosen due to its ease of handling in DMEM-F12 + 5% FBS medium.
- The content of TAGs increased in the coculture supernatant. However, in adipocytes cocultured with PDAC spheres, a lower accumulation of TAGs was obtained. Furthermore, there was a slight increase in the lipid content of CD133⁺ in PDAC spheres from coculture, related with MCA content. This could indicate that the spheres induced the release of AGs from adipocytes, some of which were taken up by CD133⁺ cells.
- PDAC spheres from coculture with adipocytes showed no difference in CD133⁺ content, confirmed by stable expression of pluripotency genes. Moreover, ZEB1 and SLUG genes, associated with a more mesenchymal and invasive CSC phenotype, were overexpressed.
- Finally, adipocyte-derived lipids could be taken up by the CD36 transporter, overexpressed in PDAC spheres. Therefore, considering the bioinformatics analysis, adipocytes are able to induce metabolic changes in pancreatic CSCs.

Overall, this set-up has demonstrated that there is a communication between adipocytes and PDAC CSCs.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Cabe destacar que este proyecto forma parte de una nueva línea de investigación del laboratorio, y que con el presente trabajo se pretendía realizar una puesta a punto de un sistema de cocultivo. Por ello, este proyecto tiene una continuidad con la finalidad de seguir estudiando la interacción entre el metabolismo lipídico y las CSCs pancreáticas. Se pretende:

- Estudiar la interacción adipocitos-CSCs pancreáticas de forma bidireccional, de qué manera influyen las CSCs en los adipocitos. Además, estudiar los factores de señalización procedentes de adipocitos como adipoquinas y citoquinas.
- Estudiar la expresión génica de PDXs incubados con MCA.
- Realizar diferentes ensayos de funcionalidad como de proliferación, invasión y migración en esferas de ADP cocultivadas con adipocitos, para estudiar otros efectos relacionados con el fenotipo de las CSCs.
- Estudiar a nivel proteico las diferentes proteínas involucradas en el metabolismo lipídico en esferas de ADP cocultivadas con adipocitos.
- Examinar la producción de ATP en las esferas de ADP provenientes de cocultivo para determinar en qué medida afecta una fuente exógena de lípidos a la producción de energía celular.
- Llevar a cabo experimentos para ver el efecto de inhibidores de transportadores y/o enzimas implicadas en algún proceso del metabolismo lipídico. Por ejemplo: SSO, inhibidor del transportador CD36 que está implicado en la reducción de acúmulos lipídicos en las células cancerosas pancreáticas (24); Etomoxir, inhibidor de la enzima CPT1A que resulta en la inhibición de la β -oxidación (42,70).
- Examinar cómo afecta la presencia de lípidos y/o adipocitos en el fenotipo quimiorresistente de las CSCs. Además, estudiar el efecto del agente quimioterapéutico gemcitabina en esferas de ADP cocultivadas con adipocitos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin A V., et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Prim.* 2016 Apr 21;2.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209–49.
3. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J cancer.* 2019 Apr 15;144(8):1941–53.
4. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021 Jan;71(1):7–33.
5. Orth M, Metzger P, Gerum S, Mayerle J, Schneider G, Belka C, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. Vol. 14, *Radiation Oncology.* BioMed Central Ltd.; 2019.
6. Park W, Chawla A, O'Reilly EM. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA.* 2021 Sep 7;326(9):851–62.
7. Nagdas S, Kashatus JA, Nascimento A, Hussain SS, Trainor RE, Pollock SR, et al. Drp1 Promotes KRas-Driven Metabolic Changes to Drive Pancreatic Tumor Growth. *Cell Rep.* 2019 Aug 13;28(7):1845-1859.e5.
8. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* 2014 Jun 1;74(11):2913–21.
9. Incio J, Liu H, Suboj P, Chin SM, Chen IX, Pinter M, et al. Obesity-induced inflammation and desmoplasia promote pancreatic cancer progression and resistance to chemotherapy. *Cancer Discov.* 2016 Aug 1;6(8):852–69.
10. Font-Burgada J, Sun B, Karin M. Obesity and Cancer: The Oil that Feeds the Flame. *Cell Metab.* 2016 Jan 12;23(1):48–62.
11. Rahn S, Zimmermann V, Viol F, Knaack H, Stemmer K, Peters L, et al. Diabetes as risk factor for pancreatic cancer: Hyperglycemia promotes epithelial-mesenchymal-transition and stem cell properties in pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Lett.* 2018 Feb 28;415:129–50.
12. Zeitouni D, Pylayeva-Gupta Y, Der CJ, Bryant KL. KRAS mutant pancreatic cancer: No lone path to an effective treatment. Vol. 8, *Cancers.* MDPI AG; 2016.
13. Yu M, Nguyen ND, Huang Y, Lin D, Fujimoto TN, Molkentine JM, et al. Mitochondrial fusion exploits a therapeutic vulnerability of pancreatic cancer. *JCI Insight.* 2019 Aug 22;4(16).

14. Liou GY, Döppler H, DelGiorno KE, Zhang L, Leitges M, Crawford HC, et al. Mutant KRas-Induced Mitochondrial Oxidative Stress in Acinar Cells Upregulates EGFR Signaling to Drive Formation of Pancreatic Precancerous Lesions. *Cell Rep*. 2016 Mar 15;14(10):2325–36.
15. Son J, Lyssiotis CA, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, et al. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nat* 2013 4967443. 2013 Mar 27;496(7443):101–5.
16. Rozeveld CN, Johnson KM, Zhang L, Razidlo GL. KRAS Controls Pancreatic Cancer Cell Lipid Metabolism and Invasive Potential through the Lipase HSL. *Cancer Res*. 2020 Nov 15;80(22):4932–45.
17. Davoodi SH, Malek-Shahabi T, Malekshahi-Moghadam A, Shahbazi R, Esmaeili S. Obesity as an Important Risk Factor for Certain Types of Cancer. *Iran J Cancer Prev*. 2013;6(4):186.
18. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol*. 2019;10(1):10–27.
19. Heinen MM, Verhage BAJ, Goldbohm RA, Van Den Brandt PA. Meat and fat intake and pancreatic cancer risk in the Netherlands Cohort Study. *Int J Cancer*. 2009 Sep 1;125(5):1118–26.
20. Thiébaud ACM, Jiao L, Silverman DT, Cross AJ, Thompson FE, Subar AF, et al. Dietary Fatty Acids and Pancreatic Cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2009 Jul 15;101(14):1001–11.
21. Genkinger JM, Spiegelman D, Anderson KE, Bernstein L, Van Den Brandt PA, Calle EE, et al. A pooled analysis of 14 cohort studies of anthropometric factors and pancreatic cancer risk. *Int J cancer*. 2011 Oct 1;129(7):1708–17.
22. Li D, Morris JS, Liu J, Hassan MM, Day RS, Bondy ML, et al. Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA*. 2009 Jun 24;301(24):2553–62.
23. Eibl G, Rozengurt E. Obesity and Pancreatic Cancer: Insight into Mechanisms. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 1;13(20).
24. Okumura T, Ohuchida K, Sada M, Abe T, Endo S, Koikawa K, et al. Extra-pancreatic invasion induces lipolytic and fibrotic changes in the adipose microenvironment, with released fatty acids enhancing the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8(11):18280–95.
25. Jamieson NB, Foulis AK, Oien KA, Dickson EJ, Imrie CW, Carter R, et al. Peripancreatic fat invasion is an independent predictor of poor outcome following pancreaticoduodenectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg*. 2011 Mar;15(3):512–24.
26. Philip B, Roland CL, Daniluk J, Liu Y, Chatterjee D, Gomez SB, et al. A high-fat diet activates oncogenic Kras and COX2 to induce development of pancreatic ductal

- adenocarcinoma in mice. *Gastroenterology*. 2013;145(6):1449–58.
27. Jagust P, De Luxán-Delgado B, Parejo-Alonso B, Sancho P. Metabolism-based therapeutic strategies targeting cancer stem cells. Vol. 10, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
 28. Lonardo E, Cioffi M, Sancho P, Crusz S, Heeschen C. Studying pancreatic cancer stem cell characteristics for developing new treatment strategies. *J Vis Exp*. 2015 Jun 20;2015(100).
 29. Sancho P, Barneda D, Heeschen C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. Vol. 114, *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group; 2016. p. 1305–12.
 30. Trosko JE. On the potential origin and characteristics of cancer stem cells. *Carcinogenesis*. 2021 Jul 16;42(7):905–12.
 31. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*. 2012 Jan 20;148(1–2):349–61.
 32. Dougan SK. The Pancreatic Cancer Microenvironment. *Cancer J*. 2017 Nov 1;23(6):321–5.
 33. Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, et al. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res*. 2008 Feb 1;68(3):918–26.
 34. Erkan M, Adler G, Apte M V., Bachem MG, Buchholz M, Detlefsen S, et al. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut*. 2012 Feb;61(2):172–8.
 35. Veenstra VL, Garcia-Garijo A, Van Laarhoven HW, Bijlsma MF. Extracellular Influences: Molecular Subclasses and the Microenvironment in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018 Feb 1;10(2).
 36. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
 37. Kamphorst JJ, Nofal M, Commisso C, Hackett SR, Lu W, Grabocka E, et al. Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein. *Cancer Res*. 2015 Feb 1;75(3):544–53.
 38. Kamphorst JJ, Cross JR, Fan J, De Stanchina E, Mathew R, White EP, et al. Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 28;110(22):8882–7.
 39. Chen JQ, Russo J. Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Dec;1826(2):370–84.
 40. Espiau-Romera P, Courtois S, Parejo-Alonso B, Sancho P. Molecular and Metabolic Subtypes Correspondence for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Classification. *J Clin*

- Med. 2020 Dec 21;9(12):4128.
41. Daemen A, Peterson D, Sahu N, McCord R, Du X, Liu B, et al. Metabolite profiling stratifies pancreatic ductal adenocarcinomas into subtypes with distinct sensitivities to metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Aug 11;112(32):E4410–7.
 42. Shin MK, Cheong JH. Mitochondria-centric bioenergetic characteristics in cancer stem-like cells. Vol. 42, *Archives of Pharmacal Research*. Pharmaceutical Society of Korea; 2019. p. 113–27.
 43. Wilde L, Roche M, Domingo-Vidal M, Tanson K, Philp N, Curry J, et al. Metabolic coupling and the Reverse Warburg Effect in cancer: Implications for novel biomarker and anticancer agent development. *Semin Oncol*. 2017 Jun 1;44(3):198–203.
 44. Sancho P, Burgos-Ramos E, Tavera A, Bou Kheir T, Jagust P, Schoenhals M, et al. MYC/PGC-1 α balance determines the metabolic phenotype and plasticity of pancreatic cancer stem cells. *Cell Metab*. 2015 Oct 6;22(4):590–605.
 45. Courtois S, de Luxán-Delgado B, Penin-Peyta L, Royo-García A, Parejo-Alonso B, Jagust P, et al. Inhibition of Mitochondrial Dynamics Preferentially Targets Pancreatic Cancer Cells with Enhanced Tumorigenic and Invasive Potential. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 9;13(4):698.
 46. 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.
 47. Liang C, Qin Y, Zhang B, Ji S, Shi S, Xu W, et al. Energy sources identify metabolic phenotypes in pancreatic cancer. Vol. 48, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. Oxford University Press; 2016. p. 969–79.
 48. Blum R, Kloog Y. Metabolism addiction in pancreatic cancer. *Cell Death Dis*. 2014 Feb;5(2).
 49. Butler LM, Perone Y, Dehairs J, Lupien LE, de Laat V, Talebi A, et al. Lipids and cancer: Emerging roles in pathogenesis, diagnosis and therapeutic intervention. Vol. 159, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V.; 2020. p. 245–93.
 50. Gyamfi J, Yeo JH, Kwon D, Min BS, Cha YJ, Koo JS, et al. Interaction between CD36 and FABP4 modulates adipocyte-induced fatty acid import and metabolism in breast cancer. *npj Breast Cancer* 2021 71. 2021 Sep 24;7(1):1–18.
 51. Pan J, Fan Z, Wang Z, Dai Q, Xiang Z, Yuan F, et al. CD36 mediates palmitate acid-induced metastasis of gastric cancer via AKT/GSK-3 β / β -catenin pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019 Feb 4;38(1).
 52. Watt MJ, Clark AK, Selth LA, Haynes VR, Lister N, Rebello R, et al. Suppressing fatty acid uptake has therapeutic effects in preclinical models of prostate cancer. *Sci Transl Med*. 2019 Feb 6;11(478):eaau5758.
 53. Ladanyi A, Mukherjee A, Kenny HA, Johnson A, Mitra AK, Sundaresan S, et al.

- Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis. *Oncogene*. 2018 Apr 1;37(17):2285–301.
54. Tirinato L, Pagliari F, Limongi T, Marini M, Falqui A, Seco J, et al. An Overview of Lipid Droplets in Cancer and Cancer Stem Cells. Vol. 2017, *Stem Cells International*. Hindawi Limited; 2017.
 55. Pohl J, Ring A, Hermann T, Stremmel W. Role of FATP in parenchymal cell fatty acid uptake. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 8;1686(1–2):1–6.
 56. Anderson CM, Stahl A. SLC27 fatty acid transport proteins. *Mol Aspects Med*. 2013 Apr;34(2–3):516–28.
 57. Zhang M, Di Martino JS, Bowman RL, Campbell NR, Baksh SC, Simon-Vermot T, et al. Adipocyte-Derived Lipids Mediate Melanoma Progression via FATP Proteins. *Cancer Discov*. 2018 Aug 1;8(8):1006–25.
 58. Kim YS, Jung J, Jeong H, Lee JH, Oh HE, Lee ES, et al. High Membranous Expression of Fatty Acid Transport Protein 4 Is Associated with Tumorigenesis and Tumor Progression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Dis Markers*. 2019;2019.
 59. Yen MC, Chou SK, Kan JY, Kuo PL, Hou MF, Hsu YL. Solute Carrier Family 27 Member 4 (SLC27A4) Enhances Cell Growth, Migration, and Invasion in Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2018, Vol 19, Page 3434. 2018 Nov 1;19(11):3434.
 60. Sunami Y, Rebelo A, Kleeff J. Lipid metabolism and lipid droplets in pancreatic cancer and stellate cells. Vol. 10, *Cancers*. MDPI AG; 2018.
 61. Lewis CA, Brault C, Peck B, Bensaad K, Griffiths B, Mitter R, et al. SREBP maintains lipid biosynthesis and viability of cancer cells under lipid- and oxygen-deprived conditions and defines a gene signature associated with poor survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene* 2015 3440. 2015 Jan 26;34(40):5128–40.
 62. Yasumoto Y, Miyazaki H, Vaidyan LK, Kagawa Y, Ebrahimi M, Yamamoto Y, et al. Inhibition of Fatty Acid Synthase Decreases Expression of Stemness Markers in Glioma Stem Cells. *PLoS One*. 2016 Jan 1;11(1):e0147717.
 63. Brandi J, Dando I, Pozza ED, Biondani G, Jenkins R, Elliott V, et al. Proteomic analysis of pancreatic cancer stem cells: Functional role of fatty acid synthesis and mevalonate pathways. *J Proteomics*. 2017 Jan 6;150:310–22.
 64. Ginestier C, Monville F, Wicinski J, Cabaud O, Cervera N, Josselin E, et al. Mevalonate Metabolism Regulates Basal Breast Cancer Stem Cells and Is a Potential Therapeutic Target. *Stem Cells*. 2012 Jul 1;30(7):1327–37.
 65. Guillaumond F, Bidaut G, Ouaisi 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 U S A*. 2015 Mar 18;112(8):2473–8.
 66. Sun Y, He W, Luo M, Zhou Y, Chang G, Ren W, et al. SREBP1 regulates tumorigenesis

- and prognosis of pancreatic cancer through targeting lipid metabolism. *Tumor Biol.* 2015 Jun;36(6):4133–41.
67. Li Z, Liu H, Luo X. Lipid droplet and its implication in cancer progression. *Am J Cancer Res.* 2020;10(12):4112–22.
 68. Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Mar 1;20(3):137–55.
 69. Royo-García A, Courtois S, Parejo-Alonso B, Espiau-Romera P, Sancho P. Lipid droplets as metabolic determinants for stemness and chemoresistance in cancer. *World J Stem Cells.* 2021 Sep 26;13(9):1307–17.
 70. Luo J, Hong Y, Tao X, Wei X, Zhang L, Li Q. An indispensable role of CPT-1a to survive cancer cells during energy stress through rewiring cancer metabolism. *Tumor Biol* 2016 3712. 2016 Oct 13;37(12):15795–804.
 71. Shyu P, Wong XFA, Crasta K, Thibault G. Dropping in on lipid droplets: Insights into cellular stress and cancer. Vol. 38, *Bioscience Reports*. Portland Press Ltd; 2018. p. 1–20.
 72. Nieva C, Marro M, Santana-Codina N, Rao S, Petrov D, Sierra A. The lipid phenotype of breast cancer cells characterized by Raman microspectroscopy: towards a stratification of malignancy. *PLoS One.* 2012 Oct 17;7(10).
 73. Rak S, De Zan T, Stefulj J, Kosović M, Gamulin O, Osmak M. FTIR spectroscopy reveals lipid droplets in drug resistant laryngeal carcinoma cells through detection of increased ester vibrational bands intensity. *Analyst.* 2014 Jun 3;139(13):3407–15.
 74. Wang T, Fahrman JF, Lee H, Li YJ, Tripathi SC, Yue C, et al. JAK/STAT3-Regulated Fatty Acid β -Oxidation Is Critical for Breast Cancer Stem Cell Self-Renewal and Chemoresistance. *Cell Metab.* 2018 Jan 9;27(1):136-150.e5.
 75. Aguilar E, Marin De Mas I, Zodda E, Marin S, Morrish F, Selivanov V, et al. Metabolic Reprogramming and Dependencies Associated with Epithelial Cancer Stem Cells Independent of the Epithelial-Mesenchymal Transition Program. *Stem Cells.* 2016 May 1;34(5):1163–76.
 76. Lee EA, Angka L, Rota SG, Hanlon T, Mitchell A, Hurren R, et al. Targeting Mitochondria with Avocatin B Induces Selective Leukemia Cell Death. *Cancer Res.* 2015 Jun 15;75(12):2478–88.
 77. Kuramoto K, Yamamoto M, Suzuki S, Togashi K, Sanomachi T, Kitanaka C, et al. Inhibition of the Lipid Droplet–Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Axis Suppresses Cancer Stem Cell Properties. *Genes* 2021, Vol 12, Page 99. 2021 Jan 14;12(1):99.
 78. Yi M, Li J, Chen S, Cai J, Ban Y, Peng Q, et al. Emerging role of lipid metabolism alterations in Cancer stem cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2018 371. 2018 Jun 15;37(1):1–18.

79. Li J, Condello S, Thomes-Pepin J, Ma X, Xia Y, Hurley TD, et al. Lipid Desaturation Is a Metabolic Marker and Therapeutic Target of Ovarian Cancer Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2017 Mar 2;20(3):303-314.e5.
80. Hershey BJ, Vazzana R, Joppi DL, Havas KM. Lipid Droplets Define a Sub-Population of Breast Cancer Stem Cells. *J Clin Med* 2020, Vol 9, Page 87. 2019 Dec 29;9(1):87.
81. Tirinato L, Liberale C, Di Franco S, Candeloro P, Benfante A, La Rocca R, et al. Lipid Droplets: A New Player in Colorectal Cancer Stem Cells Unveiled by Spectroscopic Imaging. *Stem Cells*. 2015 Jan 1;33(1):35-44.
82. Walther TC, Farese R V. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem*. 2012 Jul;81:687-714.
83. Lee YK, Jung WH, Koo JS. Adipocytes can induce epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Sep 7;153(2):323-35.
84. Gyamfi J, Lee YH, Eom M, Choi J. Interleukin-6/STAT3 signalling regulates adipocyte induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Sci Reports* 2018 81. 2018 Jun 11;8(1):1-13.
85. Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res*. 2011 Apr 1;71(7):2455-65.
86. Nieman KM, Kenny HA, Penicka C V., Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*. 2011 Nov;17(11):1498-503.
87. Laurent V, Guérard A, Mazerolles C, Le Gonidec S, Toulet A, Nieto L, et al. Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity. *Nat Commun*. 2016 Jan 12;7.
88. Cai Z, Liang Y, Xing C, Wang H, Hu P, Li J, et al. Cancer-associated adipocytes exhibit distinct phenotypes and facilitate tumor progression in pancreatic cancer. *Oncol Rep*. 2019;42(6):2537-49.
89. Nath A, Li I, Roberts LR, Chan C. Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*. 2015 Oct 1;5.
90. Rebours V, Gaujoux S, D'Assignies G, Sauvanet A, Ruzzniewski P, Lévy P, et al. Obesity and Fatty Pancreatic Infiltration Are Risk Factors for Pancreatic Precancerous Lesions (PanIN). *Clin Cancer Res*. 2015 Aug 1;21(15):3522-8.
91. Hertzner KM, Xu M, Moro A, Dawson DW, Du L, Li G, et al. Robust Early Inflammation of the Peripancreatic Visceral Adipose Tissue During Diet-Induced Obesity in the KrasG12D Model of Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2016;45(3):458-65.
92. Balaban S, Shearer RF, Lee LS, van Geldermalsen M, Schreuder M, Shtein HC, et al. Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration. *Cancer Metab*. 2017 Dec;5(1).

93. Takehara M, Sato Y, Kimura T, Noda K, Miyamoto H, Fujino Y, et al. Cancer-associated adipocytes promote pancreatic cancer progression through SAA1 expression. *Cancer Sci.* 2020 Aug 1;111(8):2883–94.
94. Nieto MA, Huang RYYJ, Jackson RAA, Thiery JPP. EMT: 2016. *Cell.* 2016 Jun 30;166(1):21–45.
95. Their JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(6):442–54.
96. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 Jun 1;119(6):1420–8.
97. Kazantzis M, Stahl A. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012 May;1821(5):852–7.
98. Witkiewicz AK, Nguyen KH, Dasgupta A, Kennedy EP, Yeo CJ, Lisanti MP, et al. Co-expression of fatty acid synthase and caveolin-1 in pancreatic ductal adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical outcome. *Cell Cycle.* 2008 Oct 1;7(19):3021–5.
99. ALO PL, AMINI M, PIRO F, PIZZUTI L, SEBASTIANI V, BOTTI C, et al. Immunohistochemical Expression and Prognostic Significance of Fatty Acid Synthase in Pancreatic Carcinoma. *Anticancer Res.* 2007;27(4B).

ANEXO I

Tabla 6. Listado de primers utilizados para realizar las RT-qPCRs

PRIMERS	SECUENCIA (5' a 3')	PROVEEDOR
HPRT- <i>reverse</i>	CGA GCA AGA CGT TCA GTC CT	Sigma-Aldrich, EEUU
HPRT- <i>forward</i>	TAGSA CCT TAGSA TTT ATT TTAGS CAT ACC	Sigma-Aldrich, EEUU
KLF4- <i>reverse</i>	ATAGS TAGST AAG GCG AGG TAGSG TC	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, EEUU
KLF4- <i>forward</i>	ACC CAC ACA GGT GAG AAA CC	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, EEUU
SOX2- <i>reverse</i>	CGG GGC CGG TAT TTA TAA TC	Sigma-Aldrich, EEUU
SOX2- <i>forward</i>	AGA ACC CCA AGA TAGSC ACA AC	Sigma-Aldrich, EEUU
NANOG- <i>reverse</i>	TAGSC CAC CTC TTA GAT TTC ATT CTC T	Sigma-Aldrich, EEUU
NANOG- <i>forward</i>	AGA ACT CTC CAA CAT CCT GAA CCT	Sigma-Aldrich, EEUU
OCT4- <i>reverse</i>	CTAGS CAG TAGST GGG TTT CGG GCA	Sigma-Aldrich, EEUU
OCT4- <i>forward</i>	CTT GCT GCA GAA GTAGS GGT GGA GGA A	Sigma-Aldrich, EEUU
SNAIL- <i>reverse</i>	TAGSA CAT CTAGS AGT GGG TCT GG	Sigma-Aldrich, EEUU
SNAIL- <i>forward</i>	GCT CCT TCG TCC TTC TCC TC	Sigma-Aldrich, EEUU
SLUG- <i>reverse</i>	TTC TCC CCC GTAGS TAGSA GTT CT	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, EEUU
SLUG- <i>forward</i>	GTAGS TTT GCA AGA TCT GCG GC	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, EEUU
VIM- <i>reverse</i>	TCC TCC GCC TCC TAGSC AGG TTC TT	Sigma-Aldrich, EEUU
VIM- <i>forward</i>	GAC AAT GCG TCT CTAGS GCA CGT CTT	Sigma-Aldrich, EEUU
ZEB1- <i>reverse</i>	CTAGS GTC CTC TTC AGG TAGSC C	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, EEUU
ZEB1- <i>forward</i>	GAT GAT GAA TAGSC GAG TCA GAT GC	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, EEUU
CD36- <i>reverse</i>	CAG CGT CCT GGG TTA CAT TTT C	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, USA
CD36- <i>forward</i>	TAGSA TAGSA ACA GCA GCA ACA TTC A	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, EEUU
SLC27A1- <i>reverse</i>	CCC CAG CAG CCA CAA CAG	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, USA
SLC27A1- <i>forward</i>	CTC TCT GCT TCC CCA GGA TAGS	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, EEUU
SLC27A3- <i>reverse</i>	CTAGS TAC CGG GCA GTT GTAGS AG	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, EEUU
SLC27A3- <i>forward</i>	GTT CGG ATAGS GCA AAT GAG GG	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, EEUU
SLC27A4- <i>reverse</i>	ACA GAT GAG GCG GGT CAA TAGS	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, EEUU
SLC27A4- <i>forward</i>	GGC TCA GGG GCC AAT AAA CT	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, EEUU