



ESCUELA DE DOCTORADO  
INTERNACIONAL DE LA USC

Pablo  
Hurtado Blanco

Tesis doctoral

Regulación de la capacidad  
metastásica de los clústeres de  
CTC mediada por la interacción  
con los fibroblastos asociados a  
cáncer

Santiago de Compostela, 2022

**Programa de doctorado en Medicina Molecular**



TESIS DE DOCTORADO

**REGULACIÓN DE LA CAPACIDAD  
METASTÁSICA DE LOS  
CLÚSTERES DE CTC MEDIADA  
POR LA INTERACCIÓN CON LOS  
FIBROBLASTOS ASOCIADOS A  
CÁNCER**

PABLO HURTADO BLANCO

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR



SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2022





## DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

D./Dña. **Pablo Hurtado Blanco**

Título de la tesis: **Regulación de la capacidad metastásica de los clústeres de CTC mediada por la interacción de los fibroblastos asociados a cáncer**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Santiago de Compostela, 15 de diciembre de 2021.**

**Firma electrónica**







## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

D./Dña. **Rafael López López y Roberto Piñeiro Cid**

En condición de: **Tutor/a y director/a**

Título de la tesis: **Regulación de la capacidad metastásica de los clústeres de CTC mediada por la interacción de los fibroblastos asociados a cáncer**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **Pablo Hurtado Blanco**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Santiago de Compostela, 15 de diciembre de 2021**

**Firma electrónica**





El trabajo descrito en esta tesis se realizó en el marco de la Unidad Mixta Roche-CHUS (IN853B 2018/03), en el Hospital Universitario de Santiago de Compostela (CHUS), España.

El trabajo de esta tesis contó con el apoyo financiero de la Agencia Gallega de Innovación (GAIN), Consellería de Economía, Emprego e Industria y Roche Pharma. Pablo Hurtado Blanco estuvo financiado por la beca predoctoral (IN606A-2018/019) de la Axencia Galega de Innovación (GAIN, Xunta de Galicia).





Yo, Pablo Hurtado Blanco, autor de esta tesis, declaro que no tengo ningún conflicto de intereses.

Yo, Pablo Hurtado Blanco, autor de esta tesis, declaro que todas las figuras presentes en este documento son originales y han sido realizadas por mí.



*A mi abuelo.*



# ÍNDICE



## INDICE

<b>INDICE</b> .....	15
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b> .....	21
<b>RESUMEN</b> .....	26
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	36
<b>1. CÁNCER DE MAMA</b> .....	36
<b>2. METÁSTASIS</b> .....	36
<b>3. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES (CTC)</b> .....	38
<b>4. CLÚSTERES DE CTC</b> .....	39
<b>4.1. Origen de los clústeres de CTC</b> .....	39
<b>4.2. Valor pronóstico de los clústeres de CTC</b> .....	40
<b>4.3. Potencial metastásico de los clústeres de CTC</b> .....	41
<b>5. CONTRIBUCIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL A LA METÁSTASIS</b> .....	43
<b>5.1. Interacción microambiente-CTC</b> .....	44
<b>6. FIBROBLASTOS ASOCIADOS A CÁNCER (CAF)</b> .....	45
<b>6.1. Origen de los CAF</b> .....	45
<b>6.2. Contribución de los CAF al establecimiento y progresión tumoral</b> .....	46
<b>6.3. Papel de los CAF en la formación de clústeres de CTC</b> .....	48
<b>7. MODELOS ANIMALES APLICADOS EN EL ESTUDIO DE LOS CLÚSTERES DE CTC</b> .....	49
<b>7.1. Modelos murinos</b> .....	49
<b>7.2. Pez cebra</b> .....	51
<b>OBJETIVOS</b> .....	56
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	60
<b>1. CULTIVOS CELULARES Y GENERACIÓN DE COCULTIVOS</b> .....	60
<b>1.1 Líneas celulares</b> .....	60
<b>1.2. Generación de clústeres</b> .....	60
<b>2. ENSAYOS FUNCIONALES <i>IN VITRO</i></b> .....	60
<b>2.1. Proliferación y viabilidad celular</b> .....	61
<b>2.2. Migración en insertos Transwell®</b> .....	61

2.3 Cierre de herida.....	61
2.4. Colonogénesis.....	62
3. ENSAYOS DE FENOTIPADO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR <i>IN VITRO</i> .....	62
3.1. Análisis de expresión génica.....	62
3.2. Estudio de interacción paracrina en co-cultivo.....	63
3.3. Activación con TGF- $\beta$ .....	63
3.4. Ensayo de agregación.....	64
3.5. Formación de esferoides en gota colgante ( <i>Hanging drop</i> ).....	64
3.6. Inmunofluorescencia.....	64
3.7. Ensayo de detección de citoquinas y quimioquinas.....	65
4. ENSAYOS FUNCIONALES <i>IN VIVO</i> .....	66
4.1. Xenotrasplante en embriones de pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ).....	66
4.2. Experimentos en ratón ( <i>Mus musculus</i> ).....	67
4.2.1. Ensayo de colonización en pulmón de ratón.....	67
4.2.2. Xenotrasplante ortotópico en ratón.....	68
5. ANÁLISIS DE DATOS.....	69
RESULTADOS.....	73
1. CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS TUMORALES EN COCULTIVO CON vCAF <sup>F<sup>m</sup>CHERRY</sup> .....	73
1.1. Determinación de la capacidad metastásica mediante ensayos funcionales.....	73
1.2.....	77
2. ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE vCAF <sup>F<sup>m</sup>CHERRY</sup> A LA DISEMINACIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA EN MODELOS <i>IN VIVO</i> .....	80
2.1. Obtención de clústeres de líneas celulares y optimización del xenotrasplante en pez cebra.....	80
2.2. Diseminación y supervivencia de células tumorales y fibroblastos en xenotrasplantes con clústeres heterotípicos.....	84
2.2.1. La interacción entre MCF7 <sup>eGFP-luc</sup> y vCAF <sup>F<sup>m</sup>Cherry</sup> en clústeres afecta a la supervivencia de las células tumorales.....	84
3. COMPARATIVA DEL EFECTO DE vCAF <sup>F<sup>m</sup>CHERRY</sup> Y FIBROBLASTOS NORMALES (BJ) SOBRE LA DISEMINACIÓN TUMORAL EN MODELOS <i>IN VIVO</i> .....	91
3.1. Los fibroblastos vCAF <sup>F<sup>m</sup>Cherry</sup> y BJ presentan el mismo comportamiento respecto a la diseminación de las células tumorales.....	91
3.2. La presencia de vCAF <sup>F<sup>m</sup>Cherry</sup> diseminados favorece la supervivencia y proliferación de las células tumorales.....	92
3.3. La supervivencia en el tiempo de fibroblastos vCAF <sup>F<sup>m</sup>Cherry</sup> favorece la proliferación de las células tumorales.....	95

3.4. El efecto de vCAF <sup>mCherry</sup> sobre MDA-MB-231 <sup>eGFP-luc</sup> está determinado por la interacción física entre ambas poblaciones celulares. ....	98
3.5. Los clústeres heterotípicos no poseen una ventaja metastásica en el ratón .....	103
4. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO MOLECULAR DE vCAF <sup>mCherry</sup> Y BJ.....	105
4.1. Los fibroblastos vCAF <sup>mCherry</sup> presentan un perfil de expresión de marcadores de activación similar a fibroblastos BJ .....	105
4.2. El tratamiento con TGF-β induce la activación de los fibroblastos vCAF <sup>mCherry</sup> y promueve la diseminación de las células MDA-MB-231 <sup>eGFP-luc</sup> .....	106
5. EFECTO DE LOS vCAF <sup>mCherry</sup> SOBRE LA GENERACIÓN DE CTC Y CLÚSTERES DE CTC EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA .....	111
5.1. Los fibroblastos vCAF <sup>mCherry</sup> ralentizan el crecimiento tumoral y la formación de metástasis .....	112
5.2. Efecto de los vCAF <sup>mCherry</sup> sobre la generación de CTC y clústeres de CTC .....	115
5.3. La interacción específica entre MDA-MB-231 <sup>eGFP-luc</sup> y vCAF <sup>mCherry</sup> favorece la agregación celular, pero no da lugar a estructuras conjuntas específicas .....	118
DISCUSIÓN.....	124
CONCLUSIONES.....	140
AGRADECIMIENTOS .....	145
REFERENCIAS .....	150
APÉNDICES.....	167



# **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido Desoxirribonucleico complementario
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>B2M</b>	<i>Beta-2-Microglobulina</i>
<b>CAF</b>	Fibroblastos Asociados a Cáncer
<b>CDX</b>	Xenotrasplantes Derivados de Línea celular
<b>CDXs</b>	Xenotrasplantes Derivados de CTC
<b>CSC</b>	<i>Cancer Stem Cells</i>
<b>CTC</b>	Células Tumorales Circulantes
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>eGFP</b>	Proteína Fluorescente Verde aumentada
<b>EpCAM</b>	Molécula de Adhesión Celular Epitelial
<b>ER</b>	Receptor <i>alpha</i> de Estrógenos
<b>FAP</b>	Proteína de Activación de Fibroblasto
<b>FBS</b>	Suero Bovino Fetal
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FSP1</b>	Proteína Específica de Fibroblasto 1
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehido-3-Fosfato Dehidrogenasa
<b>HER2</b>	Factor de Crecimiento Epidérmico Humano
<b>Hif1<math>\alpha</math></b>	Factor 1- $\alpha$ Inducible por Hipoxia
<b>HPF</b>	Horas Post Fertilización
<b>HPI</b>	Horas Post Inyección
<b>Luc</b>	Luciferasa
<b>MAM</b>	Macrófagos Asociados a Metástasis
<b>MAT</b>	Macrófagos Asociados a Tumor
<b>mCherry</b>	Proteína Fluorescente Roja
<b>MDSCs</b>	Células Supresoras Derivadas Mieloides
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>MMP</b>	Metaloproteasas de Matriz
<b>MUC1</b>	Mucina-1
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>P/S</b>	Penicilina/Estreptomina
<b>PBS</b>	Tampón Fosfato Salino
<b>PDGFR<math>\alpha</math></b>	Receptor de Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas <i>Alpha</i>
<b>PDGFR<math>\beta</math></b>	Receptor de Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas <i>Beta</i>
<b>PDX</b>	Xenotrasplantes Derivados de Pacientes
<b>PEM</b>	Plasticidad Epitelio-Mesénquima

<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PR</b>	Receptor de Progesterona
<b>PTU</b>	N-Phenylthiourea
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>ROS</b>	Radicales Libres de Oxígeno
<b>TEM</b>	Transición Epitelio-Mesénquima
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante Beta
<b>VEGF</b>	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Actina <i>Alpha</i> de Músculo Liso



# RESUMEN



## RESUMEN

El cáncer es la principal causa de muerte en los países desarrollados, siendo el cáncer de mama el tipo de tumor más comúnmente diagnosticado en mujeres a nivel mundial. Este cáncer se subdivide en tres subtipos moleculares, dependiendo de la expresión de los biomarcadores receptor *alpha* de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2): luminal, HER2<sup>+</sup> y triple negativo. Cada subtipo correlaciona con un comportamiento único, incluyendo diferencias en supervivencia, metástasis y respuesta al tratamiento.

La metástasis es un proceso mediante el cual el tumor se extiende desde su lugar de origen hasta órganos distantes. Actualmente, la enfermedad metastásica se considera incurable, produciendo más del 90% de las muertes asociadas a cáncer. Las células tumorales circulantes (CTC) son células detectadas en la sangre periférica de los pacientes con cáncer y son las principales responsables de la metástasis. Durante este proceso, las células de los tumores epiteliales sufren cambios estructurales y funcionales que les permitirán metastatizar a tejidos y órganos lejanos, siendo la transición epitelio-mesénquima (TEM) el principal mecanismo a través del cual las células tumorales se liberan de sus uniones con las células vecinas y adquieren características mesenquimales que les confieren un fenotipo invasivo. Una vez las células tumorales adquieren capacidad invasiva, deben intravasarse a través de la pared endotelial de los vasos sanguíneos para entrar en la circulación y, una vez allí, sobrevivir como CTC. En el torrente sanguíneo, las CTC son sometidas a diversos factores de estrés que limitan su supervivencia, como choques contra células endoteliales, el ataque de células inmunes, fuerzas hemodinámicas y la anoikis por la pérdida de señales de adhesión célula-célula. Tras sobrevivir en circulación, las CTC deben extravasarse, adaptarse y proliferar en un nuevo tejido. La gran cantidad de obstáculos que deben superar las células tumorales para establecer un tumor a través de la metástasis implica que, pese al gran número de células tumorales que llegan a la sangre, el proceso metastásico sea altamente ineficiente.

Las CTC son detectadas en pacientes mediante la biopsia líquida, una técnica analítica mínimamente invasiva que se realiza a partir de fluidos biológicos, principalmente la sangre, permitiendo el diagnóstico y seguimiento del cáncer. La enumeración de CTC mediante el sistema CellSearch<sup>®</sup>, que reconoce las CTC en función de marcadores epiteliales de superficie, ha establecido una relación entre el número de CTC en sangre y el pronóstico de la enfermedad en pacientes con cáncer de mama metastásico. Así, pacientes con  $\geq 5$  CTC/7,5 mL de sangre periférica presentan un peor pronóstico que pacientes con  $< 5$  CTC/7,5 mL. Por otro lado, también existen métodos de detección basados en el tamaño y densidad de las CTC que permiten la detección de poblaciones de CTC con mayor plasticidad en cuanto a la expresión de fenotipos epiteliales y mesenquimales.

Las CTC pueden encontrarse en la sangre de pacientes como células individuales o clústeres de CTC, grupos de dos o más células tumorales. El origen de estos clústeres parece situarse tanto en la migración colectiva de células procedentes del tumor primario como en una agregación intravascular de células individuales. La aparición de estos clústeres en la sangre es baja, ya que solo el 2-5% de las CTC en sangre son clústeres, y diversos estudios han demostrado su presencia como marcadores de pronóstico independientes a la enumeración de

CTC. Por otro lado, se ha demostrado que los clústeres de CTC tienen un mayor potencial metastásico que las CTC individuales. Dentro de estos clústeres coexisten poblaciones heterogéneas de CTC, algo que ha sido demostrado en cáncer de próstata, pulmón y mama, que permiten la diseminación de estos grupos celulares al torrente sanguíneo mientras mantienen la expresión de moléculas de adhesión célula-célula. La existencia de uniones célula-célula en los clústeres de CTC les permite escapar de la anoikis, mientras que la agregación celular les protege de la apoptosis y de los radicales libres de oxígeno producidos en respuesta a la separación de las células de la matriz extracelular (MEC). A nivel génico, en los clústeres de CTC se ha observado una disminución de la expresión de genes asociados a apoptosis y respuesta inmune, así como el aumento de expresión de genes asociados a proliferación y “stemness”, mientras que análisis transcriptómicos han demostrado cómo los clústeres de CTC mantienen características epiteliales que permiten la formación y mantenimiento del clúster en circulación.

Las CTC que sobreviven en el torrente sanguíneo y extravasan a un nuevo tejido no realizan el proceso en solitario, sino que reclutan a las células del estroma, como células inmunes, células angiogénicas y fibroblastos asociados a cáncer, para crear un microambiente tumoral que contribuya al establecimiento del tumor. Cada subtipo celular afecta de manera distinta a las células tumorales, afectando a la proliferación, alteración del metabolismo energético o la evasión de muerte celular.

Algunas células pertenecientes al microambiente se han detectado también como parte de clústeres de CTC en la sangre de pacientes y modelos murinos, dando lugar a los llamados clústeres de CTC heterotípicos. La formación de microagregados con plaquetas, por ejemplo, protege a las CTC de la muerte celular inducida por estrés y por células asesinas naturales (NK). Asimismo, esta agregación de plaquetas con CTC aumenta la extravasación tumoral mediante la liberación de TGF- $\beta$  por parte de las plaquetas. Por otro lado, los neutrófilos parecen estar implicados en la diseminación de clústeres homotípicos y heterotípicos CTC-neutrófilos, asociándose la presencia de estos últimos a una peor supervivencia libre de progresión en pacientes. Además, los neutrófilos promueven el atrapamiento de las CTC en los sitios de metástasis, facilitando su adhesión al endotelio, y pueden facilitar su extravasación mediante la secreción de metaloproteasas que degradan la MEC.

Los fibroblastos asociados a cáncer (CAF) son el componente celular más numeroso del microambiente tumoral. La mayoría de los CAF proceden de fibroblastos sanos del tejido conectivo que son activados debido a su proximidad al tumor. Sin embargo, se han descrito otros orígenes a partir de células epiteliales, endoteliales, adipocitos, pericitos y células de músculo liso. El conjunto de todos los posibles precursores contribuye a la gran heterogeneidad molecular y funcional observada en las diferentes sub-poblaciones de CAF, lo cual se ve reflejado en la amplia variedad de marcadores biológicos utilizados para su identificación. Los marcadores más comúnmente utilizados son la actina *alpha* de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), la proteína de activación de fibroblasto (FAP), la proteína específica de fibroblasto 1 (FSP1) y los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$ ).

Los CAF aumentan la rigidez de la MEC mediante el depósito de colágeno, ácido hialurónico, fibronectinas y laminina, lo cual facilita la unión de las células tumorales al endotelio y la intravasación en el sistema circulatorio. Además, la secreción de proteínas proangiogénicas por parte de los CAF contribuye a la angiogénesis, mientras que la secreción de factores de supervivencia como IGF-1 e IGF-2 limitan la apoptosis de las células tumorales. Por otro lado, se ha descrito una relación simbiótica entre los CAF y las células tumorales, en la que los primeros pueden intercambiar recursos energéticos con los segundos para promover el crecimiento tumoral. De igual modo que plaquetas y neutrófilos, los CAF pueden viajar en

sangre junto a las CTC, posiblemente aportando una mayor supervivencia a las células tumorales. Se ha descrito que los clústeres heterotípicos de CTC y CAF encontrados en la sangre de modelos murinos muestran una menor incidencia de células apoptóticas comparado con CTC individuales o clústeres homotípicos de células tumorales, ya que la presencia de los CAF en los clústeres heterotípicos parece proteger a las células tumorales de las fuerzas hemodinámicas. Además, los CAF pueden aumentar el potencial metastásico de las células tumorales mediante la inducción de TEM a través de la secreción de TGF- $\beta$ . Finalmente, los CAF contribuyen al nicho premetastásico de forma directa, mediante su movilización desde el tumor primario.

En el cáncer de mama, los clústeres de CTC encontrados en la sangre muestran tanto fenotipos mesenquimales como epiteliales. La migración de las células tumorales desde el tumor primario puede darse a través de la TEM, mediante la cual las células adquieren un fenotipo mesenquimal, o a través de una migración colectiva mientras mantienen las adhesiones célula-célula. Se ha especulado que, dentro de estos grupos celulares, las células tumorales que exhiben características mesenquimales actuarían como líderes de las células que aún mantienen su fenotipo epitelial. En este sentido, diversos estudios han mostrado cómo los CAF dirigen la invasión de los clústeres de células tumorales a través de interacciones físicas, moviéndose como cadenas colectivas a través de huecos generados en la MEC o mediante la adhesión de N-cadherina y E-cadherina de las membranas de CAF y células tumorales, respectivamente. No obstante, parece que los CAF también pueden guiar la migración de las CTC sin necesidad de una interacción física, favoreciendo la formación de clústeres homotípicos de células tumorales. Asimismo, factores liberados por los CAF pueden producir la formación de una población híbrida epitelio-mesénquima, que lidera la migración de las células epiteliales.

El objetivo de la presente tesis doctoral consiste en entender la biología de los clústeres de CTC y su elevada capacidad metastásica en el cáncer de mama. Concretamente, se trata de comprender la heterogeneidad celular asociada a estos clústeres de CTC y cómo células del microambiente tumoral, en particular los CAF, pueden interaccionar con ellos y condicionar su capacidad de desarrollar metástasis. Asimismo, se busca descubrir las posibles modificaciones moleculares producidas por los CAF sobre las CTC en los clústeres heterotípicos.

Para la realización de estos objetivos, se desarrolló un modelo *in vitro* de clústeres de CTC homotípicos de células tumorales a partir de las líneas tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup>, y clústeres heterotípicos formados además por fibroblastos asociados a cáncer (vCAF<sup>mCherry</sup>) y fibroblastos normales (BJ). La línea celular MDA es una línea celular de cáncer de mama triple negativo, muy agresiva, invasiva y poco diferenciada. La línea MCF7 es una línea celular de cáncer de mama luminal A, poco agresiva y no invasiva, considerada de bajo potencial metastásico. Ambas líneas expresan la proteína verde fluorescente aumentada (eGFP) y el gen luciferasa (Luc), necesarios para el posterior análisis de los resultados mediante la detección de fluorescencia o bioluminiscencia. Por otro lado, la línea vCAF<sup>mCherry</sup> expresa la proteína roja fluorescente mCherry.

Los resultados de los ensayos funcionales *in vitro* muestran un comportamiento diferente para las líneas tumorales en presencia de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>, tanto cuando forman parte de un cocultivo como cuando forman parte de clústeres. Se pudo observar que la proliferación de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> se ve ralentizada en presencia de la línea vCAF<sup>mCherry</sup>, mientras que la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> ve su ritmo de proliferación aumentado en presencia de vCAF<sup>mCherry</sup>. En línea con este efecto, se observó una ralentización en el cierre de herida en los cocultivos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, mientras que la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> veía acelerada su diseminación en presencia de vCAF<sup>mCherry</sup>. Además, se observó un menor tamaño de colonias formadas sobre agar en el caso de los clústeres heterotípicos

formados por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, mientras que los clústeres heterotípicos formados por MCF7<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> dieron lugar a un mayor número de estas colonias. Hay que destacar que, en base a los resultados de estos ensayos funcionales, el efecto de los vCAF<sup>mCherry</sup> fue ratio-dependiente, es decir, a mayor cantidad de fibroblastos en el cocultivo, mayor efecto sobre las células tumorales. Por otro lado, en los ensayos de migración en Transwell<sup>®</sup> se pudo apreciar una mayor migración por parte de los clústeres heterotípicos tanto en el caso de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> como MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en comparación con los clústeres homotípicos.

Los resultados de nuestros ensayos *in vitro* sugieren la existencia de modificaciones en los perfiles moleculares de las células tumorales, por lo que se sembraron cocultivos de células tumorales y vCAF<sup>mCherry</sup> separados por insertos de membrana, permitiendo analizar en cada población la expresión de genes asociados a TEM y a la activación de fibroblastos. El cultivo de fibroblastos con MCF7<sup>eGFP-luc</sup> no afectó a la expresión del marcador epitelial CDH1 en las células tumorales ni indujo la expresión de CDH2 y VIM, marcadores mesenquimales, indicando que vCAF<sup>mCherry</sup> no está provocando una TEM sobre MCF7<sup>eGFP-luc</sup>. La línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> solo expresa VIM, al contrario que la línea vCAF<sup>mCherry</sup> que expresa VIM y CDH2. Estos fibroblastos no produjeron tampoco la inducción de TEM sobre MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, pues no afectaron a la expresión de VIM en esta línea tumoral. En cuanto a la expresión de los marcadores asociados a la activación de fibroblastos FN1, FSP1, ACTA2 y FAP, estos no varían de forma significativa en los vCAF<sup>mCherry</sup> cocultivados con las células tumorales respecto a los vCAF<sup>mCherry</sup> en monocultivo. Por tanto, los resultados de expresión génica indican que la intercomunicación de las células tumorales con los fibroblastos a través de factores secretados no es capaz de inducir cambios significativos de expresión génica en marcadores de TEM y de activación de fibroblastos.

Debido a la baja frecuencia de los clústeres de CTC en sangre de los pacientes, se realizaron xenotrasplantes de clústeres homotípicos de células tumorales y heterotípicos de células tumorales y fibroblastos en modelos animales para estudiar el efecto de los vCAF<sup>mCherry</sup> y BJ sobre las capacidades metastásicas de las líneas tumorales MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup>. Así, los xenotrasplantes en embriones de pez cebra con la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> mostraron una pobre capacidad de diseminación a la cola del embrión tanto para los clústeres homotípicos como heterotípicos, demostrando que la presencia de estos fibroblastos en el clúster no favorece la diseminación de estas células tumorales pobremente metastásicas. Sin embargo, sí se observó un aumento de la supervivencia de MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en el sitio de inyección cuando son xenotrasplantadas como clústeres heterotípicos junto a vCAF<sup>mCherry</sup>, coincidiendo con los resultados obtenidos en la generación de colonias *in vitro*. Respecto a la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, los fibroblastos no afectaron de forma significativa a la diseminación de las células tumorales cuando fueron inyectadas como clústeres heterotípicos, aunque se observó una tendencia a una menor diseminación respecto a los clústeres homotípicos. Asimismo, se realizaron xenotrasplantes de suspensiones celulares individualizadas homotípicas y heterotípicas con esta línea tumoral, en los que se observó que la presencia de vCAF<sup>mCherry</sup> disminuye la diseminación de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> a la cola. Comparando ambos diseños experimentales, pudimos observar que la agregación de las células tumorales en clústeres de CTC favorece su supervivencia, efecto independiente de la presencia de vCAF<sup>mCherry</sup>. Por otra parte, los xenotrasplantes con clústeres heterotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y fibroblastos BJ mostraron resultados similares, no llegando a observarse diferencias significativas en la diseminación de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> respecto a los clústeres homotípicos de esta línea tumoral. Esto confirma que, pese a la procedencia tumoral de vCAF<sup>mCherry</sup>, estos no poseen un fenotipo capaz de aumentar la capacidad invasiva de las células tumorales.

En nuestros xenotrasplantes en pez cebra, pudimos observar la diseminación conjunta de fibroblastos y células tumorales, aunque no en todos los embriones. Tanto en embriones xenotrasplantados con clústeres heterotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> como de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y BJ, la presencia de fibroblastos diseminados en la cola de los peces se asocia a una mayor diseminación tumoral. Los análisis de regresión asociando la fluorescencia de las células tumorales y los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> indican que hay cierto componente de migración de las células tumorales dependiente de la acción de los fibroblastos, aunque la similitud de los resultados de diseminación obtenidos con los clústeres heterotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> con vCAF<sup>mCherry</sup> y MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> con BJ se traduce en que gran parte de dicha diseminación no es activa, sino una diseminación pasiva conjunta desde el sitio de inyección. Es interesante destacar que, en presencia de vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados, la cantidad de células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en la cola aumentó en el tiempo, mientras que el número de células tumorales en embriones con BJ en cola se mantuvo estable. Este resultado parece indicar que, aunque los vCAF<sup>mCherry</sup> no ejercen un efecto pro-invasivo sobre la diseminación inicial de las MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> desde el Ducto de Cuvier, sí están favoreciendo el anidamiento y posterior crecimiento de las células tumorales. Por último, podemos afirmar que el efecto de los vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la supervivencia y proliferación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas es dependiente de su presencia mantenida en el tiempo, ya que solo se pudo observar cuando los fibroblastos fueron capaces de sobrevivir tras la diseminación. Además, dicho efecto se dio al contrario en aquellos peces en los que los fibroblastos BJ diseminados sobreviven en el tiempo, provocando una disminución del número de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas. Sorprendentemente, se observó una reducción en el número total de vCAF<sup>mCherry</sup> a lo largo del tiempo, lo que parece sugerir que se está produciendo un fenómeno de selección en el que la supervivencia de subpoblaciones de vCAF<sup>mCherry</sup> con capacidad de potenciar la proliferación de las células tumorales es favorecida.

Se realizó un inmunoensayo en distintas condiciones de cultivo (monocultivo, cocultivo con interacción física y cocultivo con interacción paracrina) de células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, observándose una producción diferencial de citoquinas, detectándose la secreción de CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10 e ICAM1/CD54 solo cuando existen interacciones físicas entre MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>. Estas citoquinas se han descrito como potenciadoras de la motilidad e invasión de las células tumorales, estando CXCL10/IP-10 e ICAM/CD54 además favoreciendo un fenotipo metastásico en células tumorales de cáncer de mama. La detección de estas citoquinas solo cuando existe interacción física puede ser un factor clave en la supervivencia y proliferación tumoral en los xenotrasplantes de pez cebra. En conjunto, estos resultados muestran un efecto diferencial de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> y BJ sobre la supervivencia y proliferación de las MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas en la cola de peces cebra, siendo este efecto dependiente tanto de la capacidad de supervivencia de los propios vCAF<sup>mCherry</sup> como de su interacción física con las células tumorales derivadas de los clústeres heterotípicos.

Estos resultados obtenidos en el pez cebra contrastan con los resultados obtenidos en ensayos de colonización pulmonar en ratones, en el cual se observó una clara disminución de la capacidad de anidamiento y crecimiento de los clústeres heterotípicos respecto a los homotípicos, produciendo un número inferior de metástasis y sin observar ningún efecto potenciador de la proliferación celular. Sin embargo, el análisis histopatológico de los tejidos pulmonares no fue concluyente y no se pudo confirmar la presencia de vCAF<sup>mCherry</sup> en las lesiones metastásicas pulmonares.

Dado el efecto similar que producen los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> y BJ sobre la diseminación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en el pez cebra, nos planteamos analizar la

expresión génica de los marcadores de activación de vCAF<sup>mCherry</sup> más comúnmente utilizados:  $\alpha$ -SMA, FAP, FN1, FSP1, TNC, PDGFR $\alpha$  y PDGFR- $\beta$ . Se pudo observar, pues, que la expresión de la mayoría de estos marcadores es similar entre ambas líneas celulares. Esto se traduce en que, pese a proceder de un ambiente tumoral, los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> no presentan un patrón molecular claro de activación, lo que podría estar relacionado con la falta de un fenotipo potenciador de la diseminación tumoral en nuestros modelos *in vivo*.

En conjunto, los resultados de expresión de marcadores de activación de vCAF<sup>mCherry</sup>, junto a los estudios de expresión génica en cultivos de interacción paracrina y el ensayo de producción de citoquinas, parece indicar que esta línea de vCAF<sup>mCherry</sup> podría corresponderse con una población de fibroblastos asociados a cáncer con limitada capacidad de comunicación paracrina y dependiente de las interacciones físicas con las células tumorales para ejercer un efecto regulador sobre ellas. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron ensayos de estimulación de vCAF<sup>mCherry</sup> con TGF- $\beta$ , uno de los principales inductores de la activación de fibroblastos. Los análisis de expresión génica en fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> estimulados con TGF- $\beta$  derivaron en un aumento de la expresión de los genes FN1 y FAP, así como tendencias a un aumento de ACTA2 y TNC. Esto indica que los vCAF<sup>mCherry</sup> son capaces de responder a estímulos del microambiente tumoral, adquiriendo un perfil molecular de activación, el cual no es observado en los cocultivos de interacción paracrina con las células tumorales. Además, estos cambios moleculares se tradujeron en cambios funcionales, pues en ensayos de migración en Transwell<sup>®</sup>, así como en xenotrasplantes en pez cebra, los clústeres heterotípicos formados por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> activados con TGF- $\beta$  muestran un mayor número de células tumorales migradas que los clústeres heterotípicos con fibroblastos sin tratar. En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto que los vCAF<sup>mCherry</sup> son capaces de adquirir un fenotipo potenciador de la diseminación tumoral en respuesta a estímulos del microambiente tumoral y que en los ensayos de interacción paracrina la comunicación entre células tumorales de mama y fibroblastos es limitada.

Por otra parte, diversos estudios han mostrado que los fibroblastos asociados a cáncer pueden estar implicados en la formación y diseminación de los clústeres de CTC. Por tanto, nos planteamos estudiar el posible papel de vCAF<sup>mCherry</sup> en la formación de CTC y clústeres a través de xenotrasplantes ortotópicos murinos con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>. La coinyección de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> con las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> provocó un efecto negativo sobre el desarrollo tumoral, observándose una tendencia a la ralentización del crecimiento del tumor respecto a los ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>. Esto coincide con el efecto negativo que ejercen los fibroblastos sobre la proliferación de las células tumorales observado en ensayos *in vitro*. De igual modo, el retardo en el crecimiento tumoral tuvo un impacto negativo en el desarrollo de las metástasis. Asimismo, estos efectos parecen determinados por la cantidad de vCAF<sup>mCherry</sup> xenotrasplantados, pues cuando se aumentó la proporción de fibroblasto: célula tumoral en los xenotrasplantes, se observó un efecto inhibitor del crecimiento más pronunciado en los xenotrasplantes heterotípicos. Asimismo, el análisis de sangre de estos ratones reveló un mayor número de CTC individuales que de clústeres, detectándose un menor número de CTC y clústeres en los ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, aunque estas diferencias no fueron significativas. También se pudieron observar fibroblastos circulantes, lo que demostró la capacidad de diseminación de estos vCAF<sup>mCherry</sup>, aunque estos fibroblastos en su gran mayoría no formaban parte de clústeres heterotípicos junto a MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>.

Es interesante que, mientras que en los ratones con xenotrasplantes homotípicos existe relación directa entre el número de CTC detectadas y el número de clústeres de CTC, la proporción de clústeres frente a CTC individuales detectada en la sangre de ratones con

xenotrasplantes heterotípicos es superior. Esto sugiere que la presencia de los vCAF<sup>mCherry</sup> en el tumor primario puede estar ejerciendo un efecto regulador sobre la formación de clústeres de CTC. En este sentido, ensayos de agregación *in vitro* mostraron que los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> favorecían la formación de agregados en las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>. Sin embargo, estos agregados eran tanto homotípicos como heterotípicos, lo que no concuerda con los análisis de la sangre de los ratones. En ensayos de formación de esferoides, sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que ambos tipos celulares pueden formar parte del mismo esferoide, pero su disposición en el mismo no potenciaría una invasión conjunta.

En contra a lo descrito en la literatura, nuestros resultados sugieren que los clústeres de CTC formados a partir de tumores heterotípicos no parecen tener un mayor potencial metastásico. Esto también contrastaría con los experimentos en pez cebra, donde la presencia de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> en clústeres de CTC heterotípicos favorece la supervivencia y proliferación de las CTC. Sin embargo, cabe señalar que el efecto positivo de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> en el modelo de pez cebra fue dependiente de las interacciones físicas entre ambos tipos celulares, algo que no es observado en el modelo de ratón, ya que casi no se detectaron clústeres de CTC heterotípicos.

En conjunto, el modelo de clústeres de CTC desarrollado en la presente tesis doctoral y su caracterización mediante ensayos funcionales y moleculares nos ha permitido entender la complejidad de las interacciones celulares entre las células tumorales y los fibroblastos asociados a cáncer (CAF). Si bien el principal papel atribuido a los CAF como población es el de promover la progresión tumoral y facilitar la metástasis, los presentes resultados muestran que estas células pueden ejercer varios efectos reguladores sobre la metástasis mediada por los clústeres de CTC heterotípicos, tanto negativos como positivos. Dichos efectos parecen ser dependientes de factores como el fenotipo tumoral, las interacciones establecidas con las células tumorales (paracrina o física) e incluso la presencia de subpoblaciones celulares dentro de los CAF con funciones diferentes. Por lo tanto, el modelo de clústeres de CTC desarrollado en este proyecto de tesis es útil para ahondar sobre la biología de estas agrupaciones celulares y para el estudio de su papel en la metástasis tumoral.



# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

### 1. CÁNCER DE MAMA

El cáncer es la principal causa de muerte en los países más desarrollados, con más de 18 millones de nuevos casos diagnosticados y alrededor de 10 millones de muertes relacionadas con la enfermedad en 2020<sup>1</sup>. En mujeres, el cáncer de mama es el tipo de tumor más común con 2 millones de nuevos casos diagnosticados a nivel mundial en 2018 y es la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres<sup>2</sup>.

Clínicamente, el cáncer de mama está dividido en tres subtipos moleculares en base al estudio de la expresión de biomarcadores por inmunohistoquímica: tumores que expresan el receptor *alpha* de estrógenos (ER<sup>+</sup>) y que suelen expresar el receptor de progesterona (PR<sup>+</sup>), denominados luminales; aquellos que sobreexpresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2<sup>+</sup>), y aquellos que no expresan ninguno de estos marcadores, llamados comúnmente basal o triple negativos<sup>3</sup>. Cada subtipo molecular correlaciona con un comportamiento único incluyendo diferencias en supervivencia, patrones de metástasis y respuesta al tratamiento. Además de esta heterogeneidad inter-tumoral, se ha observado que existe una heterogeneidad intra-tumoral en los tumores de mama. Así, en pacientes con cáncer de mama ER<sup>+</sup> no todas las células expresan el receptor y, clínicamente, con que el 1% de las células expresen niveles detectables de la proteína ER se considera que el tumor es ER<sup>+</sup>. Esto puede dar lugar a que algunos tumores con bajos niveles de expresión del receptor se comporten como ER<sup>-</sup> en respuesta a la terapia<sup>4</sup>.

### 2. METÁSTASIS

Alrededor del 5-10% de las pacientes de cáncer de mama muestran metástasis en el momento del diagnóstico de la enfermedad y, además, un 30% desarrolla la enfermedad metastásica durante el tratamiento<sup>5</sup>. La metástasis es un proceso mediante el cual el tumor se extiende desde su lugar de origen hasta órganos distantes y, a día de hoy, la enfermedad metastásica se mantiene como una enfermedad incurable, produciendo más del 90% de las muertes asociadas a cáncer<sup>6</sup>.

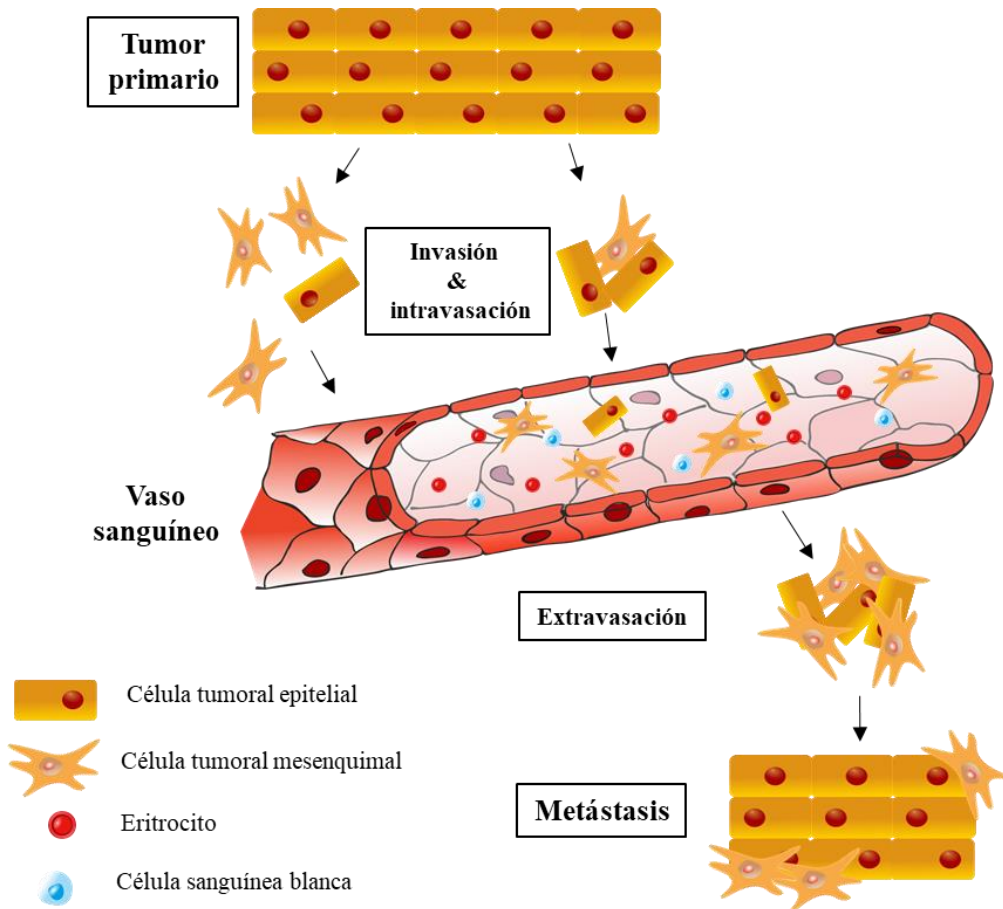


Figura 1. Esquema representativo de los diferentes pasos del proceso metastásico.

Actualmente, se sabe que las principales responsables de la metástasis son las células tumorales circulantes (CTC), células detectadas en la sangre periférica de los pacientes con cáncer procedentes de lesiones tumorales y que son capaces de entrar en el torrente sanguíneo<sup>7</sup>. Durante la metástasis, las células de los tumores epiteliales sufren cambios estructurales y funcionales que les permitirán metastatizar a tejidos y órganos lejanos. La transición epitelio-mesénquima (TEM), un proceso de reprogramación genética de las células tumorales epiteliales, es el principal mecanismo descrito mediante el cual las células tumorales se liberan de sus uniones con células vecinas, modifican las adhesiones con la matriz extracelular (MEC) y adquieren características mesenquimales que les confieren un fenotipo invasivo. Sin embargo, no es el único mecanismo conocido y es sabido que la TEM no es absolutamente necesaria para la salida de las células cancerígenas en el torrente sanguíneo, al menos no el proceso completo, describiéndose así la plasticidad epitelio-mesénquima (PEM)<sup>8</sup>.

Una vez las células tumorales adquieren capacidad invasiva, hay dos principales limitantes para el establecimiento de la metástasis: la intravasación, atravesando la barrera endotelial de los vasos sanguíneos, y la supervivencia en circulación como CTC. Una vez en la circulación, las células tumorales son sometidas a una serie de factores de estrés que limitan su supervivencia, tales como las fuerzas hemodinámicas, la incidencia de anoikis debida a la pérdida de las señales de adhesión célula-célula y célula-MEC, y el ataque de células inmunes<sup>9,10</sup>.

Durante su tránsito a través del sistema circulatorio, las células tumorales están sujetas a estrés fluídico y fuerzas de cizalla, además de colisiones contra las células sanguíneas y las

células endoteliales que forman las propias paredes de los vasos sanguíneos. Por otra parte, la mayoría de células tumorales son más grandes que los microcapilares por los que pueden circular, por lo que rápidamente son atrapadas en ellos. Todos estos factores deterioran la integridad de las CTC y afectan a su supervivencia y permanencia en circulación, por lo que solo aquellas que puedan superarlos podrán continuar con el proceso metastásico<sup>11</sup>.

Además, las células tumorales que entran en circulación sufren la pérdida del anclaje dependiente de integrina a la MEC, que es indispensable para la supervivencia de las células epiteliales. Cuando las integrinas se unen a la MEC y forman adhesiones focales (unión de la célula a la membrana basal), reclutan moléculas señalizadoras que inducen rutas de supervivencia. La pérdida de este anclaje produce que la actividad de dichas rutas de supervivencia sea reducida, promoviendo la anoikis, una forma de muerte celular causada por apoptosis y otros mecanismos, como la deficiencia de ATP<sup>10</sup>.

Finalmente, las células tumorales en circulación están expuestas a un gran número de células inmunes periféricas con funciones de inmunovigilancia. Por ejemplo, las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) tienen una actividad anti-tumoral esencial, como se ha observado en modelos animales con falta de función de células NK<sup>12</sup>. Estas células NK utilizan una serie de receptores activadores e inhibidores para detectar las CTC y eliminarlas mediante la secreción de enzimas, como la granzima B y la perforina.

Tras sobrevivir en circulación, las CTC se enfrentan a otro paso limitante, la baja ratio de extravasación y la adaptación y proliferación en el nuevo tejido<sup>13</sup>. Las células tumorales no crecen y generan un tumor de forma aislada una vez alcanzan un nuevo tejido, sino que reclutan a las células estromales residentes para crear un microambiente tumoral que contribuirá al establecimiento del tumor. Las células estromales implicadas engloban, en términos generales, células inmunes infiltrantes, células angiogénicas vasculares y fibroblastos asociados al cáncer. Estas células favorecen el establecimiento y crecimiento del tumor a través de una serie de factores, como señales de proliferación y evasión de supresores de crecimiento, protección contra apoptosis y sistema inmune, inducción de angiogénesis y reprogramación de metabolismo energético<sup>14</sup>.

Por tanto, a pesar de la gran cantidad de células tumorales que llegan a la sangre, la metástasis es un proceso altamente ineficiente<sup>15</sup>. Solo aquellas células con la capacidad de sobrevivir en el torrente sanguíneo, extravasar y adaptarse al nuevo tejido y microambiente, causarán una metástasis eficaz.

### 3. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES (CTC)

La presencia de las CTC en la sangre fue detectada por primera vez en el año 1841 por Langenbeck<sup>16</sup>. Más tarde, en 1869, Thomas Ashword observó que la morfología de algunas células observadas en la sangre de un paciente de cáncer metastásico era similar a la de aquellas células presentes en diferentes lesiones tumorales de dicho paciente. Este concluyó que, si estas células procedían de una estructura cancerígena original, tenían que entrar en el sistema circulatorio para producir las diferentes lesiones tumorales observadas en el paciente metastásico<sup>17</sup>. Pese al temprano conocimiento que se tuvo de la existencia de las CTC, ha habido serias dificultades para su detección debido a dos importantes factores, su bajo número, el cual se estima en 1-10 CTC por mL de sangre<sup>18</sup> y la falta de tecnología adecuada para su captura e identificación.

Las CTC pueden ser detectadas en pacientes mediante biopsia líquida, una técnica analítica que se realiza sobre fluidos biológicos, principalmente sangre, y que permite el diagnóstico y seguimiento del cáncer. A partir de la muestra extraída, el aislamiento de CTC se basa principalmente en tecnologías de enriquecimiento, las cuales se dividen en

dos grupos. Por un lado, aquellos métodos basados en el aprovechamiento de las propiedades biológicas de las CTC, principalmente mediante el reconocimiento de marcadores de superficie epiteliales. Por otro lado, los métodos que utilizan las propiedades físicas de las CTC, como la densidad y el tamaño, para separarlas del resto de células del torrente sanguíneo<sup>19</sup>. Un ejemplo del primer grupo sería el sistema CellSearch® (Menarini Silicon Biosystems, Bologna, Italia), basado en la captura inmunomagnética de células que expresan la molécula de adhesión celular (EpCAM) y que está aprobado para su uso diagnóstico en cáncer de mama, próstata y colorrectal metastásicos por la Food and Drug Administration (FDA). Mediante este sistema, se ha establecido un valor pronóstico en el número de CTC detectadas en sangre de pacientes metastásicos de cáncer de mama, estando la detección de 5 o más CTC en 7,5 mL de sangre asociada a una menor supervivencia global de los pacientes y una menor supervivencia libre de progresión<sup>20</sup>.

Sin embargo, la plasticidad en la expresión de fenotipos mesenquimales y epiteliales observados en CTC puede comprometer la eficiencia de los métodos basados en el reconocimiento de marcadores de superficie epiteliales. Un análisis fenotípico de CTC de pacientes de cáncer de mama ER+/ HER2- señala la coexistencia de poblaciones de CTC HER2+ y HER2- que muestran una comunicación dinámica<sup>21</sup>. Aunque en este estudio se vio que el potencial tumorigénico era similar en ambas poblaciones, las CTC HER2+ resultaron ser más proliferativas mientras que las CTC HER2- demostraron ser más resistentes al estrés oxidativo y la quimioterapia. Posteriormente, estos datos fueron corroborados en un estudio con 290 pacientes de cáncer de mama metastásico que reafirmó la heterogeneidad intra-tumoral en la expresión de HER2<sup>22</sup>. Además, recientemente se ha empezado a estudiar la heterogeneidad de las CTC mediante análisis de metilación de DNA, los cuales muestran que las CTC son heterogéneas a nivel epigenético<sup>23</sup>. Estos resultados confirman la necesidad de separar las subpoblaciones de CTC al nivel de célula individual para conocer en mayor profundidad los mecanismos que permiten la metástasis.

Actualmente, numerosos estudios han demostrado el valor de la detección de CTC en la sangre de pacientes de cáncer de mama, próstata, colorrectal o pancreático<sup>24</sup>, señalando la importancia del estudio de las CTC. Estas CTC no solo reflejan el potencial metastásico del tumor, sino que pueden ofrecer un valor pronóstico de la enfermedad a través de una prueba diagnóstica mínimamente invasiva como es la biopsia líquida.

#### **4. CLÚSTERES DE CTC**

Las CTC se pueden encontrar en la sangre de pacientes como células individuales o como pequeños grupos de células llamados clústeres de CTC. Por definición, un clúster de CTC es un grupo de dos o más células tumorales detectadas en la sangre de pacientes, aunque el tamaño de dichos grupos puede variar entre dos y más de cien células<sup>25</sup>.

##### **4.1. Origen de los clústeres de CTC**

El origen de los clústeres de CTC ha sido objeto de debate en los últimos años, y los estudios parecen indicar que su formación se debe tanto a una migración colectiva de células procedentes del tumor primario como a una agregación intravascular de células individuales. En cáncer de mama, dos estudios han demostrado, mediante modelos murinos, que la formación de los clústeres de CTC se debe a una migración colectiva de células del tumor primario<sup>26,27</sup>. En estos ensayos, se inyectaron células tumorales de mama marcadas fluorescentemente con distinto color en el tejido graso mamario de flancos opuestos del ratón y observaron que los clústeres de CTC encontrados en la sangre estaban formados por células de un solo color,

descartando la hipótesis de una agregación intravascular. Del mismo modo, un estudio en cáncer pancreático apoya estos resultados<sup>28</sup>.

Sin embargo, un trabajo reciente con modelos murinos de xenotrasplantes derivados de pacientes (PDX, del inglés *Patient Derived Xenograft*) de cáncer de mama metastásico demostró la existencia de clústeres de CTC en circulación procedentes de una agregación de células individuales. Usando microscopía de imagen multifotónica, Liu et al. observaron que las células que expresan el marcador “stem” CD44 son capaces de agruparse en clústeres en la circulación periférica o en la vasculatura del pulmón<sup>29</sup>. Esta evidencia está apoyada por un estudio anterior en el que se pudo observar la formación de agregados multicelulares en aquellos lugares de la pared endotelial donde las CTC quedaban atrapadas antes de la formación de la metástasis<sup>30</sup>.

Por último, se ha propuesto un tercer modelo, presión o confinamiento celular (del inglés *cell jamming*), el cual define cómo la creciente masa tumoral o un incremento en la densidad de la MEC provoca una mayor formación de agrupaciones celulares. Mediante ensayos *in vitro*, se ha podido observar que las células tumorales mesenquimales priorizan una migración colectiva cuando la densidad de la MEC es alta, mientras que la invasión individual se observaba cuando la densidad de la MEC es baja<sup>31</sup>.

#### 4.2. Valor pronóstico de los clústeres de CTC

De acuerdo a modelos animales de cáncer, la proporción de clústeres de CTC en sangre aumenta con la progresión de la enfermedad<sup>32</sup>. No obstante, la aparición de clústeres en la sangre es bastante infrecuente, estimándose que solo el 2-5% de CTC son clústeres<sup>25</sup>. Debido a este bajo porcentaje y a la ya poca frecuencia de CTC en sangre, unido a la falta de una tecnología capaz de aislar los clústeres celulares sin romperlos<sup>33</sup>, no ha sido hasta la última década que se ha empezado a estudiar la contribución de los clústeres al proceso metastásico y la implicación clínica de estas poco frecuentes agrupaciones celulares. Además, hasta ahora la importancia de los clústeres de CTC se ha visto eclipsada por la visión clásica predominante de la metástasis descrita por el modelo de evolución clonal de Peter Nowell<sup>34</sup>, en el cual se describe la metástasis como un proceso causado exclusivamente por la proliferación de CTC individuales diseminadas a órganos distantes.

A pesar de que el valor pronóstico de la enumeración de CTC mediante el sistema CellSearch<sup>®</sup> ha sido demostrado en cáncer de mama metastásico<sup>20</sup>, hubo que esperar una década más para exponer el valor pronóstico de los clústeres de CTC. La mayoría de estudios sobre el valor pronóstico de los clústeres de CTC se han realizado en cáncer de mama, aunque hay otros que relacionan su detección con un peor pronóstico en otros tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón de células pequeñas, adenocarcinoma ductal pancreático, carcinoma hepatocelular y melanoma<sup>35-38</sup>.

Mediante un estudio prospectivo de fase II, se evaluaron muestras de 32 pacientes de cáncer de mama metastásico antes del inicio de tratamiento y después del inicio de terapia, demostrando que la presencia de clústeres de CTC detectados por CellSearch<sup>®</sup> tras el tratamiento se asociaba a una menor supervivencia del paciente<sup>39</sup>. En años recientes, otros estudios han reafirmado el valor pronóstico de los clústeres de CTC utilizando el sistema CellSearch<sup>®</sup>. Un estudio prospectivo de 115 pacientes de cáncer de mama avanzado (estadio III y IV), de todos los subtipos, mostró que la evaluación de los clústeres de CTC permitía la estratificación en diferentes grupos de supervivencia de los pacientes con elevada cantidad de CTC antes del inicio de tratamiento. Además, el valor pronóstico de los clústeres de CTC resultó ser más pronunciado en pacientes con cáncer de mama inflamatorio<sup>40</sup>. De igual modo, un estudio en una cohorte de 156 pacientes de cáncer de

mama metastásico mostró que la evaluación de los clústeres de CTC mejoraba el seguimiento de los pacientes, sin mostrar asociación con el subtipo tumoral o el número de CTC<sup>41</sup>. Un trabajo posterior en una cohorte de 52 pacientes de cáncer de mama metastásico con tratamiento de primera línea, de nuevo con representación de todos los subtipos, demostró que la presencia de clústeres de CTC en la sangre periférica se asociaba a una menor supervivencia global y libre de progresión. Este efecto era, de nuevo, independiente del número de CTC o del subtipo tumoral<sup>42</sup>. No obstante, el valor pronóstico de los clústeres de CTC a inicio de tratamiento aún no está claro, pues se han encontrado evidencias de su asociación a un mejor o peor pronóstico<sup>39-44</sup>.

Al margen del uso del sistema CellSearch<sup>®</sup>, otro estudio estableció una relación entre la presencia de clústeres de CTC en pacientes con cáncer de mama metastásico y su pronóstico mediante otro sistema de separación: el <sup>HB</sup>CTC-Chip. Esto demostró el valor pronóstico de los clústeres de CTC en cáncer de mama independientemente de la tecnología utilizada para su aislamiento<sup>26</sup>.

Por otro lado, se ha podido establecer una relación entre el tamaño de los clústeres de CTC y el pronóstico de los pacientes<sup>44,45</sup>. Wang et al. demostraron, a partir de datos recogidos de 128 pacientes de cáncer de mama metastásicos a inicio de tratamiento y antes de empezar una nueva terapia, que aquellos pacientes con clústeres formados por tres células mostraban una caída pronunciada de la supervivencia global respecto a los pacientes con clústeres de dos células. Resultados similares fueron encontrados por Costa et al. en una cohorte de 54 pacientes de cáncer de mama metastásicos, mostrando que el tamaño de los clústeres correlacionaba con la supervivencia global<sup>44</sup>. Además del tamaño de los clústeres como factor pronóstico, la evaluación de la expresión del marcador “stem” CD44 en los clústeres de CTC mostró que aquellos pacientes con clústeres de CTC CD44<sup>-</sup> tenían una mayor supervivencia que los pacientes con clústeres de CTC CD44<sup>+</sup><sup>29</sup>. Otros estudios indican que los clústeres de CTC son encontrados con mayor frecuencia en pacientes triple negativo o HER2<sup>+</sup><sup>42,39</sup>.

En definitiva, estos estudios demuestran que los clústeres de CTC son marcadores de pronóstico independientes, ya que su presencia añade un valor significativo a la enumeración de las CTC en los pacientes.

### 4.3. Potencial metastásico de los clústeres de CTC

Numerosas evidencias indican que los clústeres de CTC poseen un mayor potencial metastásico que las CTC individuales. En 1954, Watanabe demostró que la inyección de grupos de células viables de carcinoma inyectadas por vía intravenosa en ratones era capaz de formar metástasis pulmonares de forma mucho más eficiente que suspensiones de células individuales<sup>46</sup>. Además, demostró que el número de células totales inyectadas no era aparentemente importante y sugirió que los grupos de células podrían tener una ventaja para la supervivencia si se comparaban con las células individuales. Estudios recientes, principalmente desarrollados en cáncer de mama, han demostrado una mayor predisposición de los clústeres de CTC a formar metástasis que las CTC individuales. Usando un modelo de xenotrasplante en ratón con la línea MDA-MB-231-LM2, Aceto et al. estimaron que los clústeres de CTC tienen un potencial metastásico 23-50 veces mayor que las CTC individuales<sup>26</sup>. Asimismo, los estudios de Cheung et al. demostraron que el potencial metastásico de los clústeres es 100 veces mayor que el de las CTC individuales<sup>27</sup>, mientras que Liu et al. desarrollaron un modelo de ratón de cáncer de mama a partir del xenotrasplante de células procedentes de un paciente triple negativo con el que demostraron que los clústeres tienen una mayor eficiencia en la formación de metástasis que las CTC individuales<sup>29</sup>.

Pese a las evidencias mostradas respecto a la mayor capacidad para formar metástasis de los clústeres de CTC respecto a las CTC individuales, todavía no está claro si las células tumorales dentro del clúster poseen diferentes potenciales metastásicos. Por un lado, se ha demostrado que la inyección de agregados formados por células de melanoma de distinta capacidad metastásica no cambia la incapacidad de las células no metastásicas de proliferar en órganos distales<sup>47</sup>. Por otro lado, estudios posteriores en melanoma muestran que las células tumorales con bajo potencial metastásico pueden adquirir una mayor capacidad metastásica cuando se agrupan con células con un mayor potencial metastásico<sup>48</sup>.

Actualmente, se ha demostrado la existencia de poblaciones heterogéneas de CTC dentro del clúster, con distinta contribución al proceso metastásico en cáncer de próstata, pulmón y mama<sup>49-51</sup>. De hecho, se han encontrado marcadores mesenquimales, como fibronectina o N-cadherina, en las células constituyentes de clústeres aislados de pacientes de cáncer de mama, así como marcadores epiteliales, como EpCAM o citoqueratinas<sup>52</sup>. Esta coexistencia dentro del clúster de células con diferente perfil genético parece ser la responsable de un fenotipo híbrido epitelial/mesenquimal que permite a estos grupos celulares la diseminación por el torrente sanguíneo mientras mantienen la expresión de moléculas de adhesión célula-célula<sup>26,27</sup>.

La existencia de uniones célula-célula en los clústeres parece ayudarles a escapar de la anoikis, una de las principales causas de muerte de las CTC en sangre<sup>53</sup>. De hecho, la interacción entre las proteínas circulantes galectina-3 y mucina-1 asociada a cáncer (MUC1), así como con rutas de señalización mediadas por CD44, favorecen la agregación de células tumorales y la formación de clústeres, evitando la muerte de las CTC por anoikis en cáncer de mama y colon<sup>29,54</sup>. Por otro lado, la protección de los clústeres contra la apoptosis fue demostrada en pacientes de cáncer de pulmón de células pequeñas<sup>35</sup>. Mientras que un 57% de los pacientes mostraron CTC individuales apoptóticas, ninguno de los pacientes en los que se detectó clústeres de CTC tenían células apoptóticas dentro de dichos clústeres. Del mismo modo, en un estudio de pacientes de cáncer de mama triple negativo se vio que solo el 0,4% de las células que formaban clústeres de CTC eran apoptóticas, mientras que el 20% de las células individuales mostraban apoptosis<sup>39</sup>. Asimismo, se ha demostrado cómo la agregación celular protege a las células en el clúster de los radicales libres de oxígeno (ROS) que se producen en respuesta a la separación de las células de la MEC, induciendo una mitofagia de los ROS a través de la activación del factor 1- $\alpha$  inducible por hipoxia (Hif1 $\alpha$ )<sup>55</sup>.

El análisis de la expresión génica de las CTC y los clústeres de CTC también ha mostrado diferencias entre ellos. Así, en los clústeres de CTC se ha observado una disminución de la expresión de genes asociados a apoptosis, respuesta inmune, presentación de antígeno a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase 2 y activación de células T<sup>27</sup>, así como el aumento de expresión de genes asociados a proliferación y *stemness*<sup>56</sup>. Además, se detectó una mayor expresión proteica de CD44 en los clústeres comparados con las CTC individuales, el cual es un marcador “stem” en cáncer de mama implicado en el agrupamiento de CTC y el establecimiento de metástasis<sup>29</sup>. Hay que destacar que los sitios de unión para factores de transcripción relacionados con *stemness* implicados en la regulación de proliferación y pluripotencia, como OCT4 y SOX2, están hipometilados en los clústeres de CTC<sup>57</sup>.

Análisis transcriptómicos han demostrado cómo los clústeres de CTC mantienen características epiteliales que pueden tener un papel importante en la formación y el mantenimiento del clúster en la circulación. La plakoglobina, proteína implicada en las uniones de desmosoma y hemidesmosoma, se encuentra sobreexpresada en los clústeres de

CTC, según los datos obtenidos de la secuenciación masiva de ácido ribonucleico (ARN) de las CTC y clústeres de pacientes de cáncer de mama<sup>31</sup>. Del mismo modo, se ha observado una mayor expresión de keratina 14, proteína también implicada en uniones celulares, en los clústeres de CTC mediante técnicas de inmunofluorescencia en modelos murinos<sup>37</sup>. La claudina-11, marcador de TEM, también contribuye a la formación de clústeres de CTC y su expresión está asociada con peor supervivencia en pacientes de carcinoma escamoso de cabeza y cuello<sup>58</sup>. Por otro lado, Padmanaban et al. demostraron que proteínas como la E-cadherina tienen un papel más allá de mantener las uniones celulares de los clústeres, mejorando la supervivencia y la capacidad metastásica de los clústeres de CTC<sup>59</sup>. Finalmente, los clústeres de CTC pueden dar lugar a la formación de metástasis policlonales<sup>26,28</sup>, sugiriendo la existencia de un mecanismo de cooperación entre clones de células tumorales dentro del clúster que pueden tener importantes implicaciones en la evolución de la metástasis<sup>60,61</sup>.

## 5. CONTRIBUCIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL A LA METÁSTASIS

Las CTC que sobreviven en el torrente sanguíneo y consiguen extravasar hacia un nuevo tejido no empiezan a formar un tumor de forma aislada, sino que atraen a células del estroma para formar un microambiente que favorezca el crecimiento tumoral. Estas interacciones con las células del estroma, determinantes en la formación de las metástasis, son también clave tanto en el tumor primario como en la propia circulación, favoreciendo la progresión de la enfermedad<sup>14</sup>. Podemos dividir las células del estroma que suelen ser reclutadas por las células tumorales en tres grupos principales: células inmunes infiltrantes, células angiogénicas vasculares (pericitos y células endoteliales) y fibroblastos asociados a cáncer (sobre los cuales se profundizará en el apartado 6)<sup>14</sup>.

Las células inmunes infiltrantes engloban una amplia variedad de subtipos tales como células B, células T reguladoras, células T CD8<sup>+</sup>, células NK, macrófagos, monocitos inflamatorios, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. Cada subtipo celular influye de distinta manera sobre las células tumorales, afectando a propiedades como la proliferación, la evasión de la muerte celular o la alteración del metabolismo energético<sup>14</sup>. Un ejemplo son los macrófagos asociados a tumor (MAT), los cuales pueden bloquear la proliferación e infiltración de las células T CD8<sup>+</sup> mediante la secreción de factores con potencial inmunosupresivo e incluso reclutar células T reguladoras vía quimioquina CCL22 que potencien la supresión de la respuesta inmune contra las células tumorales<sup>62,63</sup>. Además, proporcionan al microambiente tumoral una amplia variedad de proteasas que promueven la invasión del tejido mediante la remodelación de los componentes del microambiente<sup>64</sup>.

Las células endoteliales y los pericitos son claves en la progresión tumoral, ya que participan directamente en el proceso de angiogénesis por el cual se generan nuevos vasos sanguíneos en el tumor. El establecimiento de un sistema vascular en el tumor es absolutamente necesario para evitar la muerte celular debido a la falta de nutrientes y a la hipoxia del tumor, por lo que una angiogénesis deficiente o la destrucción de la vasculatura tumoral pueden causar una muerte masiva de las células tumorales debido a la falta de nutrientes e hipoxia<sup>65,66</sup>. Por otro lado, los tumores expresan altos niveles del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), el cual, mediante señalización vía su receptor VEGFR2, debilita las uniones que conectan las células endoteliales de los vasos sanguíneos, haciendo a la vasculatura permeable para infiltraciones de sangre y, por tanto, eliminando barreras para la intravasación de las células tumorales<sup>67</sup>. Sin embargo, en modelos experimentales animales de cáncer de mama se ha observado que el silenciamiento de VEGF reduce el crecimiento del tumor primario, pero aumenta la hipoxia intratumoral, lo que lleva a una mayor producción de clústeres de CTC y formación de metástasis<sup>68</sup>.

### 5.1. Interacción microambiente-CTC

Algunas células componentes del microambiente se han detectado también como parte de clústeres de CTC en la sangre de pacientes y modelos murinos, formando los denominados clústeres heterotípicos<sup>69-71</sup>. Se ha sugerido que la presencia de células inmunes o fibroblastos asociados a cáncer (CAF, del inglés Cancer-Associated Fibroblasts) junto a las CTC puede beneficiar la supervivencia y el crecimiento metastásico de estos clústeres heterotípicos<sup>72</sup>.

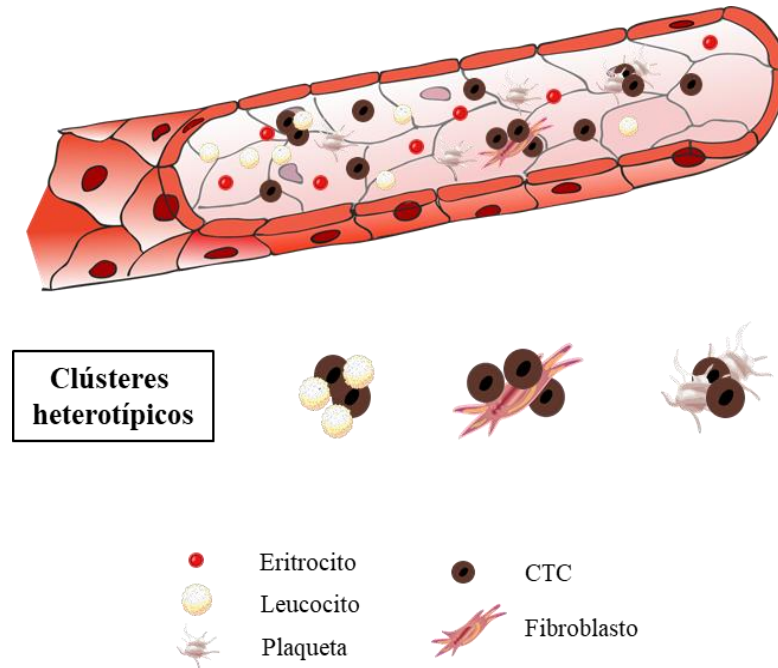


Figura 2. Algunos tipos de clústeres heterotípicos encontrados en la sangre.

Existen varios mecanismos descritos que pueden proteger a las células tumorales contra la muerte celular inducida por estrés mecánico en la circulación. Uno de los más comunes es la formación de microagregados con plaquetas, dando como resultado un escudo físico para las CTC<sup>73</sup>. De hecho, la inhibición de los mecanismos de interacción de CTC con plaquetas resultó en una reducción de la metástasis pulmonar en modelos murinos<sup>74</sup>. Asimismo, el recubrimiento de las CTC con plaquetas se ha mostrado como un medio de protección contra las células NK, aumentando también la metástasis en modelos murinos<sup>75</sup>. Además, se ha visto que estas plaquetas no solo protegen físicamente a las CTC de las células NK, sino que suprimen su actividad mediante la liberación de TGF- $\beta$ <sup>76</sup>, el cual también se ha descrito como un mecanismo inductor de TEM<sup>70</sup>. Las plaquetas también pueden transferir moléculas normales MHC de clase I a la superficie de las células tumorales, permitiéndoles escapar a la inmunidad mediada por células T<sup>77</sup>.

La agregación de plaquetas y células mieloides alrededor de las CTC no solo modifica la supervivencia intravascular de dichas CTC, sino que aumenta la extravasación tumoral en modelos murinos de cáncer de mama y melanoma<sup>78</sup>. Asimismo, las plaquetas aumentan la extravasación tumoral mediante la inducción de un fenotipo invasivo en las células tumorales, el cual parece implicar la liberación de TGF- $\beta$  por parte de las plaquetas<sup>70</sup>. Otro estudio realizado en pacientes de melanoma y cáncer de mama mostró que las células supresoras mieloides (MDSCs), que están relacionadas con neutrófilos y monocitos,

promueven la diseminación y potencial metastásico de las CTC a través de la activación de la vía Notch/Nodal en respuesta a ROS, estableciendo una interacción paracrina entre ambos tipos celulares<sup>79</sup>.

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la sangre y parecen estar implicados en la diseminación de los clústeres homotípicos y heterotípicos, ya que su eliminación mediante el uso de anticuerpos neutralizantes en modelos animales de cáncer de mama mostró una reducción en la infiltración de neutrófilos en el tumor primario y un retraso en la aparición de clústeres de CTC y clústeres de CTC – neutrófilos en la sangre, unido a un retardo en el proceso metastásico<sup>69</sup>. En ese mismo estudio, se vio que aquellos pacientes de cáncer de mama en los que se detecta un único clúster heterogéneo con neutrófilos muestran una peor supervivencia libre de progresión que pacientes con más de 5 CTC en 7,5 mL de sangre periférica<sup>69</sup>. Asimismo, la interacción directa de los neutrófilos con CTC de cáncer de mama modifica el perfil transcripcional de las células tumorales, provocando la progresión del ciclo celular en circulación y acelerando la formación de metástasis en órganos distales<sup>69</sup>.

Además, los neutrófilos promueven el atrapamiento de las CTC en los sitios de metástasis<sup>80</sup>. Tras su activación por las células tumorales, los neutrófilos liberan su contenido y forman trampas extracelulares, compuestas por la expulsión de su ácido desoxirribonucleico (ADN) asociado a enzimas proteolíticas<sup>81</sup>. Se ha descrito que estas trampas pueden aumentar la metástasis mediante el secuestro de las CTC a través de la integrina  $\beta$ -1<sup>82</sup>, lo cual facilita la adhesión al endotelio antes o durante la extravasación<sup>83</sup>, y que las metaloproteasas secretadas por los neutrófilos presentes en estas trampas pueden degradar la MEC<sup>84</sup>. Por otro lado, se ha observado que los neutrófilos son capaces de inhibir las células T CD8<sup>+</sup> y células NK en modelos murinos de cáncer de mama metastásico<sup>85</sup>, así como ayudar a las CTC a extravasar en capilares estrechos estableciendo interacciones mediadas por la proteína de adhesión de células vasculares VCAM1 entre las células<sup>86</sup>.

Se han realizado varios estudios referentes a la función de los monocitos y macrófagos en la metástasis de células de cáncer de mama. Una vez reclutados en el sitio metastásico, los monocitos se diferencian en macrófagos asociados a metástasis (MAM) que median la extravasación de las células tumorales a través de la liberación VEGF para incrementar la permeabilidad vascular<sup>87,88</sup>. En otro estudio con células tumorales de mama, se ha descrito que, tras el arresto de las CTC en el pulmón, estas inducen la expresión de receptores de adhesión endotelial que reclutan macrófagos, los cuales parecen tener la habilidad de expresar integrina 4 $\alpha$  que los une a las células tumorales y les transmite señales de supervivencia vía VCAM-1<sup>89</sup>.

## 6. FIBROBLASTOS ASOCIADOS A CÁNCER (CAF)

Los CAF son el componente celular más numeroso del microambiente tumoral y cuya presencia se ha correlacionado con un peor pronóstico en tumores sólidos<sup>90</sup>. Estas células son diferentes de los fibroblastos normales, pues permanecen en un estado activado permanente, una característica que parece estar provocada por cambios epigenéticos inducidos por factores estromales<sup>91,92</sup>.

### 6.1. Origen de los CAF

Los CAF son un grupo heterogéneo de células, cuyo origen puede ser muy diverso. La mayoría de los CAF proceden de fibroblastos sanos de tejido conectivo que pueden ser activados debido a su proximidad al tumor o de progenitores mesenquimales que pueden ser reclutados e inducidos a diferenciación en miofibroblastos<sup>93</sup>. Otros orígenes descritos son la transdiferenciación en CAF de células epiteliales o endoteliales y, en menor proporción, adipocitos, pericitos y células de músculo liso<sup>94-96</sup>. Todos estos posibles precursores

contribuyen a la gran heterogeneidad observada en las diferentes sub-poblaciones de CAF, tanto a nivel funcional como de expresión génica. Además, estudios recientes apoyan la existencia de sub-poblaciones de CAF reversibles, cuya plasticidad les permite cambiar de un estado funcional a otro en respuesta a factores genéticos y no genéticos<sup>97</sup>.

La heterogeneidad de los CAF se ve plasmada por la variedad de marcadores biológicos característicos, los cuales están asociados a la función de los propios CAF. Los más comúnmente utilizados son la actina *alpha* de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), la proteína de activación de fibroblasto (FAP), la proteína específica de fibroblasto 1 (FSP1, también llamada S100A4) y los receptores de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$ )<sup>98</sup>. Sin embargo, la expresión de estos marcadores no está restringida a los CAF. Por ejemplo, en estudios en cáncer de mama, se muestra que tanto los fibroblastos como los pericitos estromales expresan las proteínas FAP y  $\alpha$ -SMA, teniendo ambas poblaciones funciones muy diferentes<sup>99</sup>. Por otro lado, en base al análisis combinado de cinco marcadores, se ha identificado la existencia de cuatro sub-poblaciones de CAF diferentes en los nodos linfáticos en pacientes de cáncer de mama metastásico, cuyas sub-poblaciones más abundantes correlacionan con invasión celular y promueven la metástasis<sup>100</sup>.

## 6.2. Contribución de los CAF al establecimiento y progresión tumoral.

Los CAF poseen importantes funciones en la reestructuración de la MEC mediante el depósito de componentes de la matriz, como colágeno, ácido hialurónico, fibronectinas y lamininas, y la síntesis de elevados niveles de proteasas degradadoras de matriz<sup>98</sup>. En tumores primarios de pulmón, se observó que las proteínas derivadas de CAF, como PLOD2 y LOXL2, alteran el estado del colágeno y afectan a la rigidez de la MEC, lo cual es un factor primordial para la proliferación, supervivencia e invasión de las células cancerígenas<sup>101</sup>. Por otro lado, el aumento de la expresión de N-cadherina debido al aumento de la rigidez de la MEC facilita la unión de las células tumorales al endotelio y la intravasación en el sistema circulatorio<sup>102</sup>. Además, CAF de diferentes microambientes pueden contribuir a la angiogénesis a través de distintas proteínas proangiogénicas, como VEGF, GFG2, IL-8 y PDGF-C. Estos factores proangiogénicos quedan atrapados en la MEC mediante proteínas generadas por fibroblastos sanos. Al activarse, estos fibroblastos producen enzimas degradadoras de la MEC que liberan esos factores proangiogénicos, haciéndolos accesibles a las células endoteliales<sup>103,104</sup>.

Respecto a la supervivencia tumoral, un gran número de estudios implican a los CAF en la limitación de la apoptosis, mediante la secreción de factores de supervivencia como IGF-1 e IGF-2 o la síntesis de proteasas remodeladoras de la MEC que provocan que esta produzca señales de supervivencia<sup>103,104</sup>. Asimismo, los CAF pueden producir quimioquinas que reclutan células inmunes infiltrantes y ellos mismos pueden inhibir las células NK y T mediante la producción de TGF- $\beta$ <sup>105</sup>, así como producir moléculas quimioatrayentes para macrófagos y neutrófilos proangiogénicos<sup>106</sup>.

La eliminación de los CAF en ratones modelo de adenocarcinoma de páncreas mejora el efecto de los fármacos citotóxicos, revelando que el estroma formado por los CAF representa una barrera eficaz contra la quimioterapia<sup>107</sup> y, de igual modo, la inhibición de TGF- $\beta$  o su receptor tipo I, así como de los receptores de PDGF, reducen la presión intersticial de ciertos tumores, resultando en una mejor hemodinámica tumoral y favoreciendo la biodistribución de los fármacos<sup>108</sup>.

Por último, se ha descrito una relación simbiótica en cuanto al metabolismo energético entre los CAF y las células tumorales, en la que los CAF de diferentes microambientes

pueden intercambiar recursos energéticos con las células tumorales para optimizar el crecimiento del tumor, incluyendo el uso alternativo de glucosa y lactato. En algunos casos, los CAF activan una glicolisis aeróbica, utilizando la glucosa y secretando lactato que es utilizado por las células tumorales para su proliferación<sup>109</sup>. En otros casos, la simbiosis es al contrario y las células tumorales activan la glicolisis aeróbica, utilizando la glucosa y exportando lactato que será utilizado por los CAF para mantener sus funciones<sup>110</sup>.

De igual modo que neutrófilos, monocitos y plaquetas, los CAF pueden viajar unidos a las CTC y diseminarse hacia sitios secundarios<sup>71</sup>. En modelos murinos de metástasis pulmonar, se ha descrito que la presencia de CAF en clústeres heterotípicos permite una mayor supervivencia de las células tumorales e incluso proporciona una ventaja tras su llegada a sitios secundarios. De hecho, se observó cómo la eliminación de los CAF de los clústeres resultaba en una reducción de su capacidad de formar metástasis pulmonares<sup>111</sup>. Los clústeres heterotípicos de CTC procedentes de la sangre de estos ratones mostraron una menor incidencia en células apoptóticas y un aumento significativo de células viables comparado con CTC individuales o clústeres homotípicos formados por dos o tres células cancerígenas. De igual modo, la eliminación del gen S100A4 en ratones evitó la migración de los fibroblastos y provocó que los tumores desarrollados en este modelo nunca metastatizaran<sup>112</sup>. Sin embargo, al suministrar fibroblastos que expresaban esta proteína, estos tumores volvían a adquirir capacidades metastásicas.

Los CAF parece que pueden ayudar a las células tumorales a sobrevivir en circulación confiriéndoles resistencia a las fuerzas de cizalla<sup>113</sup>, la principal causa de muerte celular en la circulación. Los CAF pueden aumentar el potencial metastásico de las células tumorales mediante la inducción de TEM, a través de la secreción paracrina TGF- $\beta$ , el cual promueve la invasión de las células tumorales<sup>114,115</sup>. La TEM inducida por CAF también se pudo observar en diseños experimentales usando medios condicionados o co-cultivos<sup>116,117</sup>. Además, el TGF- $\beta$ , junto a algunas quimioquinas y citoquinas como IL-6 y CXCL9, promueve la progresión tumoral mediante la supresión de la respuesta inmune dando lugar al mal funcionamiento de las células T y a la evasión inmune por parte de las células tumorales<sup>118,119</sup>.

Además de los mecanismos descritos, los CAF pueden liberar exosomas: vesículas extracelulares que sirven de medios de transporte para proteínas y ácidos nucleicos hacia las células tumorales y del estroma, los cuales pueden promover la migración de las células tumorales y su agresividad<sup>120,121</sup>. Por esto, los exosomas derivados de fibroblastos se consideran mediadores positivos de la progresión tumoral y la reestructuración del estroma, así como mediadores de quimiorresistencia<sup>122,123</sup>. Asimismo, existe una comunicación cruzada entre fibroblastos y células tumorales, de modo que los exosomas derivados de las células cancerosas pueden provocar la transformación de los propios fibroblastos<sup>124</sup>. Esto está demostrado en exosomas secretados por células altamente metastásicas de carcinoma hepatocelular, las cuales son capaces de inducir la activación de los CAF en los pulmones, facilitando la metástasis pulmonar<sup>125</sup>. Un estudio de Kaplan et al. demostró que las células progenitoras hematopoyéticas derivadas de la médula ósea con expresión de VEGFR1 son atraídas por depósitos de fibronectina secretados por fibroblastos residentes del tejido días antes de la implantación del tumor, estableciendo un nicho premetastásico antes de la llegada de las células tumorales<sup>126</sup>.

Por último, los CAF parecen contribuir al establecimiento del nicho premetastásico de forma directa, mediante su movilización desde el tumor primario hasta el sitio metastásico, ya que estos CAF se han encontrado en el frente de invasión de algunos tumores y en circulación en conjunto con CTC<sup>111</sup>. El análisis de la sangre de modelos murinos y pacientes de metástasis pulmonar ha revelado la presencia de CAF en la circulación, tanto de forma individual como formando clústeres con CTC<sup>111,127,128</sup>. Es más, células progenitoras de fibroblastos han sido

detectadas en la sangre periférica de pacientes de cáncer de pulmón, concretamente en venas pulmonares desde donde pueden verse reclutados hasta el estroma tumoral<sup>129</sup>. Los CAF han sido también detectados en el fluido de ascitis de pacientes con cáncer de ovario<sup>130</sup> y células similares a fibroblastos han sido observadas en la sangre de pacientes metastásicos de cáncer de próstata<sup>131</sup>. Todos estos datos indican que la existencia de fibroblastos circulantes que contribuyen a la acumulación de CAF en las localizaciones metastásicas podría favorecer las capacidades metastásicas de las CTC e incluso promover la formación de clústeres de CTC.

### 6.3. Papel de los CAF en la formación de clústeres de CTC

Alternativamente a la migración de tipo mesenquimal de células individuales mediadas por la TEM, las células tumorales también pueden migrar colectivamente como grupo mientras mantienen una adhesión célula-célula estable<sup>132</sup>. Se cree que, dentro de estos grupos, las células tumorales que exhiben características mesenquimales actuarían como líderes, acompañados de células seguidoras que mantienen su fenotipo epitelial<sup>133</sup>. En este sentido, los clústeres de CTC encontrados en pacientes de cáncer de mama muestran tanto fenotipos mesenquimales como epiteliales<sup>52</sup>.

El estudio de Gaggioli et al. muestra que los CAF dirigen la invasión de células de carcinomas escamosos generando huecos en la MEC a través de los cuales se pueden mover como cadenas colectivas. Sin embargo, este efecto no se observa cuando estas células son incubadas con medio condicionado de CAF<sup>134</sup>, sugiriendo que debe haber una interacción física entre CAF y células tumorales. De forma similar, en un co-cultivo 3D con células de carcinoma gástrico, los CAF inducen la formación de agregados celulares invasivos y se sitúan en el centro del frente de invasión, pero solo cuando ambos tipos celulares están en asociación directa<sup>135</sup>. Además, se ha observado que los CAF pueden ejercer fuerza sobre las células tumorales mediante la adhesión de N-cadherina y E-cadherina de las membranas de CAF y células tumorales, respectivamente, proporcionando un mecanismo de invasión cooperativa<sup>127,136</sup>. Finalmente, un modelo de metástasis en embriones de pez cebra muestra que los CAF diseminados se mantienen en estrecha asociación con las células tumorales en la localización metastásica y estos CAF promueven la capacidad metastásica de las células de diferentes tipos tumorales<sup>137</sup>. Colectivamente, estos estudios apoyan que una interacción física directa entre los CAF y las células tumorales puede mediar la formación de clústeres heterotípicos.

No obstante, los CAF parece que pueden guiar también la migración de los clústeres de CTC sin la necesidad de una interacción física directa. Estos fibroblastos pueden estar implicados en la formación de clústeres de células tumorales mediante la invasión de grupos de células tumorales a través de la inducción de la plasticidad epitelio-mesénquima.

Un estudio reciente en cáncer de mama muestra que los factores SDF-1 y TGF- $\beta$  liberados por los CAF producen la formación de una población híbrida epitelio-mesénquima y una población altamente epitelial dentro de los clústeres de células tumorales<sup>138</sup>. Las células híbridas son inducidas por la expresión de ZEB1 y lideran una migración colectiva, mientras que las células epiteliales actúan como seguidoras y mantienen las adhesiones celulares que permiten la formación del clúster, mostrando una mayor capacidad metastásica en modelos murinos. Hay que destacar que además de la presencia de clústeres de CTC híbridos en la sangre de ratones, esta población híbrida también existe en carcinomas primarios de pacientes de cáncer de mama. Sin embargo, en este estudio particular, no encontraron CAF en la metástasis pulmonar<sup>138</sup>. Esta observación parece indicar que no hay necesidad de una interacción física entre los CAF y las células

tumorales, y que los factores secretados por los CAF inducen la plasticidad de forma paracrina en las células tumorales, favoreciendo la formación de clústeres homotípicos en vez de clústeres heterotípicos.

Respecto a otros tipos de cáncer, en un modelo murino de cáncer de próstata, la coinyección de CAF con células tumorales dio como resultado la inducción de EMT a través de la secreción de metaloproteasas y un aumento en el crecimiento tumoral y el desarrollo metastásico. El examen histológico de tumores primarios de estos ratones reveló la presencia de varios *emboli* de células tumorales dentro de las vénulas periféricas<sup>139</sup>, sugiriendo la existencia de una migración colectiva tumoral sin interacción física con CAF. Este estudio y el anterior apoyan la existencia de un mecanismo indirecto de formación de clústeres debido a los CAF, los cuales inducen una reprogramación en las células tumorales epiteliales, que sufrirán una TEM o desarrollarán una plasticidad epitelio-mesénquima.

## 7. MODELOS ANIMALES APLICADOS EN EL ESTUDIO DE LOS CLÚSTERES DE CTC

La habilidad de mantener y estudiar tejidos humanos en un ambiente vivo ha probado ser una herramienta inestimable en la investigación del cáncer de mama durante décadas, existiendo numerosos modelos murinos para su estudio.

### 7.1. Modelos murinos

Los modelos murinos están bien establecidos en la investigación en cáncer, pueden ser genéticamente modificados y son ideales para el estudio de las propiedades tumorigénicas y metastásicas de las células tumorales humanas. En cáncer de mama, los estudios más extendidos han sido los xenotrasplantes de células tumorales de mama en ratones inmunocomprometidos, como los xenotrasplantes derivados de línea celular (CDX), xenotrasplantes derivados de CTC (CDXs) y xenotrasplantes derivados de pacientes (PDX), en los que se pueden estudiar las interacciones entre el tumor y los tejidos hospedadores, así como las capacidades tumorigénicas y metastásicas de las células tumorales<sup>140</sup>. Entre los modelos de ratón inmunocomprometidos, destaca el ratón *nude*, el cual carece de células T, pero que presenta un limitado éxito en el establecimiento del tumor y en el desarrollo de la metástasis<sup>141</sup>. Por otro lado, está muy extendido el uso de los ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID), los cuales poseen un defecto en la diferenciación y la maduración de los linfocitos<sup>142</sup> y, por tanto, una inhibición severa de la generación de células T y B; aunque tienen un sistema inmune innato funcional (células NK, neutrófilos, macrófagos), lo cual dificulta el xenotrasplante de células no transformadas. Este modelo se ha demostrado eficiente en el xenotrasplante de células tumorales humanas<sup>143</sup>. Una de las rutas por las que se optó para suprimir el sistema inmune innato en los ratones SCID fue su cruce con ratones *beige*, los cuales presentan una reducción aguda de la función de las células NK, dando lugar a los ratones SCID/*beige*<sup>140,144</sup>.

Los xenotrasplantes derivados de línea celular o CDX se pueden dividir en heterotópicos (cuando las células tumorales humanas son implantadas en una zona del ratón no relacionada con el sitio tumoral original), ortotópicos (cuando se implantan en el órgano correspondiente anatómicamente, en este caso, en la glándula mamaria) y metastásicos (en la vena de la cola o intracardiaco). Aunque los xenotrasplantes subcutáneos están muy extendidos y las células de cáncer de mama pueden crecer de ese modo<sup>145</sup>, no se puede obviar la importancia del microambiente tumoral en la progresión del cáncer. Por tanto, se ha postulado que el tejido graso mamario (xenotrasplante ortotópico) es el sitio más apropiado para realizar estos xenotrasplantes<sup>146–148</sup>. Comparado con la inyección subcutánea, el xenotrasplante ortotópico aumenta el potencial tumorigénico y, en ocasiones, la capacidad metastásica de las líneas utilizadas<sup>149,150</sup>.

Entre las líneas celulares de cáncer de mama comúnmente utilizadas, se encuentran las procedentes de pacientes de subtipo luminal A (MCF-7 y T47D), que solo forman tumor en presencia de estrógenos y su crecimiento puede ser inhibido con terapia anti-estrógenos; y aquellas con subtipo luminal B (BT474 y MDA-MB-361) y subtipo triple negativo (MDA-MB-231, MDA-MB-468 y SUM1315), las cuales han mostrado capacidad tumorigénica. Sin embargo, las líneas representativas del subtipo HER2<sup>+</sup> (SKBR3 y MDA-MB-453) se caracterizan por un potencial tumorigénico muy pobre en estos modelos<sup>151</sup>. Respecto a su uso para el estudio de la metástasis, los xenotrasplantes con células ER<sup>+</sup> son poco invasivos y rara vez se observa metástasis, mientras que los tumores generados a partir de líneas celulares triple negativo pueden llegar a ser altamente invasivos.

Loredana et al. describieron el comportamiento metastásico de diversas líneas celulares, como MDA-MB-231, BT-474-MDA-MB-453 y MDA-MB-468, las cuales fueron inyectadas en ratones inmunocomprometidos. En el caso de la línea MDA-MB-231, las CTC fueron observadas tras 5 semanas, mientras que en las líneas menos agresivas la cantidad de CTC y de clústeres fue inferior. No obstante, todos los modelos desarrollaron metástasis pulmonar<sup>152</sup>. Asimismo, otro estudio aisló y caracterizó CTC individuales, así como clústeres de CTC y neutrófilos a partir de pacientes y modelos murinos de cáncer de mama. Observaron a su vez que estos clústeres mostraban varios genes relacionados con la progresión del ciclo celular sobreexpresados respecto a las CTC individuales<sup>69</sup>. Junto a los dos mencionados, otros estudios han demostrado el valor de los xenotrasplantes derivados de línea celular<sup>26,79,153,154</sup>.

Alternativamente a los xenotrasplantes, la metástasis de cáncer de mama se suele estudiar a través de inyección intravenosa de las células tumorales, permitiendo la colonización de los órganos específicos, como por ejemplo la inyección en vena lateral de la cola para el estudio de la metástasis pulmonar, o la inyección del ventrículo izquierdo para la metástasis al hueso<sup>155</sup>.

Los xenotrasplantes derivados de paciente o PDX implican el trasplante de células primarias humanas tumorales o trozos de tumor en un hospedador murino. Al contrario que los CDX, los PDX preservan muchas de las características del tumor original, incluyendo cinéticas de crecimiento, características histológicas, invasividad y capacidad metastásica, y respuesta a terapia. Ramani et al. generaron un total de 37 PDX a partir de pacientes de cáncer de mama triple negativo. Sus análisis revelaron la presencia de CTC en 32 de los ratones, así como diferentes tipos de metástasis en pulmones, hígado y cerebro<sup>156</sup>. Por otro lado, Yoko et al. demostraron que el trasplante de tumores derivados directamente de pacientes en modelos murinos permite ilustrar la diversidad del cáncer de mama humano, mientras se mantiene las características originales del tumor original<sup>157</sup>. Asimismo, otros estudios han podido demostrar la utilidad de los PDX para representar y estudiar la realidad tumoral del cáncer de mama<sup>158-161</sup>.

Mientras los PDX se mantengan *in vivo* mediante pases directos entre ratones, sus características serán similares a los tumores del paciente original. El paso limitante en la generación de PDX es siempre el primer xenotrasplante, cuyo éxito varía según el subtipo tumoral. Si ese primer PDX es exitoso, los xenotrasplantes subsiguientes serán más eficientes<sup>162</sup>. Actualmente, se han obtenido PDX que modelizan de forma efectiva la metástasis, manteniendo los patrones de invasión que se observan en la clínica<sup>163</sup>. Igual que sucede con los CDX, el sitio más común de metástasis en los PDX son los pulmones y los nodos linfáticos, mientras que la metástasis cerebral y ósea rara vez se observan, a pesar de que ocurran con frecuencia en pacientes<sup>164</sup>.

Hasta ahora, los xenotrasplantes derivados de CTC o CDXs se han establecido a partir de cáncer de mama<sup>165</sup>, pulmón próstata y melanoma<sup>166</sup>. En 2013 se realizó el primer experimento exitoso de xenotrasplantes con CTC de cáncer de mama luminal. Seis modelos murinos desarrollaron metástasis en el hígado, hueso y pulmones tras el xenotrasplante de 1000 CTC de 3 pacientes con cáncer de mama metastásico avanzado. Los análisis de expresión de las CTC mostraron un fenotipo común EpCAM<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> MET<sup>+</sup> CD47<sup>+</sup>, el cual se asocia a una disminución en la supervivencia libre de progresión de pacientes de cáncer de mama metastásicos<sup>167</sup>.

Otro grupo hizo un xenotrasplante a partir de CTC de cáncer de mama triple negativo con gran cantidad de CTC en sangre. Dichas CTC fueron inyectadas subcutáneamente en ratones *nude* y se observaron tumores palpables 5 meses después. Mediante el análisis de la expresión génica, los tumores procedentes del xenotrasplante y los tumores de pacientes demostraron un fenotipo prácticamente idéntico. Además, se detectaron mecanismos relevantes para la biología de los tumores triple negativo en el ARN de los CDXs, como la ruta WNT<sup>168</sup>.

Respecto a otros tipos de cáncer, se han realizado CDXs en melanoma<sup>169</sup>, cáncer de pulmón<sup>170,171</sup>, hígado<sup>172</sup> y próstata<sup>173,174</sup>.

## 7.2 Pez cebra

El pez cebra o *Danio rerio* como organismo modelo vertebrado<sup>175</sup> presenta ciertas características como el rápido desarrollo embrionario extrauterino, la transparencia de los embriones y su abundante descendencia que hacen de él un modelo muy atractivo con múltiples posibilidades, como observar en tiempo real el desarrollo del tumor o la facilidad de hacer *screenings* masivos de compuestos<sup>176</sup>. Asimismo, la falta de sistema inmune adaptativo en las larvas de pez cebra ofrece un modelo susceptible de recibir xenotrasplantes de células tumorales sin que se produzca un rechazo por parte del receptor<sup>177</sup>, además de permitir el estudio de las interacciones de estas células tumorales con células del microambiente pertenecientes al sistema inmune innato, como neutrófilos<sup>178</sup> y macrófagos<sup>179</sup>.

La posibilidad de observar las células xenotrasplantadas directamente en el embrión de pez cebra, debido a su transparencia, y poder realizar un seguimiento de su proliferación y migración se presenta como una gran ventaja. En 2005, Lee et al. fueron los primeros en inyectar células de melanoma humano en pez cebra, inyectándolas en embriones en estado de blástula<sup>180</sup>. Tras mantener a los embriones a 31°C durante 5 días, se observó que las células de melanoma sobrevivían y diseminaban a la cabeza, tronco y cola de los peces inyectados. Haldi et al. optimizaron los parámetros para el xenotrasplante en pez cebra cuando propusieron el estado de 48 horas post fertilización (hpf) como el estado ideal para el trasplante. En su estudio, células de melanoma humano y otras líneas celulares humanas fueron capaces de sobrevivir y formar tumores en el embrión<sup>181</sup>.

Entre las líneas celulares tumorales utilizadas para el xenotrasplante en peces cebra se incluyen glioma, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, carcinomas de ovario, cáncer de mama, sarcoma de Ewing, cáncer de próstata, retinoblastoma y leucemia<sup>182</sup>.

Los sitios de trasplante en el embrión de pez cebra pueden variar, pero suelen ser el saco vitelino, el Ducto de Cuvier, la vena caudal, la cavidad pericárdica, el espacio perivitelino y los ventrículos del cerebro<sup>182</sup>. Dependiendo del sitio de inyección, se pueden estudiar diferentes características de la tumorigénesis, como la invasión, extravasación y metástasis o la interacción de las células con el microambiente tumoral. Normalmente, los peces xenotrasplantados se mantienen entre 32,5–35°C grados, relativamente cerca de la temperatura fisiológica para las células humanas, pero permitiendo el desarrollo normal del pez cebra (28°C)<sup>183</sup>.

Utilizando el pez cebra como modelo, se ha estudiado el impacto de las fuerzas hemodinámicas en el arresto y la extravasación de las CTC. En este trabajo, pudieron identificar los valores umbrales de flujo y fuerzas de adhesión que permiten una detención eficaz de las CTC en los vasos sanguíneos<sup>184</sup>. Asimismo, se demostró que el arresto temprano está mediado por la formación de adhesiones débiles, dependientes de CD44 e integrina  $\alpha\beta 3$ . Sin embargo, la estabilización de este arresto depende de adhesiones dependientes de la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , que tienen una mayor fuerza de adhesión, permitiendo a las CTC arrestarse en regiones vasculares desde donde podrán extravasar. Además, el flujo sanguíneo favorece el depósito de fibronectina en las células endoteliales, la cual es un ligando para la integrina  $\alpha\beta 3$ <sup>185</sup>. Por otro lado, el mecanismo exacto de extravasación no se conoce. En este modelo también se observó que la extravasación de las CTC de la circulación puede darse por angiopellosis, mecanismo por el cual las CTC pueden salir individualizadas o como clústeres. Demostraron a su vez que cuando las células de cáncer cervical y de melanoma usan este mecanismo para extravasar como clústeres, muestran una habilidad mayor para formar tumores en sitios distantes que las células extravasadas individualmente, ya que presentan una mayor capacidad proliferativa<sup>186</sup>.

Utilizando el modelo del pez cebra, se pudo observar una característica muy interesante de los clústeres de CTC. Pese a que se ha asumido que los clústeres de CTC son demasiado grandes para atravesar vasos sanguíneos estrechos, como los capilares, se vio que clústeres de más de 20 células pudieron atravesar vasos del tamaño de capilares presentes en embriones de pez cebra, mediante una rápida reorganización en cadenas de fila única. Asimismo, ensayos preliminares muestran que estos clústeres podrían ser desagregados durante el tránsito mediante fármacos que afecten a las interacciones celulares<sup>187</sup>.

Finalmente, se han empezado a desarrollar modelos PDX en pez cebra. En 2009, Marques et al. fueron pioneros en conseguir modelos reales de PDX en pez cebra, trasplantando células de tumor primario de cáncer gastrointestinal en el saco vitelino de embriones de 48 hpf<sup>188</sup>. Aunque necesiten mucho más trabajo de investigación, ya se han realizado PDX de glioblastoma<sup>189</sup>, cáncer gástrico<sup>190</sup> y melanoma<sup>191</sup>, abriendo el camino de una medicina personalizada cada vez más cercana.

Hay que destacar el estudio de Mercatali et al, dada su relevancia para la presente tesis doctoral. Estos autores inyectaron un cultivo primario de metástasis de hueso de una paciente de cáncer de mama en embriones de pez cebra para estudiar su potencial metastásico. El comportamiento y expresión génica de este PDX se comparó con los de líneas celulares de diferente potencial metastásico (MCF7 y MDA-MB-231). La línea MCF7, que proviene del mismo subtipo tumoral que el cultivo primario, no sobrevivió dentro del embrión, mientras que la línea MDA-MB-231 sobrevivió y diseminó a diferentes partes del pez, incluyendo tejidos hematopoyéticos caudales. El cultivo primario, pese a su subtipo tumoral de origen, diseminó, extravasó los vasos y llegó también al tejido hematopoyético caudal, indicando una posible adaptación de las células del tumor primario al tejido óseo del paciente una vez realizan la metástasis<sup>192</sup>.

Por último, nuestro grupo de investigación ha publicado recientemente un trabajo en el cual se realizaron xenotrasplantes de líneas celulares de cáncer de mama individualizadas y clústeres en embriones de peces cebra<sup>193</sup>. En este trabajo, se pudo observar cómo los clústeres de CTC, pese a poseer una menor frecuencia de diseminación en la circulación, mostraban una mayor supervivencia y proliferación respecto a las CTC. Este, junto a los estudios anteriormente mencionados, destacan la relevancia del pez cebra para el estudio de la biología de las CTC y los clústeres de CTC.



# **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral consiste en estudiar la heterogeneidad celular presente en los clústeres de CTC para determinar cómo componentes del microambiente tumoral, particularmente los fibroblastos asociados a cáncer, son capaces de modificar la capacidad metastásica de las células tumorales, lo que nos ayudará a entender el papel de los clústeres de CTC en la progresión tumoral del cáncer de mama. Para lograrlo, se ha dividido en diferentes objetivos específicos:

- Generar un modelo *in vitro* de clústeres de CTC homotípicos y heterotípicos que represente la heterogeneidad celular a partir de líneas tumorales humanas de cáncer de mama y de fibroblastos normales y fibroblastos asociados a cáncer.
- Estudiar las posibles diferencias en comportamiento de las células tumorales de cáncer de mama en respuesta a fibroblastos asociados a cáncer en base a su fenotipo molecular y capacidad metastásica mediante ensayos funcionales *in vitro*.
- Caracterizar molecularmente la respuesta de las células tumorales a las interacciones celulares establecidas con los fibroblastos, así como los fenotipos de activación de los propios fibroblastos.
- Optimizar las condiciones experimentales para la generación de xenotrasplantes de clústeres de CTC homotípicos y heterotípicos en embriones de pez cebra (*Danio rerio*).
- Estudiar las capacidades de diseminación y anidamiento de los clústeres de CTC homotípicos y heterotípicos mediante la generación de xenotrasplantes en embriones de pez cebra y ratón (*Mus musculus*).
- Utilizar un modelo de cáncer de mama metastásico en ratón para estudiar el posible papel regulador de los fibroblastos asociados a cáncer sobre el crecimiento tumoral, así como sobre la generación de CTC y clústeres de CTC (homotípicos y heterotípicos) y su contribución al establecimiento de las metástasis.



# MATERIALES Y MÉTODOS



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. CULTIVOS CELULARES Y GENERACIÓN DE COCULTIVOS

#### 1.1 Líneas celulares

Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de mama: las células MDA-MB-231 de subtipo triple negativo y las células MCF7 de subtipo luminal A. Ambas líneas celulares expresan la proteína fluorescente verde aumentada (eGFP) y el gen luciferasa (Luc). Las células MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup> fueron obtenidas de Tebu-Bio (España) y las células MCF7<sup>eGFP-Luc</sup> fueron obtenidas de GeneCopoeia, Inc (EE. UU).

Se utilizaron dos líneas celulares de fibroblastos. Las células vCAF, procedentes de fibroblastos CAFs61 de carcinoma de vulva inmortalizados mediante transfección retroviral con pBABE-HTERT, están marcadas con proteína fluorescente roja (mCherry) (vCAF<sup>mCherry</sup>) mediante el uso de un constructo lentiviral CAGAP-mCherry y fueron cedidas por el Dr. Erik Sahai<sup>136</sup>. Las células BJ, una línea celular procedente de fibroblastos humanos sanos extraídos de prepucio de un paciente neonato, fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC).

Las células se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (BIOWEST) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S). El medio de cultivo de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> fue suplementado con 1% de Insulina + Transferrina + Selenio (GIBCO). Las células se mantuvieron a 37° C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

Para la generación de cocultivos, las células tumorales y los fibroblastos se mezclaron en diferentes proporciones (proporción fibroblasto: célula tumoral 1:2 o 1:5) según los requerimientos del experimento. Ambas líneas celulares pueden juntarse justo antes del ensayo para obtener una población celular heterogénea o 24h antes del ensayo para permitir la interacción de las células implicadas y la formación de clústeres heterotípicos, tal y como se explica en el siguiente apartado.

#### 1.2. Generación de clústeres

Se utilizaron dos protocolos distintos para la generación de clústeres homotípicos, formados exclusivamente por células tumorales, o heterotípicos, formados por células tumorales y fibroblastos:

1) Las células se siembran en placa de baja adherencia (Corning) y se cultivan durante 24 horas en suspensión para permitir la formación de agregados celulares. Tras el cultivo, las suspensiones celulares son disociadas mecánicamente con pipetas p1000 y p200 para obtener una suspensión celular de clústeres de tamaño adecuado.

2) Las células se cultivan en adherencia hasta alcanzar una confluencia del 80%. En ese momento, las células son disociadas con tripsina-EDTA 1X (0,05%) (LONZA) para obtener una suspensión celular que es disgregada mecánicamente con pipetas p1000 y p200, consiguiendo clústeres de tamaño adecuado.

### 2. ENSAYOS FUNCIONALES *IN VITRO*

## 2.1. Proliferación y viabilidad celular

La proliferación celular se mide mediante la detección de la actividad luciferasa de las líneas celulares tumorales. Se siembran cultivos homotípicos (MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup>/MCF7<sup>eGFP-Luc</sup>) y heterotípicos a ratio 1:5 y 1:2 (fibroblasto: célula tumoral) (MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup>/MCF7<sup>eGFP-Luc</sup> + vCAF<sup>mCherry</sup>) en una placa opaca de 96 pocillos a una concentración final de  $2.5 \times 10^3$  células tumorales/pocillo en 200  $\mu$ L de medio de cultivo durante 4, 24, 48 y 72 horas. Tras el tiempo de incubación, se añade D-luciferina (Perkin Elmer) a una concentración final de 150  $\mu$ g/ml y se mide la señal de luciferasa usando el equipo Envision® 2105 Multimode Plate Reader (Perkin Elmer).

Alternativamente, se usó el ensayo de proliferación Alamar, en el que se siembran cultivos homotípicos y heterotípicos a ratio 1:5 y 1:2 en una placa de 96 pocillos a una concentración final de  $2.5 \times 10^3$  células tumorales/pocillo en 200  $\mu$ L de medio de cultivo y se incuban a 37 °C durante 4, 24, 48 y 72 horas. Tras el tiempo de cultivo, se añade el reactivo AlamarBlue® al 10% (20  $\mu$ L por pocillo) y el cultivo se incuba durante 3 horas protegido de la luz, tiempo tras el que se mide la señal de fluorescencia generada en un lector de microplacas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech) utilizando el software FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech).

## 2.2. Migración en insertos Transwell®

La capacidad de migración de las líneas tumorales en poblaciones homotípicas y heterotípicas se evalúa utilizando insertos Transwell® con una membrana de policarbonato de 8.0  $\mu$ m de poro (Corning). Cada Transwell® se cubre con 100  $\mu$ L de Matrigel reducida en factores de crecimiento (Corning) a una concentración de 10  $\mu$ g/ $\mu$ L y se incuba durante 30 minutos para permitir su polimerización. Las células tumorales MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup> o MCF7<sup>eGFP-Luc</sup> se cocultivaron con los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> 24h antes del experimento para poder obtener clústeres heterotípicos y se mantuvieron en condiciones de serodeprivación. Un total de  $5 \times 10^4$  células tumorales/ Transwell® son sembradas con un gradiente de FBS del 10% (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) durante 8 horas en el caso de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup> y 24 horas en el caso de la línea MCF7<sup>eGFP-Luc</sup>. Tras la incubación, se retira la suspensión celular, se lava el inserto con tampón fosfato salino (PBS) (Biowest) y la parte superior de las membranas de los Transwell® son raspadas para eliminar las células no migradas. Las células migradas se fijan con paraformaldehído (PFA) al 3% + 1% glutaraldehído (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos y, posteriormente, se contabilizan las células con expresión de eGFP utilizando un microscopio Leica Dmi8 (Leica Microsystems) y el *software* libre ImageJ (NIH Image).

## 2.3 Cierre de herida

Se siembran  $2 \times 10^5$  MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup> o MCF7<sup>eGFP-Luc</sup> en una placa de 24 pocillos. Se añaden vCAF<sup>mCherry</sup> para formar los cultivos heterotípicos en ratio 1:5 y 1:2 (fibroblasto y célula tumoral). Las células son incubadas a 37 °C durante 24 horas, permitiendo la formación de una monocapa. Se crea la herida mediante el rascado de la monocapa celular, se retira el medio de cultivo para eliminar las células muertas, se lava con PBS y se añade medio nuevo. Las fotos son tomadas usando un microscopio Leica Dmi8 (Leica Microsystems) a 0, 20 y 28 horas para los ensayos con la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, y 0, 24 y 48 horas para la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup>. Posteriormente, se mide el ancho de la herida en el tiempo mediante el *software* libre ImageJ (NIH Image), calculando los micrómetros que separan ambas partes de la monocapa en la misma localización de la placa para todos los puntos temporales.

## 2.4. Colonogénesis

Se obtienen clústeres procedentes de cultivos homotípicos y se resuspenden  $1 \times 10^4$  células tumorales en agarosa de grado molecular (Fisher BioReagents) al 0,3% peso/volumen en DMEM suplementado con 10% FBS y 1% penicilina/estreptomicina, formando una capa sobre 1,5 ml de agarosa previamente solidificada al 0.5% peso/volumen en DMEM 10% FBS y 1% penicilina/estreptomicina en una placa de 6 pocillos. Asimismo, se obtienen clústeres procedentes de cultivos heterotípicos de ratio 1:5 o 1:2 (fibroblasto: célula tumoral) y se procesan de igual forma que los clústeres homotípicos. Las células se incuban a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante un periodo de 3-4 semanas al término de las cuales las colonias se fijan con 3% PFA + 1% glutaraldehído (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos. El número y área de las colonias formadas es determinado mediante el uso de un microscopio Leica DMI8 (Leica Microsystems) y el *software* libre ImageJ (NIH Image). Se estableció un tamaño mínimo de 75 µm para que las agrupaciones celulares observadas se considerasen colonia en el caso de los clústeres homotípicos y heterotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, debido al pequeño tamaño de un gran número de estas.

## 3. ENSAYOS DE FENOTIPADO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR *IN VITRO*

### 3.1. Análisis de expresión génica

El análisis de la expresión génica es realizado mediante RT-qPCR. Para realizar la extracción de ARN de las células se utilizó el High Pure RNA Isolation Kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantifica usando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Se utilizan cantidades iguales de ARN por condición experimental en la reacción de retrotranscripción para la obtención de ADN complementario (ADNc) con la enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase, 200 U/µL (Thermo Fisher Scientific). Las condiciones de la reacción son 25 °C durante 5 minutos, 50 °C durante 2 horas y 70 °C durante 15 minutos. El ADNc obtenido se amplifica con sondas TaqMan® (Thermo Fisher Scientific) y TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies) en un sistema LightCycler® 480 (Roche Life Science). La amplificación por PCR se realizó siguiendo los siguientes pasos: desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 10 segundos. Los niveles de expresión génica se muestran normalizados por el método  $\Delta C_t$ , usando la expresión media del gen gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) y *Beta-2-Microglobulina* (B2M). Cada muestra se procesó por duplicado.

<b>Gen</b>	<b>Sonda Taqman</b>
ACTA2	Hs00426835_g1
B2M	Hs00187842_m1
CDH1	Hs00170423_m1
CDH2	Hs00983056_m1
CD44	Hs01075861_m1
FAP	Hs00990806_m1
FN1	Hs01549976_m1
FSP1	Hs00243202_m1
GAPDH	Hs99999905_m1
MKI67	Hs01032443_m1
PDGFR $\alpha$	Hs00998018_m1
PDGFR $\beta$	Hs01019589_m1
TNC	Hs01115665_m1
VIM	Hs00958116_m1

Figura 3. Lista de genes analizados mediante RT-qPCR.

Los análisis de expresión génica se llevaron a cabo para los cultivos celulares de los dos ensayos descritos a continuación (3.2 y 3.3).

### 3.2. Estudio de interacción paracrina en co-cultivo

Se siembran  $1 \times 10^5$  células MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup> o  $2 \times 10^5$  células MCF7<sup>eGFP-Luc</sup> en placas de 6 pocillos en monocultivos, o en cocultivo colocando insertos Transwell<sup>®</sup> de  $0.4 \mu\text{m}$  de tamaño de poro (Corning). Sobre los insertos se siembran  $2 \times 10^5$  células vCAF<sup>mCherry</sup> de modo que los fibroblastos no quedan en contacto con las células tumorales. Todas las células se incuban a  $37^\circ\text{C}$  con medio de cultivo completo y, tras 5 días de cultivo, los insertos y los pocillos se lavan con PBS y se añade tampón de lisis del High Pure RNA Isolation Kit (Roche), para la posterior obtención de ARN de ambas poblaciones celulares (células tumorales y fibroblastos) según lo detallado en el apartado 3.1. A partir de estas muestras se analiza el perfil de expresión génica de las células en cocultivo en comparación con los monocultivos.

### 3.3. Activación con TGF- $\beta$

Se siembran  $6 \times 10^4$  vCAF<sup>mCherry</sup> o  $1 \times 10^5$  BJ en placa de 12 pocillos y se incuban a  $37^\circ\text{C}$  con medio completo durante 48h. Posteriormente, se retira el suero de los cultivos y se incuban con medio sin suero durante 24h. Tras la serodeprivación, se añade el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  recombinante humano (TGF- $\beta$ ) (Preprotech) a una concentración de  $5 \text{ ng/mL}$  en los pocillos y se incuban durante 24, 48 y 72 horas. El TGF- $\beta$  se reconstituyó con ácido cítrico previo a su utilización, por lo que se utilizó el ácido cítrico como control en este ensayo. Los pocillos se lavan con PBS y se añade tampón de lisis del High Pure RNA Isolation Kit (Roche), para la posterior obtención de ARN según lo detallado en el apartado 3.1. El perfil de expresión génica se compara entre los fibroblastos control y tratados con TGF- $\beta$ .

### 3.4. Ensayo de agregación

Para generar suspensiones homotípicas, se siembran  $2 \times 10^5$  células MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup> o MCF7<sup>eGFP-Luc</sup>, previamente disgregadas con una pipeta p200 y filtradas a través de un filtro de células (Corning) de 100  $\mu\text{m}$  para asegurar una correcta individualización, en placa de 24 pocillos de baja adherencia. Para generar suspensiones heterotípicas (ratio 1:2), a mayores se añaden  $1 \times 10^5$  vCAF<sup>mCherry</sup> previamente disgregados. Cada condición experimental se siembra por duplicado, correspondiente a pocillos control (previo a la incubación, 0 horas) y pocillos de agitación. Las placas se colocan en un agitador orbital a 37 °C y se agitan a 150 rpm (Orbital Shaker, Lan Technics G) durante 1 hora. Para evaluar la agregación, todos los pocillos se fijan con PFA (4%) y el número de agregados y células individuales se contabilizan en una cámara Neubauer con un microscopio de fluorescencia DMi8 (Leica), en función de la expresión eGFP y mCherry. Para cada condición, las suspensiones celulares son levemente homogenizadas con una pipeta p1000 (preservando la agregación), cargadas en la cámara y el número de agregados celulares contabilizados en base a la toma de al menos seis medidas por pocillo. Para la cuantificación final, se calcula el índice de agregación mediante la fórmula:  $1 - (n^\circ \text{ de células individualizadas a tiempo final} / n^\circ \text{ de células individualizadas a tiempo inicial})$ . En estos experimentos, se establece un umbral de agregación por el cual clústeres de 3 células tumorales no se considera agregación.

### 3.5. Formación de esferoides en gota colgante (*Hanging drop*)

Se genera una suspensión celular a concentración  $5 \times 10^5$  células MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup>/ml para ensayos homotípicos y  $1 \times 10^6$  células/mL para ensayos heterotípicos (en proporción 1:1 fibroblasto: célula tumoral) en medio basal MammoCult<sup>TM</sup> (StemCell<sup>TM</sup> Technologies). A partir de estas suspensiones se distribuyen cuarenta gotas de 20  $\mu\text{L}$ , conteniendo  $1 \times 10^4$  células en los cultivos homotípicos y  $2 \times 10^4$  células en los heterotípicos, en la parte interior de la tapa de una placa petri de 10 cm de diámetro, tras lo cual la tapa se invierte y se coloca sobre la base de la placa, quedando las gotas colgando. En el interior se la placa se añaden 10 mL de PBS para minimizar la evaporación de las gotas situadas en la parte superior de la placa. Se incuba durante 5-7 días y se toman imágenes con un microscopio de fluorescencia DMi8 (Leica), en función de la expresión eGFP y mCherry.

### 3.6. Inmunofluorescencia

Se siembran aproximadamente  $1 \times 10^4$  células sobre lentillas en una placa de 24 pocillos y se incuban en DMEM 10% FBS y 1% penicilina/estreptomicina a 37°C durante 24h. Al día siguiente, se retira el DMEM de los pocillos, se lavan con PBS y se fija 15 minutos con PFA 4%. Posteriormente, se lavan 3 veces con PBS y se bloquea con suero de cabra (Sigma-Aldrich) al 10% en PBS durante 30 minutos. Se utiliza InsidePerm (Inside Stain Kit, Miltenyi Biotec) como permeabilizante y diluyente de anticuerpo, y se incuba el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C. Tras la incubación con el anticuerpo primario, las células se lavan 3 veces con PBS durante 5 minutos y se incuban con el anticuerpo secundario durante 1 hora. Los núcleos se tiñen con la tinción de ADN DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Las lentillas se vuelven a lavar 3 veces con PBS durante 5 minutos y se fijan a un portaobjetos con 5  $\mu\text{L}$  de Mowiol

(4-88 Reagent, Calbiochem). Las imágenes fluorescentes son adquiridas con un microscopio DMi8 (Leica).

Diana	Origen	Dilución	Referencia
<b>Anticuerpos primarios</b>			
mCherry	Conejo	1:500	Ab167453, <a href="#">Abcam</a>
GFP	Conejo	1:2000	Ab6556, <a href="#">Abcam</a>
FAP	Conejo	1:25	Ab53066, <a href="#">Abcam</a>
ACTA2	Ratón	1:1000	Ab7817, <a href="#">Abcam</a>
<b>Anticuerpos secundarios</b>			
IgG conejo	1:500	<a href="#">AlexaFluor® 647</a>	Ab150079, <a href="#">Abcam</a>
IgG ratón	1:500	<a href="#">AlexaFluor® 488</a>	Ab150113, <a href="#">Abcam</a>
IgG ratón	1:500	<a href="#">AlexaFluor® 594</a>	Ab150116, <a href="#">Abcam</a>
IgG ratón	1:500	<a href="#">AlexaFluor® 647</a>	Ab150115, <a href="#">Abcam</a>

Figura 4. Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunofluorescencia.

### 3.7. Ensayo de detección de citoquinas y quimioquinas

Los niveles de citoquinas y quimioquinas producidos por cultivos homotípicos y heterotípicos se analizan utilizando el kit Proteome Profiler™ Human Cytokine Array (R&D SYSTEMS), un inmunoensayo basado en membranas. Se sembraron monocultivos de MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup> o vCAF<sup>mCherry</sup>, así como cocultivos de MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> en una proporción 1:2, en la misma placa permitiendo una interacción física entre ambos tipos celulares o separados por insertos Transwell® de 0.4 µm de tamaño de poro (Corning) para estudiar interacciones paracrinas. Los cultivos son sembrados con el número de células adecuado para permitir que alcancen el 80% de confluencia al mismo tiempo, momento en el cual se serodeprivan y se mantienen con medio sin suero durante 48 horas. Tras ello, se recoge el sobrenadante y se centrifuga durante 5 minutos a 264 G para eliminar las partículas en suspensión. El sobrenadante es posteriormente procesado tal y como es descrito por el fabricante e incubado sobre las membranas. Las membranas incubadas con el sobrenadante son reveladas a 40 segundos de exposición, en base a una reacción quimioluminiscente, utilizando el equipo Chemidoc y se analizan los niveles de expresión de las citoquinas mediante el uso del *software* libre ImageJ (NIH Image) para la determinación de densitometrías.

CCL1/I-309	CCL2/MCP-1	MIP-1 $\alpha$ /MIP-1 $\beta$	CCL2/RANTES	Ligando CD40/TNFSF5	C5/C5a
CXCL1/GRO $\alpha$	CXCL12/SDF-1	G-CSF	GM-CSF	ICAM-1/CD54	IFN- $\gamma$
IL-1 $\alpha$ /IL-1F1	IL-1 $\beta$ /IL-1F1	IL-1ra/IL-1F3	IL-2	IL-4	IL-5
IL-6	IL-8	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-16
IL-17A	IL-17E	IL-18/IL-1F4	IL-21	IL-27	IL-32 $\alpha$
MIF	Serpina E1/PAI-1	TNF- $\alpha$	TREM-1	CXCL10/IP-10	CXCL11/I-TAC

Figura 5. Citoquinas detectadas por el kit Proteome Profiler<sup>TM</sup> Human Cytokine Array.

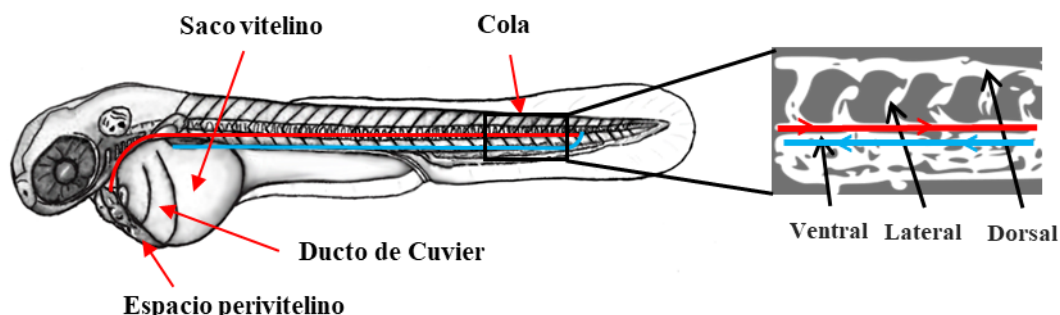
#### 4. ENSAYOS FUNCIONALES *IN VIVO*

##### 4.1. Xenotrasplante en embriones de pez cebra (*Danio rerio*)

Todos los procedimientos incluidos en la presente tesis doctoral han sido realizados según la legislación vigente recogida en el RD53/2013, el cual incluye al pez cebra (*Danio rerio*) como especie para procedimientos experimentales que debe ser protegida. En el caso de formas embrionarias, no obstante, esta ley solo aplica a los embriones de mamíferos en el último tercio de su desarrollo, pero no incluye a los embriones no mamíferos como los del pez cebra.

Los embriones de pez cebra (*Danio rerio*) son generados mediante el cruce de peces cebra adultos. Los embriones son mantenidos a 28°C y se incuban con PTU (N-Phenylthiourea, Sigma) a una concentración del 0,003% peso/volumen para inhibir la pigmentación superficial. Para realizar los xenotrasplantes, larvas de dos días de edad son decorionadas y anestesiadas con triclaína (Sigma) al 0,003% peso/volumen en medio E3 con PTU. Los embriones anestesiados son situados en una placa Petri de 10 cm cubierta con una capa de agarosa al 1,5%. Justo antes de la microinyección, se obtienen suspensiones celulares de los cultivos homotípicos y de los cultivos heterotípicos en proporción 1:2 (fibroblasto: célula tumoral). Se mezcla un millón de células tumorales con 6  $\mu$ L de PVP (Polivinilpirrolidona, Sigma-Aldrich) al 2% en PBS. Las agujas para la microinyección son capilares de borosilicato (1mm diámetro externo  $\times$  0.58mm diámetro interno, Harvard Apparatus) a los cuales se les secciona un segmento para abrir la punta a dos distancias diferentes: 0,7 cm o 1,1 cm del comienzo de la estrechez. Aproximadamente, 250 células son inyectadas en el espacio perivitelino de los embriones utilizando un microinyector IM 300 (Narishige) con una presión de salida de 10 psi y 0,03 ms de tiempo de inyección. Tras la inyección, los embriones son examinados para la presencia de fluorescencia en el sitio de inyección, se transfieren a una placa de 96 pocillos (un embrión por pocillo) con medio E3 + PTU y se incuban a 34°C durante tres días. Se toman fotos de los peces cebra a diferentes puntos temporales con un microscopio de fluorescencia DMi8 (Leica) para determinar la supervivencia y proliferación celular de las células xenotrasplantadas a lo largo del tiempo. Asimismo, se llevan a cabo análisis de diseminación celular dentro de la cola del embrión, estudiando el movimiento de las células tumorales entre diferentes zonas de la circulación del embrión: dorsal (incluye el vaso anastomótico longitudinal dorsal), ventral (incluye la vena caudal, la vena posterior cardinal y la arteria dorsal) y lateral (incluye los vasos intersegmentales que conectan las

dos regiones anteriores) (**figura 6**). Por último, se estudia la colocación de las células tumorales con los fibroblastos diseminados, a través del análisis del solapamiento de las fluorescencias de ambos tipos celulares.



**Figura 6.** Anatomía del embrión del pez cebra. Se marcan las partes más importantes para nuestro trabajo: espacio perivitelino, Ducto de Cuvier, saco vitelino y cola. La cola está dividida en zona dorsal, lateral y ventral. La circulación de la zona ventral forma un arco compuesto por la arteria caudal (rojo) y la vena caudal (azul).

Los datos son representativos de tres o más experimentos con más de 30 embriones por grupo. Si la tasa de supervivencia del grupo control es menor del 70%, los experimentos son descartados.

En los experimentos realizados con la línea de fibroblastos BJ, la cual no está marcada fluorescentemente, se lleva a cabo su tinción con Vibrant™ DiD Cell-Labeling Solution (TermoFisher Scientific), una tinción lipídica fluorescente que permite la visualización de las células a 647 nm a lo largo del tiempo. Se utilizan 5 µl de tinción/millón de células y se incuban durante 5 minutos a 37 °C y 15 minutos a 4° C para evitar la internalización del colorante.

#### 4.2. Experimentos en ratón (*Mus musculus*)

Todos los procedimientos incluidos en este trabajo fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Santiago (CEEA; código 15010/2019/002) (ver anexo 'Informe favorable Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Santiago de Compostela (CEEA)', 'Certificado de reconocimiento de la capacitación para manejar animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos. Función B (eutanasia)'; y 'Certificado de reconocimiento de la capacitación para manejar animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos. Función C (realización de procedimientos con animales)'). Ratones hembra SCID-Beige se obtuvieron del Parque de Investigación Biomédico de Barcelona (PRBB, Barcelona) o de Charles River (Francia), y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en las instalaciones de animales del Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS, Universidad de Santiago de Compostela) (REGA: ES150780275701) y del Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA, Universidad de Santiago de Compostela) (REGA: ES150780292901).

##### 4.2.1. Ensayo de colonización en pulmón de ratón

Para evaluar la capacidad de colonización pulmonar y de formación de tumores de los clústeres se preparan suspensiones de clústeres de MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup> (5 x 10<sup>5</sup> células) y clústeres heterotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup> + vCAF<sup>mCherry</sup> (5 x 10<sup>5</sup> células + 5 x 10<sup>5</sup> células) en 100 µL de PBS, y se inyectan en la vena lateral de la cola de los ratones SCID-Beige de 10 semanas de edad. La inyección de células tumorales se realizó en ratones inmovilizados

mediante un dispositivo de sujeción (cepo) y utilizando jeringas de 1 mL con agujas de calibre 27 (BD Medical). Una hora tras la inyección, se determina la presencia de células en el pulmón del ratón mediante el sistema de imagen *in vivo* IVIS (Perkin Elmer) tras la inyección intraperitoneal de luciferina (150 mg de luciferina/kg de peso; XenoLight™ D-Luciferin K+ Salt Bioluminescent, Perkin Elmer). El crecimiento de las metástasis se monitoriza cada 3-4 días durante 18 días, momento en el que los ratones son sacrificados por inhalación de CO<sub>2</sub>, y los pulmones extraídos quirúrgicamente para obtener imágenes basadas en bioluminiscencia (**figura 7**). Posteriormente, los pulmones se fijan en formol 10% v/v (VWR) y se embeben en parafina para llevar a cabo un posterior análisis histopatológico. Los cortes pulmonares se tiñen con hematoxilina-eosina y con anticuerpos para queratinas humanas AE1/AE3 (Roche diagnostics, Basilea, Suiza). Los análisis histológicos se realizaron en colaboración con el grupo de investigación de Patología Molecular Traslacional del Instituto de Investigación Vall d'Hebron (VHIR) (Barcelona).

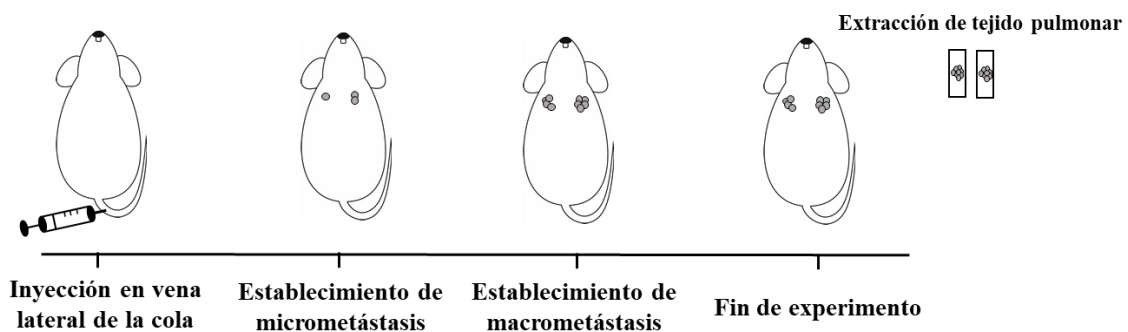


Figura 7. Esquema de xenotrasplante en vena lateral de cola de ratones SCID-beige.

#### 4.2.2. Xenotrasplante ortotópico en ratón

Para determinar el efecto de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la capacidad metastásica de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup>, se utilizaron dos grupos experimentales: ratones xenotrasplantados con la línea metastásica de cáncer de mama MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup> (homotípicos) y ratones xenotrasplantados con la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup> junto a los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> (heterotípicos).

Se realizaron dos tipos de experimentos. En el primero, se utilizan  $2 \times 10^6$  de células MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup> para el xenotrasplante homotípico y  $2 \times 10^6$  de células MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup> +  $2 \times 10^6$  de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> (proporción 1:1) para el xenotrasplante heterotípico. En el segundo, se realizan xenotrasplantes homotípicos con  $1 \times 10^6$  de células MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup> y heterotípicos en proporción 1,5:1 con  $1,5 \times 10^6$  de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> y  $1 \times 10^6$  de células MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup>.

Las suspensiones celulares son preparadas en 90  $\mu$ L de Matrigel (Corning) + medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (BIOWEST) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S); en una proporción 1:3 (*matrigel: medio de cultivo*).

Se inyectan 60  $\mu$ L del preparado celular ortotópicamente en el tejido graso de la mama de los ratones y se permite a las células crecer hasta formar tumores macroscópicos y desarrollar metástasis. El crecimiento tumoral y metastásico es monitorizado mediante bioluminiscencia con el sistema de imagen *in vivo* IVIS (Perkin Elmer) tras la inyección intraperitoneal de luciferina (150 mg de luciferina/kg de peso; Perkin Elmer). Una vez la metástasis está establecida, los animales son sacrificados por inhalación de CO<sub>2</sub>, los tejidos extraídos y la sangre recogida mediante punción cardíaca en tubos EDTA (**figura 8**).

Posteriormente, la sangre es diluida en 3 mL de PBS (Biowest) y procesada mediante el sistema microfluídico Parsortix™ (Angle PLC). Utilizando un microscopio Leica Dmi8 (Leica Microsystems), se cuantifican las células aisladas por el sistema en base a la fluorescencia verde (MDA-MB-231<sup>eGFP-Luc</sup>) y roja (vCAF<sup>mCherry</sup>). En el caso de vCAF<sup>mCherry</sup>, se realizó además la inmunofluorescencia con anticuerpo primario anti-mCherry, con el objetivo de aumentar la señal detectable.

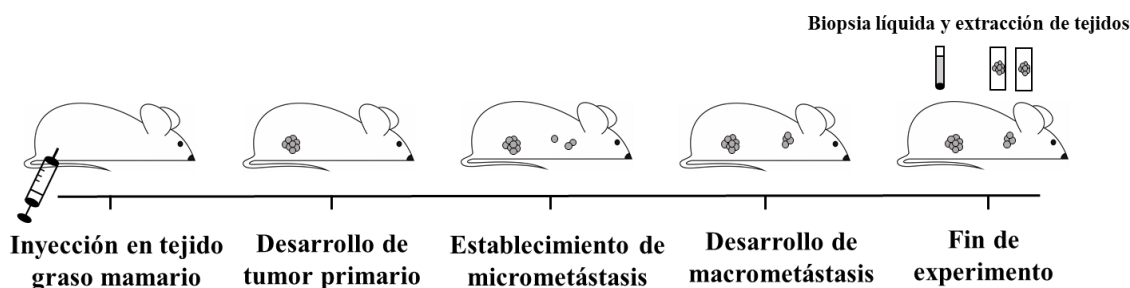


Figura 8. Esquema de xenotrasplante ortotópico en el tejido graso mamario de ratones SCID-beige.

## 5. ANÁLISIS DE DATOS

Las imágenes obtenidas por microscopía de los ensayos *in vitro* e *in vivo* se analizan con el *software* LAS X (Leica Microsystems) y el *software* libre ImageJ (NIH Image). Las imágenes de fluorescencia de los experimentos del pez cebra son analizados mediante el *software* libre Quantifish (Zebrafish Image Analyser). La cuantificación, análisis estadístico y representación gráfica de cada ensayo se realiza con el *software* Prism 8 (GraphPad Software).

Los datos de los ensayos funcionales y de caracterización se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Mann-Whitney. Los experimentos de pez cebra se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon (prueba no paramétrica para muestras emparejadas) cuando se compararon diferentes puntos temporales dentro del mismo grupo experimental y mediante la prueba de Mann-Whitney para la comparación de grupos experimentales distintos. Para el estudio de correlación entra los valores de fluorescencia en el pez cebra se realizó un análisis de regresión lineal.



# RESULTADOS



## RESULTADOS

Con el objetivo de estudiar el efecto de los fibroblastos asociados a cáncer en los clústeres de CTC, y si este efecto depende de las características fenotípicas de las células tumorales, se utilizaron dos líneas tumorales de cáncer de mama de diferente subtipo: MDA-MB-231 y MCF7. La línea celular MDA-MB-231 es una línea celular de cáncer de mama triple negativo que carece de receptores de estrógeno (ER) y de progesterona (PR), muy agresiva, invasiva y poco diferenciada. Esta línea presenta un enriquecimiento de marcadores asociados a la transición epitelio-mesénquima y la expresión de características asociadas a células madre (CSC). La línea MCF7 es una línea celular de cáncer de mama luminal A que expresa los receptores de estrógenos y progesterona, poco agresiva y no invasiva, considerada de bajo potencial metastásico. Por otro lado, se utilizaron dos líneas de fibroblastos humanos: una línea de fibroblastos sanos BJ como control y otra línea de fibroblastos asociados a cáncer, la cual expresa la proteína roja fluorescente mCherry (vCAF<sup>mCherry</sup>). Por tanto, el uso de esta línea vCAF<sup>mCherry</sup> será de gran utilidad para el estudio de su interacción con las líneas tumorales y el efecto sobre sus capacidades metastásicas.

### 1. CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS TUMORALES EN COCULTIVO CON vCAF<sup>mCherry</sup>

Se llevaron a cabo una serie de ensayos *in vitro* que evalúan características funcionales de las células tumorales implicadas en las distintas fases del proceso metastásico. Para ello, se utilizaron cultivos homotípicos, formados solo por células tumorales (MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> o MCF7<sup>eGFP-luc</sup>), y cultivos heterotípicos, formados por células tumorales y fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>. Hay que señalar que, para todos los ensayos realizados, el número de células tumorales entre cultivos homotípicos y heterotípicos es el mismo. Por tanto, los cultivos heterotípicos tienen un número total de células mayor, ya que, además de las células tumorales, se cultivan fibroblastos.

#### 1.1. Determinación de la capacidad metastásica mediante ensayos funcionales

En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de proliferación *in vitro* mediante la detección de la actividad luciferasa para estudiar el ritmo de crecimiento de cada línea tumoral en presencia de la línea vCAF<sup>mCherry</sup>. Además, se utilizaron dos ratios diferentes de fibroblasto y célula tumoral (1:5 y 1:2) en los cultivos heterotípicos con el objetivo de estudiar si la proporción de fibroblastos presentes pudiese afectar al crecimiento de las células tumorales.

Los resultados obtenidos muestran que la presencia de los vCAF<sup>mCherry</sup> en el cocultivo ralentiza el crecimiento celular de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> (**figura 9A**). Este efecto fue significativo tras 72h en cultivo, donde se observa que la proliferación de la línea celular MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en monocultivo es significativamente mayor que la del cocultivo en proporción 1:2 (cambio relativo:  $6.9 \pm 2.3$  vs.  $3.8 \pm 0.8$ ;  $p < 0.05$ ). Por otro lado, la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> muestra una mayor proliferación en presencia de estos fibroblastos (**figura 9B**), siendo significativamente mayor en el cocultivo en proporción 1:2 que en el monocultivo a las 24h (cambio relativo:  $5.5 \pm 1.3$  vs.  $2.2 \pm 0.3$ ) y 48h (cambio relativo:  $6.9 \pm 2.1$  vs.  $4.4 \pm 0.8$ ). Además, las diferencias de crecimiento mostradas sugieren que el efecto de los vCAF<sup>mCherry</sup> es ratio-dependiente, es decir, a mayor cantidad de vCAF<sup>mCherry</sup> presentes en el cocultivo, mayor

es su efecto sobre las líneas tumorales. De este modo, las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup> muestran una menor y una mayor proliferación, respectivamente, en los cocultivos de ratio 1:2 (fibroblasto: célula tumoral) comparados con los cocultivos de ratio 1:5 (fibroblasto: célula tumoral).

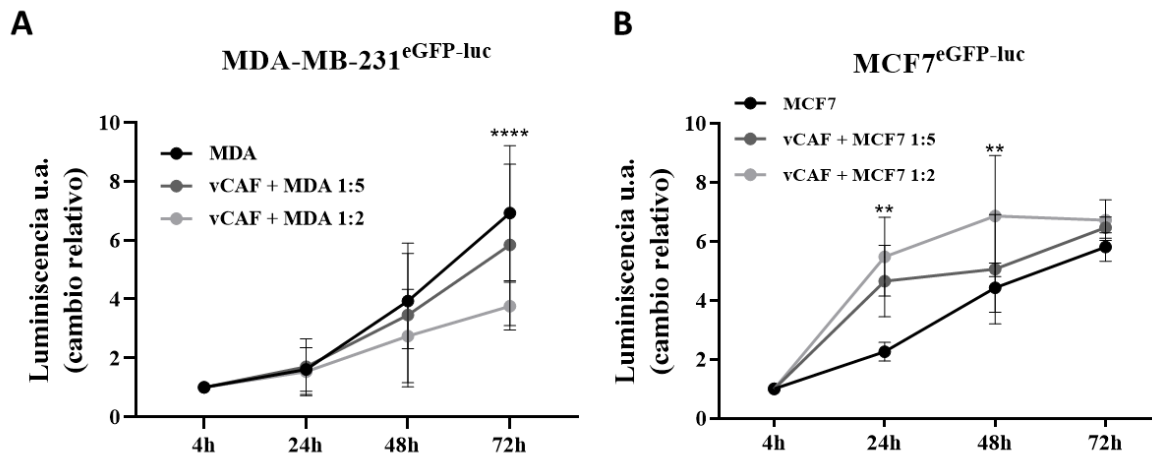


Figura 9. Cambios en la proliferación *in vitro* de líneas celulares de cáncer de mama en cultivos homotípicos y heterotípicos de 4 a 72 horas. A. Proliferación de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en monocultivo (negro) y en cocultivo con dos ratios distintos de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> (grises). N=3. B. Proliferación de la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en monocultivo (negro) y en cocultivo con dos ratios distintos de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> (grises). N=1. \*\* p < 0.01, \*\*\*\* p < 0.0001.

Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos de cierre de herida para estudiar la migración e interacción celular de las líneas tumorales junto a los vCAF<sup>mCherry</sup>. Debido a los diferentes ritmos de proliferación celular de las líneas tumorales, se tomaron medidas de 0 a 26 horas para MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y de 0 a 48 horas para MCF7<sup>eGFP-luc</sup>.

Se observa una ralentización en el cierre de la herida en los cocultivos de MDA-MB-231<sup>eGFP</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> respecto a los cultivos homotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP</sup> (**figura 10A**). Esta diferencia es significativa a las 20h, cuando el porcentaje de cierre de herida es de  $57.3 \pm 11.6\%$  en los cocultivos de ratio 1:5 y de  $75.7 \pm 7.6\%$  en los monocultivos, y a 26h, con un porcentaje de  $73 \pm 11.3\%$  en los cocultivos de ratio 1:5 y de  $98.1 \pm 8.8\%$  en los monocultivos. Asimismo, los cultivos heterotípicos de MCF7<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> muestran un mayor cierre de herida que los monocultivos de MCF7<sup>eGFP-luc</sup>, siendo de  $16.1 \pm 6.5\%$  en los monocultivos y de  $30.7 \pm 15.2\%$  en los cocultivos de ratio 1:5 a las 24h (**figura 10B**). Estas diferencias se mantienen a las 48h, durante las que se observa un porcentaje de  $34.2 \pm 8.6$  en los monocultivos y de  $48.3 \pm 15.6$  en los cocultivos de ratio 1:5. Podemos ver una coherencia entre estos resultados con lo mostrado en la **figura 9** en cuanto a un efecto de la presencia de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> sobre las dos líneas tumorales, ya que de nuevo hay un efecto sobre las líneas MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup>,

aunque en estos ensayos no se observaron diferencias de comportamiento de las líneas tumorales dependientes de la proporción de vCAF<sup>mCherry</sup> presentes.

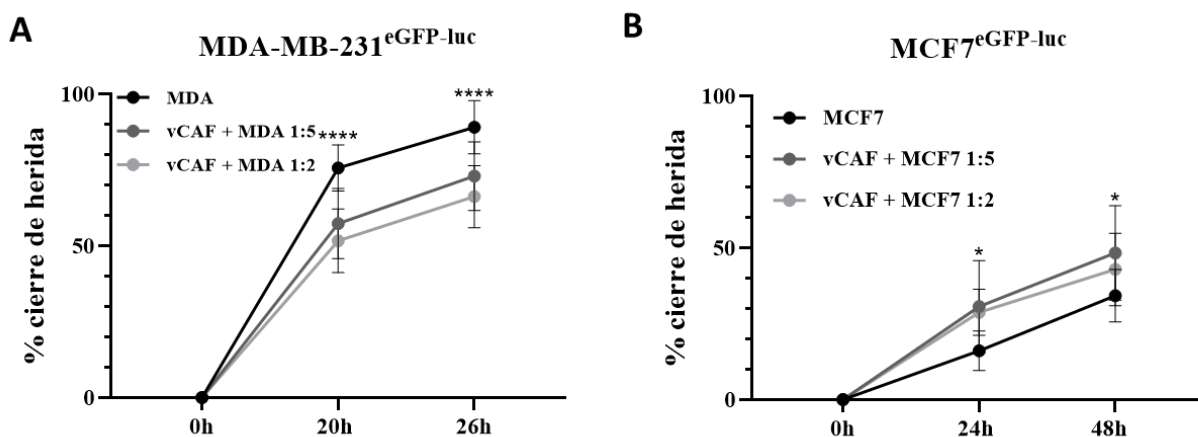


Figura 10. Porcentaje de cierre de herida de líneas celulares de cáncer de mama en cultivos homotípicos y heterotípicos. A. Porcentaje de herida cerrada por la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en condiciones de cultivo homotípico (negro) y en cocultivo con dos ratios distintos de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> (grises). N=5. B. Porcentaje de herida cerrada por la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en condiciones de cultivo homogéneo (negro) y cocultivo con la línea vCAF<sup>mCherry</sup> en dos ratios distintos (grises). N=2. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Por otro lado, se realizaron experimentos de formación de colonias en agar blando para estudiar el crecimiento independiente de anclaje de clústeres homotípicos formados por células tumorales y clústeres heterotípicos formados por células tumorales y fibroblastos. Los clústeres fueron generados a partir de cocultivos de las células tumorales y fibroblastos en placas adherentes durante 24 horas y posterior disociación con tripsina al 0,05%, lo que permite la generación de agregados celulares en suspensión (la generación de los clústeres se explica en la sección 1.2 de Materiales y Métodos). En estos experimentos se utilizaron cocultivos con una ratio 1:2 (fibroblasto: célula tumoral) para los clústeres heterotípicos y se evaluó tanto el número de colonias formadas como el diámetro de dichas colonias.

En el caso de los ensayos con las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, se vio cómo el número de colonias generado por los clústeres heterotípicos ( $38.3 \pm 22.2$ ) es similar al número de colonias generado por los clústeres homotípicos ( $32.6 \pm 17.1$ ) (figura 11A). Sin embargo, el diámetro de las colonias es significativamente menor en presencia de los fibroblastos ( $105.84 \pm 28.75 \mu\text{m}$  vs.  $99.39 \pm 27.15 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.01$ ) (figura 11B). En los ensayos con las células MCF7<sup>eGFP-luc</sup>, se pudo apreciar una tendencia hacia un aumento en el número de colonias generadas en presencia de fibroblastos respecto a los clústeres homotípicos ( $41.3 \pm 24.1$  vs.  $20.6 \pm 6.1$ ;  $p = 0.058$ ) (figura 11C), aunque la presencia de fibroblastos no afectó significativamente al diámetro de las colonias ( $261.71 \pm 107.59 \mu\text{m}$  vs.  $256.36 \pm 115.40 \mu\text{m}$ ) (figura 11D).

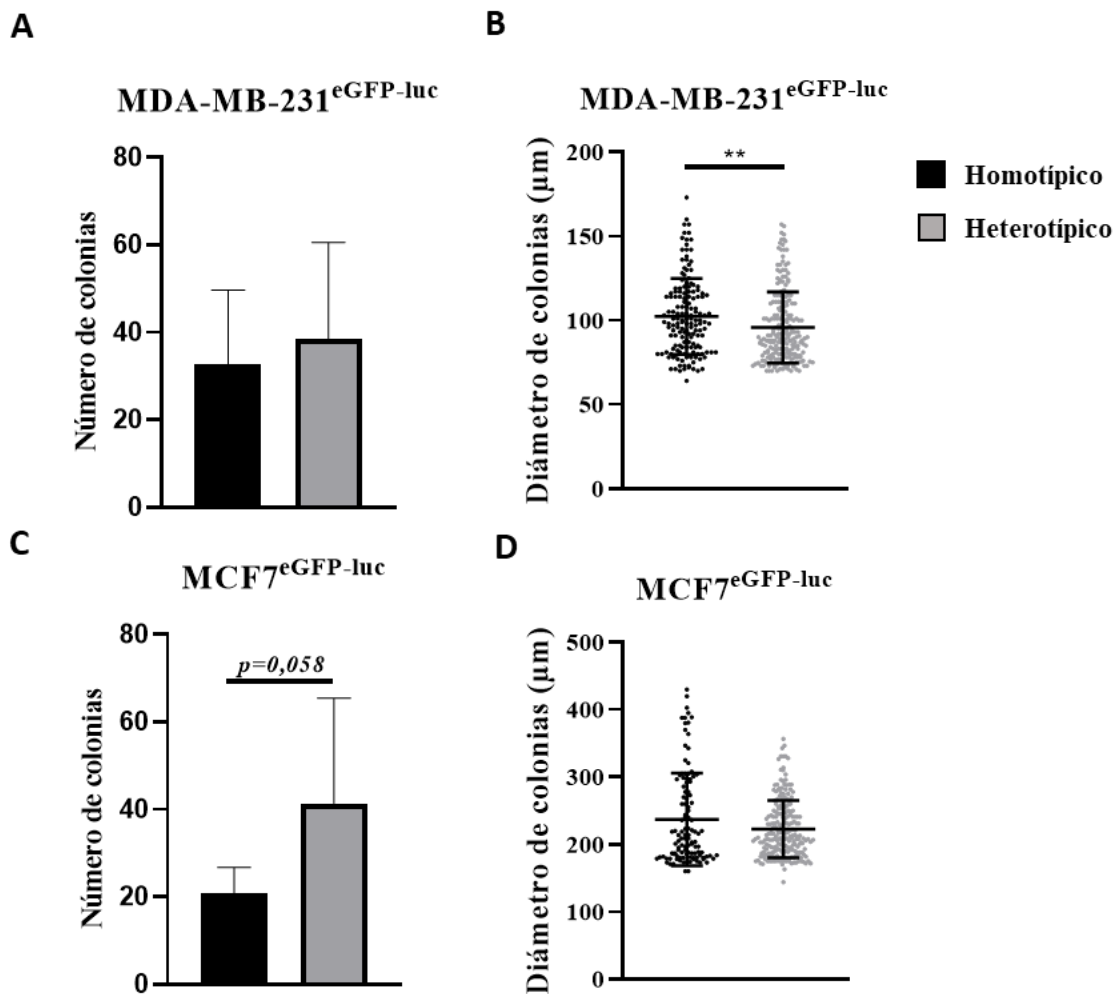


Figura 11. Capacidad de formación de colonias en agar blando de clústeres homotípicos y heterotípicos de las líneas MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup> con la línea de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>. A. Número de colonias generadas por los clústeres heterotípicos de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> con vCAF<sup>mCherry</sup> (gris) y por los clústeres homotípicos (negro). N=3. B. Diámetro de las colonias formadas por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> como clústeres homotípicos (negro) y heterotípicos con vCAF<sup>mCherry</sup> (gris). N=3. C. Número de colonias generadas por los clústeres heterotípicos de la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> con vCAF<sup>mCherry</sup> (gris) y por los clústeres homotípicos (negro). N=3. D. Diámetro de las colonias formadas por la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> como clústeres homotípicos (negro) y heterotípicos con vCAF<sup>mCherry</sup> (gris). N=3.  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Por último, se llevaron a cabo ensayos de migración en insertos Transwell® de 8 µm de tamaño de poro, en los que se pudo estudiar la deformabilidad y migración celular de los clústeres homotípicos y los clústeres heterotípicos. Estos experimentos se llevaron a cabo con cocultivos de ratio 1:2 (fibroblasto: célula tumoral) para los clústeres heterotípicos.

La presencia de los fibroblastos en los clústeres heterotípicos favoreció la migración en ambas líneas tumorales. Los datos se presentan como el cambio en el número de células migradas de los cultivos heterotípicos respecto a los cultivos homotípicos (MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> =  $1 \pm 0.42$  vs.  $8.04 \pm 6.91$ ; MCF7<sup>eGFP-luc</sup> =  $1 \pm 0.23$  vs.  $16.26 \pm 3.21$ ) (figura 12).

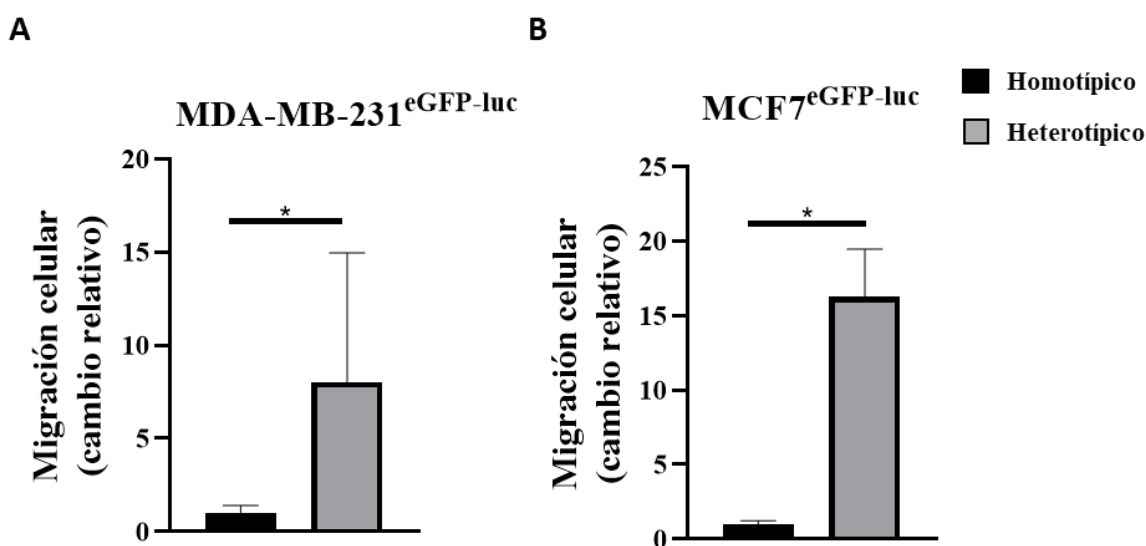


Figura 12. Migración de las líneas tumorales de cáncer de mama en cultivos homotípicos y heterotípicos con la línea vCAF<sup>mCherry</sup>. A. Cambio relativo en la migración de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en condiciones de cocultivo con la línea vCAF<sup>mCherry</sup> (gris) respecto al monocultivo (negro). N=3. B. Cambio en la migración de la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en condiciones de cocultivo con la línea vCAF<sup>mCherry</sup> (gris) respecto al monocultivo (negro). N=2. \* p < 0.05.

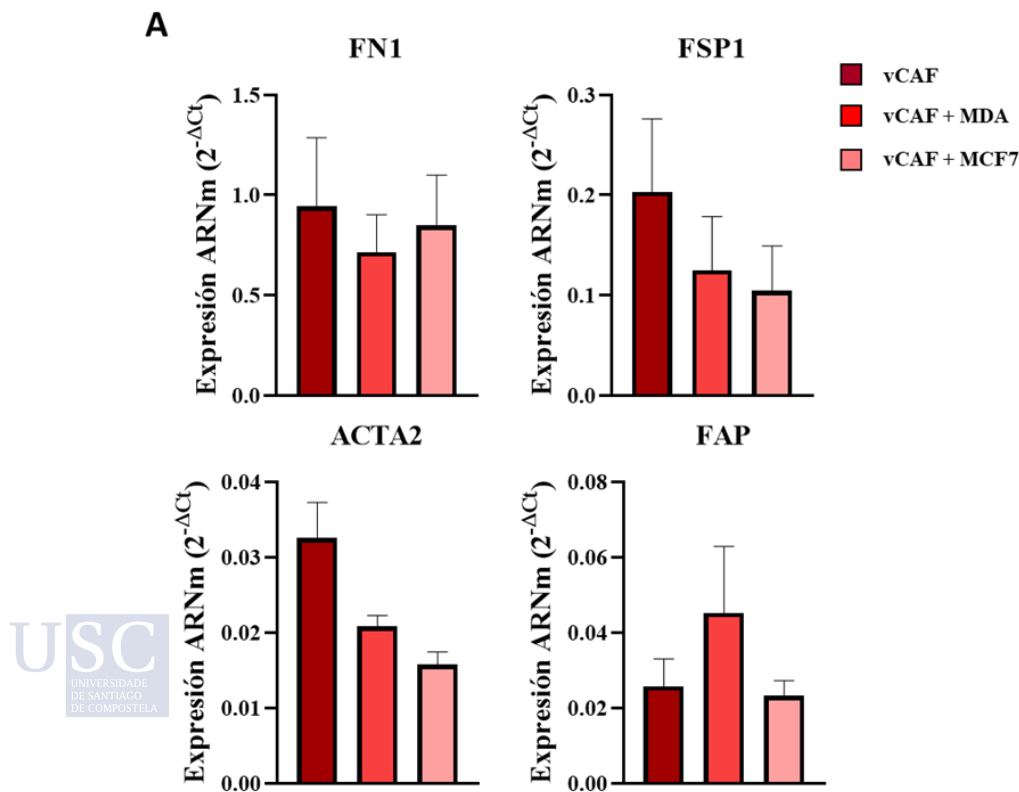
En conjunto, estos experimentos *in vitro*, que evalúan características funcionales de las células tumorales asociadas con el proceso de metástasis, nos permiten estudiar el efecto de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> sobre dos líneas tumorales fenotípicamente diferentes. Como conclusión, podemos afirmar que el efecto de esta línea de fibroblastos asociados a cáncer es diferente según el fenotipo de la línea tumoral con la que interacciona. Así, la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> aumenta su proliferación, capacidad de migración y de formación de colonias cuando son cocultivadas con vCAF<sup>mCherry</sup>, indicando una posible cooperación entre los fibroblastos y las células tumorales de fenotipo epitelial. Por otro lado, la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> disminuye su proliferación y capacidad de migración cuando los vCAF<sup>mCherry</sup> están presentes en el cocultivo, indicando una hipotética competencia entre ambas líneas celulares posiblemente debido a los rasgos mesenquimales de la línea tumoral.

## 1.2. Caracterización molecular de las interacciones paracrinas entre líneas tumorales y la línea vCAF<sup>mCherry</sup>

Con el objetivo de entender el efecto diferencial que ejerce la línea vCAF<sup>mCherry</sup> sobre las dos líneas tumorales utilizadas, MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup>, se estudió la comunicación intercelular a través de la interacción paracrina entre fibroblastos y células tumorales y su efecto sobre la expresión de genes asociados a la activación de los fibroblastos, a la transición epitelio-mesénquima (TEM) y la interacción entre CAF y célula tumoral. Para ello, se establecieron cocultivos durante cinco días separados físicamente por una membrana de modo que ambos tipos celulares no están en contacto, y se extrajo el material genético de las poblaciones celulares por separado para analizar la expresión génica. Se estudiaron genes marcadores de activación de fibroblastos, como FN1, FSP1, ACTA2 y FAP, los cuales codifican para la fibronectina 1, proteína específica de fibroblasto 1,  $\alpha$ -actina de músculo liso y proteína de activación de fibroblastos, respectivamente. Asimismo, se analizó la expresión de otros genes de interés para estas líneas celulares, como CDH1, CDH2, MKI67, VIM, y CD44 los cuales codifican para e-cadherina, n-cadherina, marcador de proliferación Ki67, vimentina, y la glicoproteína de superficie celular CD44, respectivamente.

Los análisis de expresión génica mediante RT-qPCR realizados en la línea de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> muestran que no hay diferencias significativas en la expresión de los marcadores de activación de los fibroblastos entre las células control (vCAF<sup>mCherry</sup> en monocultivo) y las células en cocultivo con las líneas tumorales MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> o MCF7<sup>eGFP-luc</sup> (**figura 13A**). Sin embargo, podemos observar un ligero descenso en la expresión de FSP1 y ACTA2 cuando los fibroblastos están en cocultivo, indicando que puede haber un efecto de unas líneas celulares sobre otras a través de factores secretados.

Por otro lado, se puede ver una tendencia a una mayor expresión de FAP en vCAF<sup>mCherry</sup> cuando están en cocultivo con la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>. FAP codifica para la proteína de activación de fibroblastos, por lo que este ligero aumento en la expresión de este gen podría indicar cierto grado de activación de vCAF<sup>mCherry</sup> debido a factores secretados por la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> (**figura 13A**). Respecto a los genes CDH1, CDH2 y VIM, los análisis muestran que la línea vCAF<sup>mCherry</sup> no expresa CDH1, debido a que es una proteína expresada por las células epiteliales, mientras que se observa un ligero descenso en la expresión de CDH2 y VIM en cocultivo con las líneas tumorales, especialmente con MCF7<sup>eGFP-luc</sup>. Sin embargo, dichos efectos no son estadísticamente significativos. Asimismo, el análisis del gen MKI67, asociado con proliferación celular, también muestra una ligera disminución en la expresión en presencia de las células tumorales. Finalmente, se puede observar un ligero descenso de la expresión de CD44 en presencia de la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> (**figura 13B**). En conjunto, estos resultados muestran que las interacciones paracrinas entre las líneas tumorales y vCAF<sup>mCherry</sup> a través de factores secretados son suficientes para alterar levemente la expresión de diversos genes. Podemos observar, además, que estas líneas tumorales no ejercen un efecto positivo sobre la expresión de genes asociados a CAF.



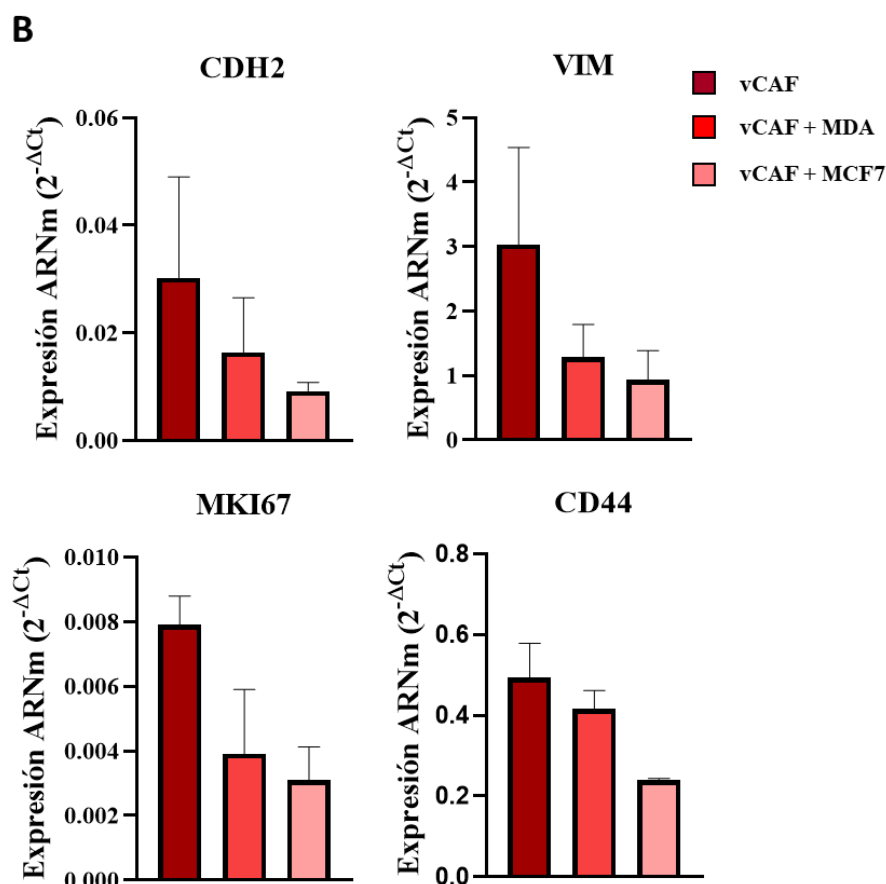


Figura 13. Expresión de ARN mensajero de los marcadores de activación de fibroblastos (FN1, FSP1, ACTA2 y FAP) y los genes CDH2, VIM, MKI67 y CD44 en la línea vCAF<sup>mCherry</sup> en cocultivos de interacción paracrina con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup>. Los niveles de expresión se muestran como 2 elevado a la potencia negativa del  $\Delta C_t$ . N=3.

Respecto a los análisis de expresión génica realizados en las líneas celulares tumorales, se observa que la expresión del gen CDH1 no se detecta en las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, las cuales presentan características de TEM, y no se vio afectada en las células MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en presencia de las células vCAF<sup>mCherry</sup>. Del mismo modo, la expresión de CDH2 y VIM no se detecta en la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en monocultivo debido a su fenotipo epitelial, ni en el cocultivo con los fibroblastos, indicando que la línea vCAF<sup>mCherry</sup> no produce una inducción de la TEM en la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> a nivel de expresión genética. La expresión de CDH2 tampoco se detecta en la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> pese a sus rasgos mesenquimales, y tampoco se detecta en el cocultivo (**figura 14**). Los niveles de expresión de vimentina en MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> no se vieron modificados por la presencia de los vCAF<sup>mCherry</sup> en el cultivo. Estos son genes expresados generalmente en células mesenquimales, que codifican el primero para n-cadherina (proteína de adhesión celular detectada en células mesenquimales) y el segundo para vimentina (marcador de TEM). Asimismo, MKI67 es detectado en mayor medida en la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> que en la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup>, lo cual coincide con el mayor ritmo de crecimiento celular de la primera línea. En cambio, sus niveles de expresión no parecen estar significativamente afectados por la presencia de los fibroblastos en el cultivo, pese a que se observaron diferencias en la proliferación de estas líneas celulares en presencia o ausencia de vCAF<sup>mCherry</sup> (**figura 14**). Por último, la molécula de adhesión y marcador de “stemness” CD44,

recientemente implicado en la clusterización heterotípica de las CTCs y los CAF, es detectada a mayores niveles en la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> comparado con la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup>. Sin embargo, no se observaron diferencias de expresión de este gen entre cocultivos y monocultivos. En conjunto, estos resultados muestran que los factores secretados por la línea vCAF<sup>FmCherry</sup> no ejercen un claro efecto sobre la expresión de genes asociados a TEM y clusterización celular.

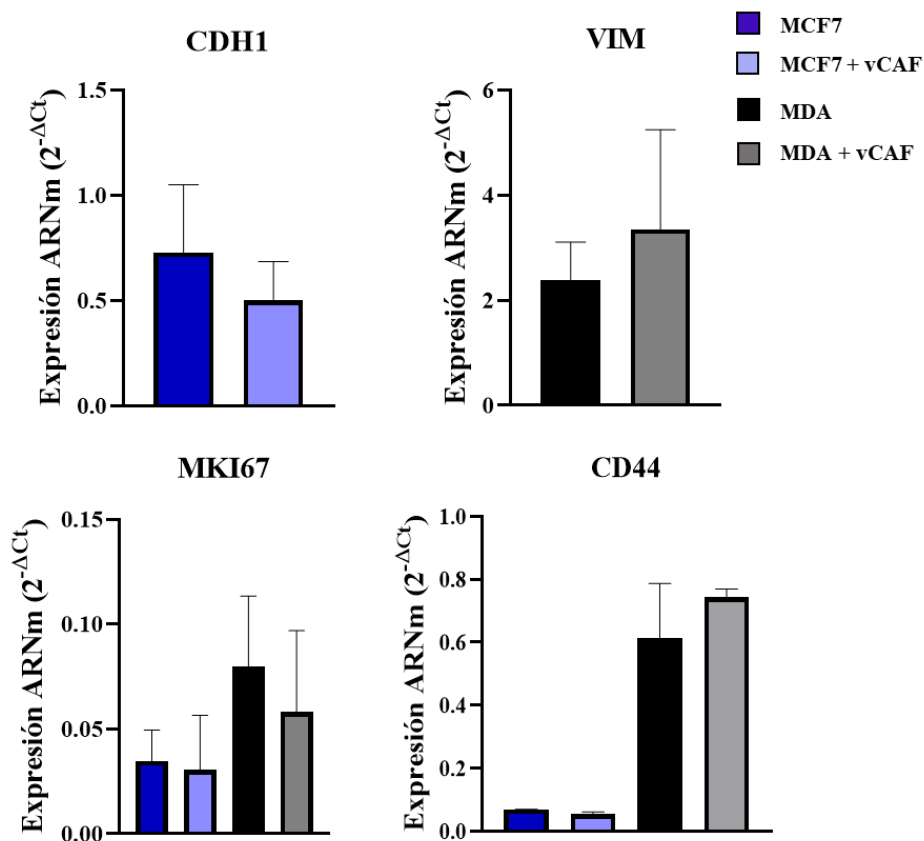


Figura 14. Expresión de ARN mensajero de los genes CDH1, VIM, MKI67 y CD44 en las líneas celulares MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en base a interacciones paracrinas en cocultivo con vCAF<sup>FmCherry</sup>. Las líneas celulares que no están mostradas para algún gen implica que esas líneas no expresan dicho gen. Los niveles de expresión se muestran como 2 elevado a la potencia negativa del  $\Delta Ct$ . N=3.

## 2. ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE vCAF<sup>FmCherry</sup> A LA DISEMINACIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA EN MODELOS *IN VIVO*

### 2.1. Obtención de clústeres de líneas celulares y optimización del xenotrasplante en pez cebra

Con el objetivo de estudiar la contribución de los fibroblastos asociados a cáncer a la capacidad metastásica de los clústeres de CTC nos planteamos, por un lado, la generación de clústeres a partir de líneas celulares *in vitro* y, por otro, el desarrollo de xenotrasplantes en el modelo de pez cebra para estudiar el efecto de los fibroblastos en la diseminación de las células tumorales.

Previo a la realización de los xenotrasplantes, se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular para la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup> a dos temperaturas distintas: 37° C (temperatura de crecimiento normal de las líneas tumorales humanas) y

34° C (temperatura consenso establecida para el mantenimiento de los embriones de pez cebra xenotrasplantados<sup>194</sup>) con el objetivo de estudiar la viabilidad celular dentro del modelo experimental.

Los resultados muestran que el crecimiento a lo largo del tiempo de ambas líneas celulares se ve ralentizado por la menor temperatura, pero la proliferación no es detenida, demostrando que ambas líneas celulares pueden ser utilizadas para el xenotrasplante en pez cebra (**figura 15**).

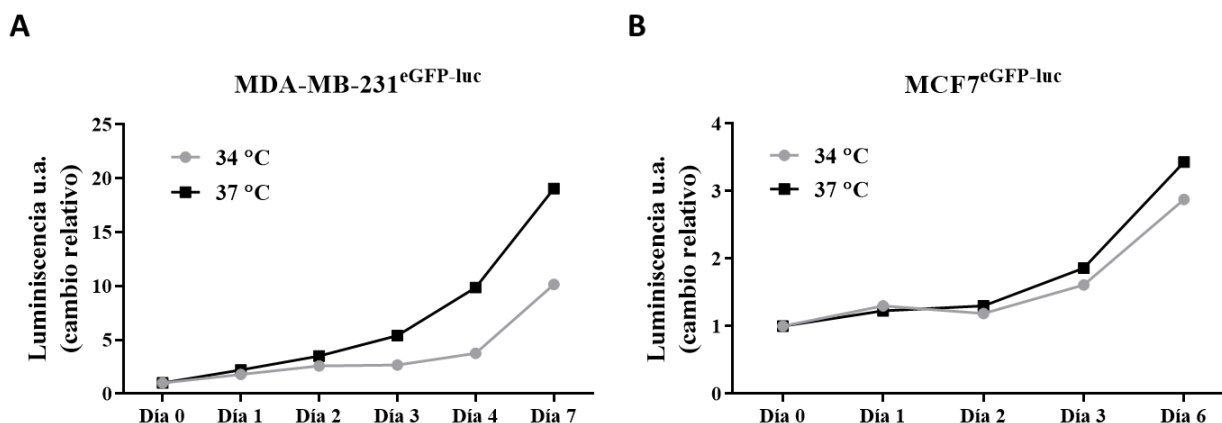


Figura 15. Cambios en la bioluminiscencia producida por las líneas MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup> a lo largo del tiempo, a 34° C y 37° C. N=1.

Posteriormente, se llevó a cabo la optimización de los xenotrasplantes en pez cebra mediante la comparación de dos protocolos diferentes de generación de clústeres de células tumorales y de microinyección. Con el fin de determinar la validez experimental de nuestros modelos *in vitro* de clústeres de células tumorales (clústeres de CTC) en ambos protocolos, se comparó su comportamiento respecto al de células individuales, representando así a las CTC individuales, las cuales suponen la mayor proporción de las CTC observadas en pacientes con cáncer. Para esta optimización se utilizó la línea celular MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, ya que las células MCF7<sup>eGFP-luc</sup> presentan una baja capacidad metastásica<sup>192</sup>, hecho comprobado experimentalmente en nuestro laboratorio<sup>193</sup>.

En el primer protocolo (A), las células son cultivadas en placas de baja adherencia durante 24 horas para favorecer la agregación celular y, posteriormente, son disgregadas mecánicamente para obtener una población individualizada y otra población agregada (**figura 16A**). En el segundo protocolo (B), las líneas celulares son cultivadas en placas adherentes durante 24 horas y, posteriormente, son disociadas con tripsina a diferentes concentraciones: 0,25% para células individuales y 0,05% para clústeres (**figura 16B**). Las poblaciones obtenidas con ambos protocolos se inyectaron en embriones de pez cebra de 48 horas de vida en el espacio perivitelino, cerca de la convergencia del ducto de Cuvier con el espacio pericárdico (a partir de ahora, a esta zona nos referiremos como ducto de Cuvier; **figura 16C**), lo que nos permite estudiar la migración activa de las células xenotrasplantadas hacia el sistema circulatorio. Con el fin de optimizar las condiciones de inyección de las células en cuanto a número celular e integridad de los clústeres, se probaron dos diámetros de apertura distintos en las agujas. En ambos casos, nos aseguramos de que la inyección inicial no provocaba una salida inmediata de células a la circulación del embrión, ya que se busca estudiar una diseminación activa. Aquellos

peces que mostraron diseminación celular tras la inyección fueron descartados de los análisis posteriores.

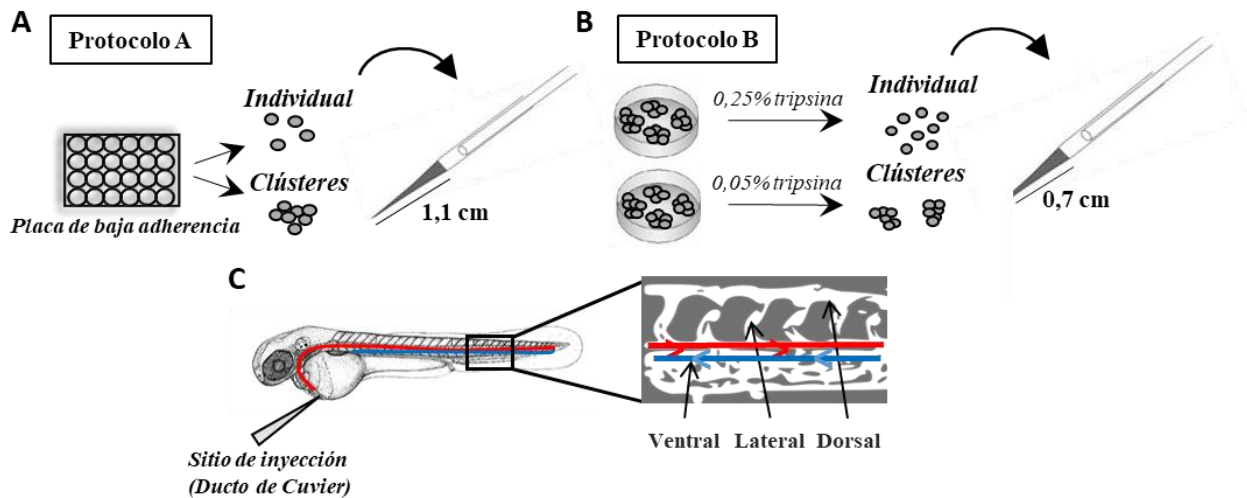


Figura 16. Esquema de la generación de clústeres y la microinyección en pez cebra. A. Protocolo de generación de poblaciones individuales y clústeres mediante el cultivo de líneas celulares en placas de baja adherencia y su posterior disgregación. B. Protocolo de generación de poblaciones individuales y clústeres mediante el cultivo de líneas celulares en placas de adherencia y su posterior disociación con distintas concentraciones de tripsina. C. Ilustración esquemática del embrión de pez cebra a las 48 horas de vida, con la arteria caudal marcada en rojo y la vena caudal marcada en azul. Se marcan las áreas ventral, lateral y dorsal donde las células xenotrasplantadas pueden encontrarse diseminadas.

La idoneidad de los protocolos se evaluó en base a la capacidad de diseminación de las células tumorales a partir del tumor primario y su localización en las distintas localizaciones vasculares de la región caudal del pez, estando estas divididas entre ventral (incluye la vena caudal, la vena posterior cardinal y la arteria dorsal), dorsal (incluye el vaso anastomótico longitudinal dorsal) y lateral (incluye los vasos intersegmentales que conectan las dos regiones anteriores). La cuantificación del volumen de células diseminadas se realizó en base al área ocupada por la fluorescencia de las células tumorales. Utilizando el protocolo A, los porcentajes de peces con diseminación en las zonas dorsal y lateral son pequeños y similares entre ambas poblaciones celulares ( $20 \pm 4$  % dorsal y  $10 \pm 9$  % lateral para células individuales y  $21 \pm 9$  % dorsal y  $5 \pm 6$  % lateral para los clústeres) (figura 17A). Sin embargo, con el protocolo B se observa una mayor diseminación de ambas poblaciones y una tendencia de las células individuales a diseminarse más hacia estas dos zonas ( $63 \pm 16$  % y  $37 \pm 18$  % de diseminación dorsal para población individual y agregada, respectivamente;  $37 \pm 17$  % y  $15 \pm 13$  % de diseminación lateral para población individual y agregada, respectivamente) (figura 17C). Por otro lado, la diseminación en la zona ventral es prácticamente del 100% para ambas poblaciones y protocolos (figura 17B y D). Para llegar a las zonas dorsal y lateral, las células inyectadas deben entrar en los capilares que llegan a dichas áreas, los cuales son considerablemente más pequeños que la vena caudal y vena posterior cardinal, por lo que se espera que las células individuales tengan una ventaja respecto a los clústeres debido a su menor tamaño. Esta diferencia no

se ve reflejada en el protocolo A, pero sí en el B, demostrando que el segundo es más adecuado para generar poblaciones individuales y agregadas bien diferenciadas.

Las áreas tumorales representan la cantidad total de células diseminadas en la cola de cada pez, independientemente de la zona. La media de dichas áreas es muy similar entre ambas poblaciones en el protocolo A ( $2343 \pm 3068 \mu\text{m}^2$  para la población individual y  $2071 \pm 2464 \mu\text{m}^2$  para la población de clústeres) (**figura 17B**), pero aumenta considerablemente en el protocolo B y se puede observar una diferencia significativa entre la media de las áreas de los peces xenotrasplantados con la población individual ( $11545 \pm 11563 \mu\text{m}^2$ ) y la población de clústeres ( $6160 \pm 6013 \mu\text{m}^2$ ) (**figura 17D**). De nuevo, el protocolo B muestra unas diferencias entre ambas poblaciones celulares que no se pueden observar en el protocolo A, además de aumentar la diseminación celular a la cola en general.

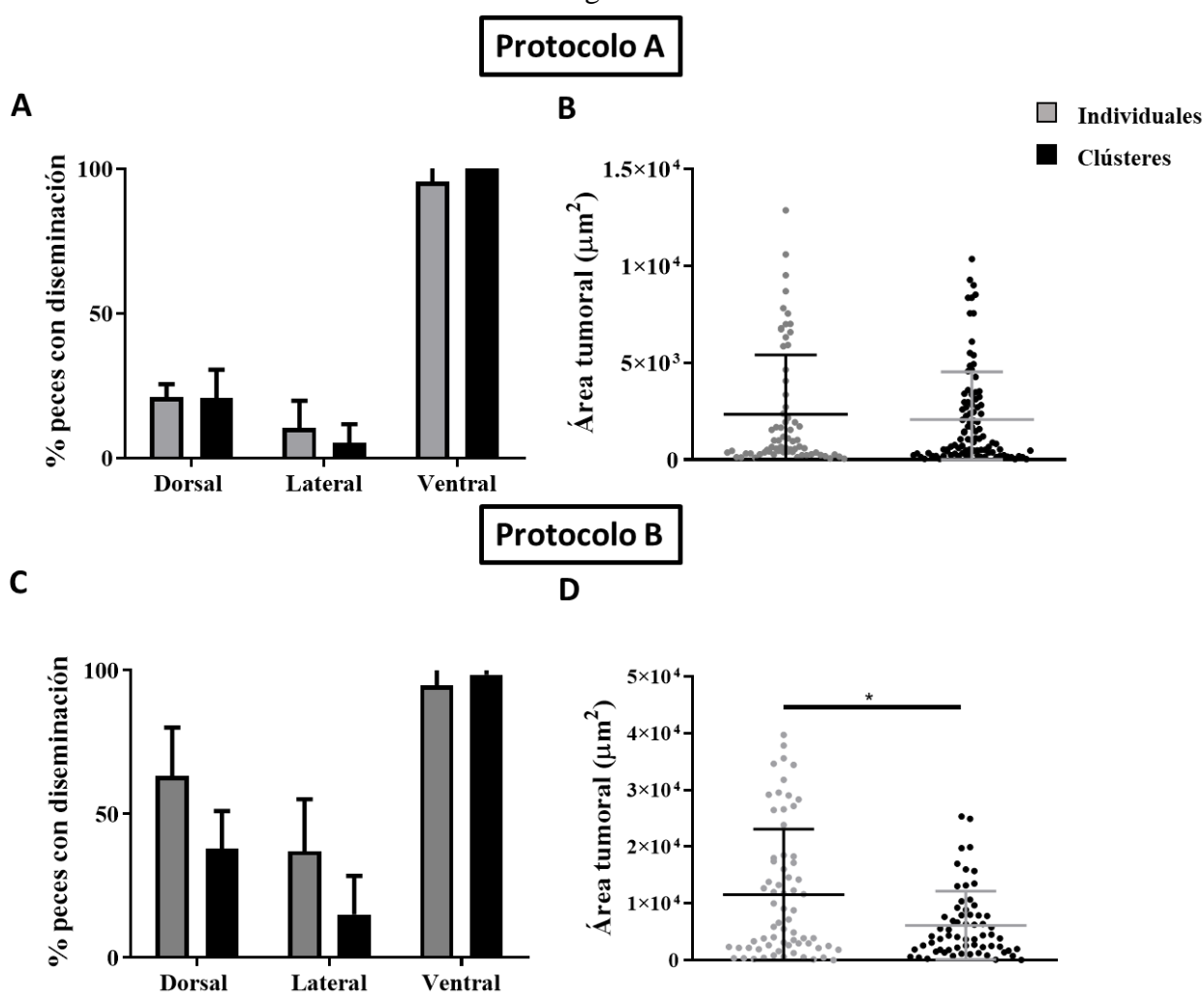


Figura 17. Xenotrasplantes en pez cebra de células individuales y clústeres de la línea celular MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, utilizando protocolos de generación de clústeres A (gráfica A y B) y B (gráfica C y D). A y C. Porcentaje de peces con diseminación celular de las poblaciones individuales y clústeres de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en las áreas dorsal, lateral y ventral de la cola del embrión. B y D. Área tumoral total de las células diseminadas a la cola 24 horas tras la inyección en peces xenotrasplantados con células individualizadas y clústeres de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>. N=3. \* p < 0.05.

El cultivo en adherencia de las células tumorales previo al xenotrasplante y la mayor abertura de las agujas, lo cual puede ayudar al mantenimiento de la estructura de los clústeres,

parecen ser los principales motivos que explican las diferencias observadas en diseminación del protocolo B respecto al A.

Dado estos resultados, consideramos que el protocolo B es más adecuado para la obtención de poblaciones de células individuales y clústeres bien diferenciadas, así como para la realización de los xenotrasplantes en embriones de pez cebra, por lo que se utilizó en los ensayos posteriores.

## **2.2. Diseminación y supervivencia de células tumorales y fibroblastos en xenotrasplantes con clústeres heterotípicos**

Nuestro objetivo es estudiar el efecto que tienen los fibroblastos asociados a cáncer sobre la capacidad de diseminación de los clústeres de dos líneas tumorales con capacidades metastásicas muy diferentes. Para ello, se generaron clústeres homotípicos y heterotípicos, y se xenotrasplantaron en el Ducto de Cuvier. Los clústeres heterotípicos fueron generados a partir de cocultivos previamente establecidos durante 24 horas entre fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> y células tumorales (en relación 1:2), un corto período de tiempo que permite la interacción tanto física como paracrina entre ambos tipos celulares previo al ensayo. Además, la corta duración del cocultivo evita una alteración de la proliferación celular en las líneas MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup>, las cuales ven su velocidad de crecimiento afectada por la presencia de vCAF<sup>mCherry</sup> a lo largo del tiempo, tal y como fue mostrado en la **figura 9**.

### **2.2.1. La interacción entre MCF7<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> en clústeres afecta a la supervivencia de las células tumorales**

A pesar de la limitada capacidad metastásica de esta línea tumoral en el pez cebra observada en nuestro trabajo previo<sup>193</sup>, nos planteamos determinar si los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> podrían favorecer la supervivencia y diseminación de los clústeres de células MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en circulación, y por lo tanto incrementar su capacidad metastásica.

En un primer análisis, se estudió el porcentaje de peces que muestran diseminación de células MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en la cola a las 24 y 72 horas post inyección (hpi), es decir, 24 y 72 horas tras el xenotrasplante de clústeres homotípicos y heterotípicos, a través de la detección de la fluorescencia producida por la proteína eGFP. La diseminación en la cola de las células MCF7<sup>eGFP-luc</sup> 24 horas después del xenotrasplante es baja, tanto para los xenotrasplantes homotípicos ( $30 \pm 11\%$ ) como heterotípicos ( $38 \pm 23\%$ ) (**figura 18**). El volumen de células diseminadas disminuye drásticamente a las 72 horas tras la inyección para ambos tipos de xenotrasplantes ( $3 \pm 6\%$  en clústeres homotípicos y  $9 \pm 12\%$  en clústeres heterotípicos). Estos datos, además de confirmar la escasa capacidad metastásica que caracteriza a esta línea celular, muestran una pobre supervivencia en la cola del embrión del pez cebra a lo largo del tiempo, indicando a su vez que la presencia de vCAF<sup>mCherry</sup> en los clústeres no incrementa la capacidad invasiva y de diseminación de las células tumorales.



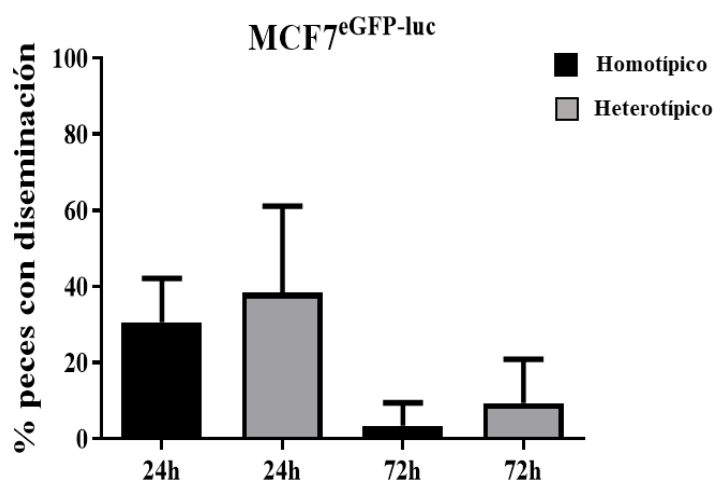


Figura 18. Diseminación de las células MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en embriones de peces cebra. Porcentaje de peces xenotrasplantados con clústeres homotípicos de la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> (negro) y heterotípicos de MCF7<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> (gris) con diseminación de células tumorales en la cola, a 24 y 72 horas post inyección (hpi). N=3.

Posiblemente, la baja capacidad metastásica y la gran mortalidad celular mostrada por la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en la cola del embrión del pez cebrá puede enmascarar cualquier efecto potenciador que los vCAF<sup>mCherry</sup> pudieran tener en la diseminación o supervivencia de las células tumorales en la cola, como observamos en los ensayos funcionales *in vitro*. Por este motivo, nos propusimos estudiar el efecto de los fibroblastos en la supervivencia de la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en el propio sitio de inyección. Tal y como puede verse en las imágenes representativas mostradas en la **figura 19A**, existe una reducción drástica en la presencia de las células MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en el lugar de inyección entre el tiempo inicial y las 24 horas, independiente de su inyección homotípica o heterotípica. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia de las células MCF7<sup>eGFP-luc</sup> 24 horas tras la inyección es significativamente mayor en aquellos peces xenotrasplantados con clústeres heterotípicos comparados con aquellos de clústeres homotípicos ( $1.1 \times 10^6 \pm 1.1 \times 10^6$  u.a. vs.  $7.3 \times 10^5 \pm 8.4 \times 10^5$  u.a.;  $p < 0.01$ ), indicando un posible efecto positivo de los fibroblastos sobre la supervivencia de las células tumorales en el sitio de inyección ya a las 24 horas tras el xenotrasplante (**figura 19B**). Asimismo, a 72 horas tras la inyección la fluorescencia fue significativamente mayor en el grupo de peces inyectados con clústeres heterotípicos comparada con los homotípicos ( $2.67 \times 10^5 \pm 5.11 \times 10^5$  u.a. vs.  $1.01 \times 10^5 \pm 2.26 \times 10^5$ , respectivamente;  $p < 0.05$ ). Sin embargo, la

fluorescencia disminuye significativamente a lo largo del tiempo para ambas poblaciones, demostrando la baja supervivencia de la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en el modelo el pez cebra.

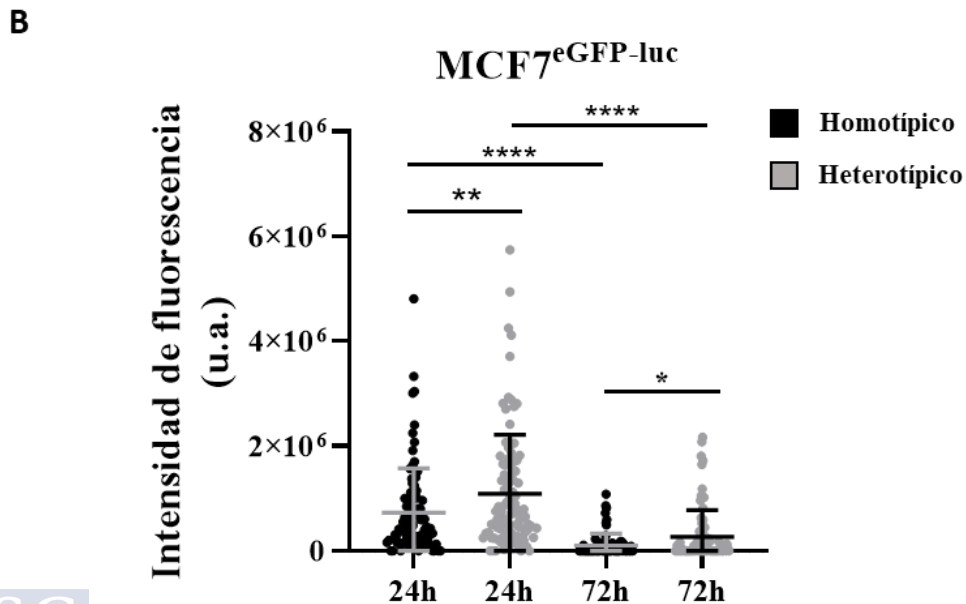
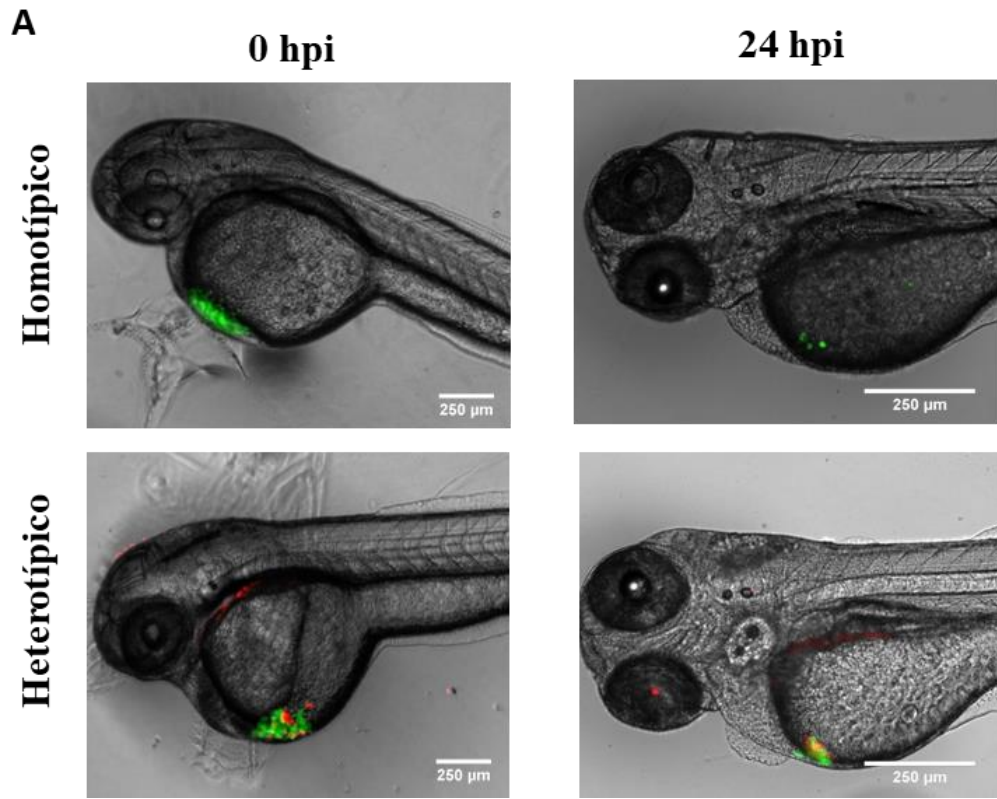


Figura 19 Efecto de los vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la supervivencia de la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en el Ducto de Cuvier de embriones de peces cebra xenotrasplantados. A. Imágenes representativas de los xenotrasplantes iniciales a 0 hpi y de las células supervivientes en el Ducto de Cuvier a las 24 hpi en embriones xenotrasplantados con MCF7<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup> junto a vCAF<sup>mCherry</sup>. B. Intensidad de fluorescencia de las células MCF7<sup>eGFP-luc</sup> de clústeres homotípicos y heterotípicos a las 24 y 72 horas tras el xenotrasplante. Cada punto representa un pez. N=3. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\*\* p < 0.0001.

### 2.2.2. La interacción entre MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> en clústeres afecta a la capacidad metastásica de las células tumorales

Dada la metastaticidad de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> 192, nos planteamos estudiar el efecto de los vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la diseminación de esta línea tumoral en el modelo del pez cebra. En primer lugar, estudiamos el efecto de los fibroblastos sobre la diseminación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> sin que haya habido una interacción física previa entre ambos tipos celulares, ni en cocultivo ni como parte de los clústeres. Para ello, se inyectaron suspensiones celulares homotípicas y heterotípicas, esta última obtenida mediante la combinación de ambas líneas celulares justo antes de la realización de los xenotrasplantes.

En estos experimentos se puede observar que aquellos peces xenotrasplantados con suspensiones homotípicas muestran un mayor número de células tumorales en la cola que los embriones xenotrasplantados con suspensiones heterotípicas a las 24 horas post-inyección, reflejado en los valores de cuantificación de la intensidad de fluorescencia ( $1.27 \times 10^6 \pm 1.14 \times 10^6$  u.a. vs.  $9.34 \times 10^5 \pm 1.08 \times 10^6$  u.a., respectivamente;  $p < 0.05$ ) (**figura 20**). Asimismo, la fluorescencia decae a las 72 horas en ambos grupos, pero esta sigue siendo mayor en el grupo homotípico respecto al heterotípico ( $6.31 \times 10^5 \pm 6.73 \times 10^5$  vs.  $4.90 \times 10^5 \pm 7.21 \times 10^5$ ;  $p < 0.05$ ).

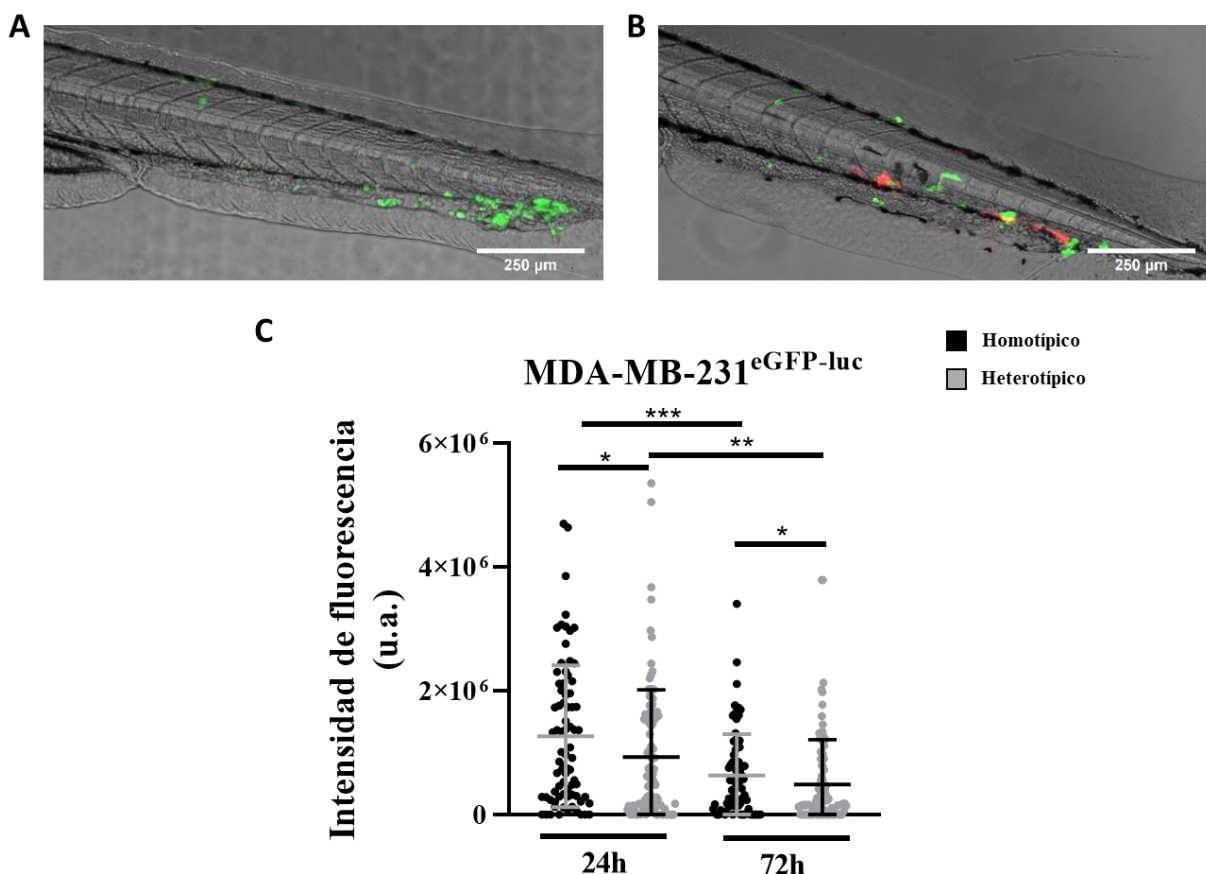


Figura 20. Efecto de los vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la diseminación de las MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en xenotrasplantes de suspensiones celulares homotípicas y heterotípicas, sin interacción previa de los fibroblastos con las células tumorales. A. Imagen representativa de la diseminación de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> a la cola del embrión 24 horas tras el xenotrasplante. B. Imagen representativa de la diseminación de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> a la cola del embrión 24 horas tras el xenotrasplante. C. Intensidad de fluorescencia verde detectada en las colas de embriones xenotrasplantados con suspensiones homotípicas y heterotípicas de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, a 24 y 72 horas tras el xenotrasplante. Cada punto representa un pez N=4. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Estos resultados indicarían que la presencia de los vCAF<sup>mCherry</sup> en el xenotrasplante parece afectar negativamente la capacidad de diseminación de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>.

Tras los resultados obtenidos, nos planteamos estudiar el efecto de la interacción física previa entre los vCAF<sup>mCherry</sup> y la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> sobre la diseminación tumoral, derivada del cocultivo y la formación de clústeres celulares (Protocolo B anteriormente descrito). Bajo estas condiciones, no se observan diferencias significativas entre ambas poblaciones en el total de células diseminadas, aunque se puede apreciar cierta tendencia a una mayor diseminación en los peces xenotrasplantados con clústeres homotípicos en base a los valores de fluorescencia ( $8 \times 10^5 \pm 7.56 \times 10^5$  vs.  $6.12 \times 10^5 \pm 5.17 \times 10^5$ ;  $p > 0.05$ ). Sin embargo, en este caso la intensidad de fluorescencia se mantiene en el tiempo tanto para el grupo de clústeres homotípico como para el de clústeres heterotípicos ( $8.4 \times 10^5 \pm 8.13 \times 10^5$  vs.  $6.71 \times 10^5 \pm 6.89 \times 10^5$ ;  $p > 0.05$ ) (figura 21).

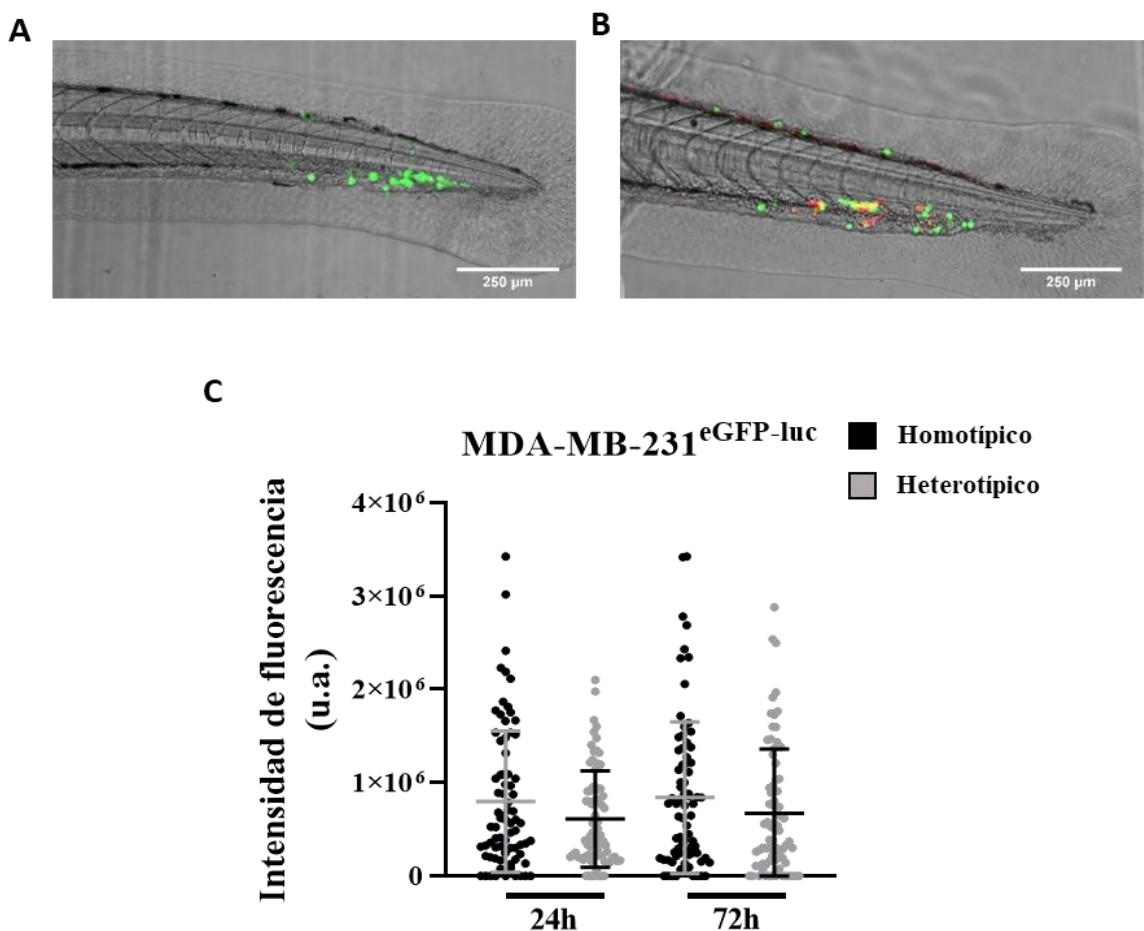


Figura 21. Efecto de los vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la diseminación de las MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en xenotrasplantes de clústeres homotípicos y heterotípicos, con una interacción previa de 24 horas de las células tumorales y los fibroblastos. A. Imagen representativa de la diseminación de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> a la cola del embrión 24 horas tras el xenotrasplante con clústeres homotípicos. B. Imagen representativa de la diseminación de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> a la cola del embrión 24 horas tras el xenotrasplante con clústeres heterotípicos. C. Intensidad de fluorescencia verde detectada en las colas de embriones xenotrasplantados con clústeres homotípicos (negro) y heterotípicos (gris) de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, a 24 y 72 horas tras el xenotrasplante. Cada punto representa un pez. N=3.

Por lo tanto, la interacción previa en el cultivo y en los agregados celulares de las células tumorales con los fibroblastos no parece afectar a la diseminación de las MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, aunque se aprecia una tendencia a mayor diseminación a 24 horas en los peces xenotrasplantados con clústeres homotípicos ( $p=0.24$ ), de un modo similar a cómo sucedía en la **figura 20**. No obstante, la principal diferencia observada entre los xenotrasplantes realizados con suspensiones celulares (**figura 20**) y aquellos realizados con clústeres (**figura 21**) es que en estos últimos no se observa una disminución de la fluorescencia a lo largo del tiempo, indicando una mayor supervivencia de las células tumorales en los clústeres de CTC. Además, esa supervivencia celular no parece estar afectada por los vCAF<sup>mCherry</sup>. Asimismo, estos resultados demuestran que la interacción física de las células tumorales en los clústeres favorece su supervivencia, como demostramos en un trabajo previo<sup>193</sup>.

Según trabajos anteriores realizados en el laboratorio<sup>193</sup>, existen diferencias en la supervivencia a lo largo del tiempo de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> xenotrasplantadas según se inyecten como células individualizadas y clústeres (**figura 22**). En estos experimentos se pudo observar un claro descenso en el número de células diseminadas de la población individual de 24 a 72 horas, mientras que en la población de clústeres permanece estable. Por tanto, pese a que la diseminación inicial de las células individualizadas es mayor que la de los clústeres, la supervivencia de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en el embrión es mayor en aquellos xenotrasplantes realizados con clústeres de esta línea tumoral (**figura 22**).

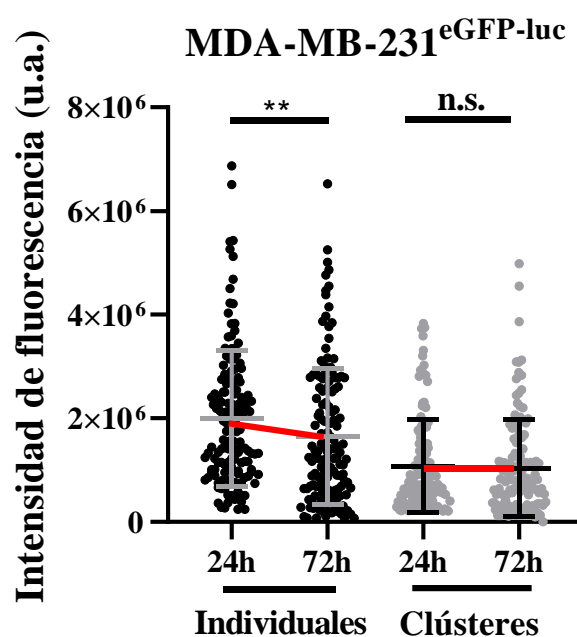
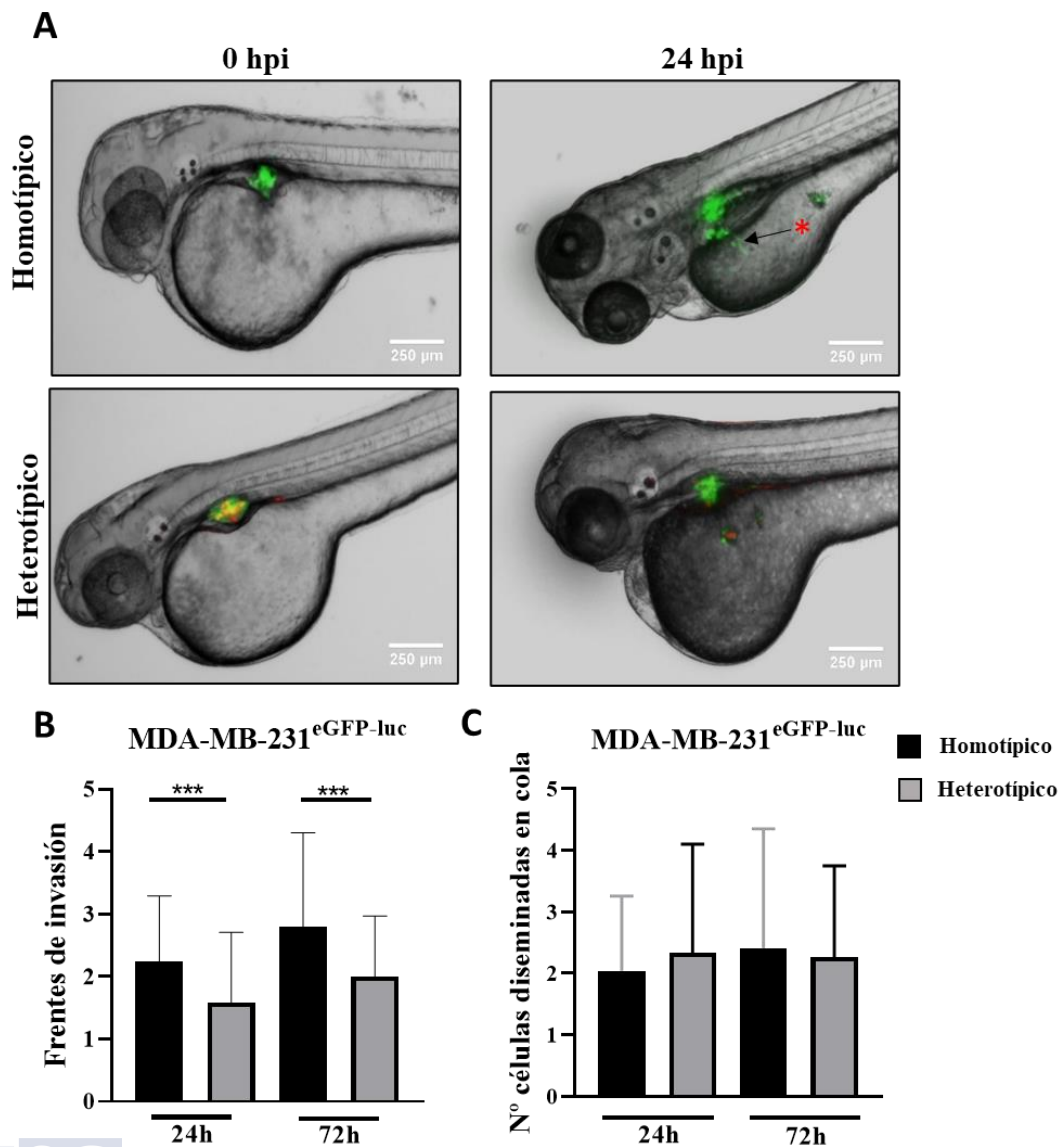


Figura 22. Diseminación y supervivencia de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en las colas de embriones xenotrasplantados con células individualizadas (negro) y clústeres (gris). Intensidad de fluorescencia detectada en la cola de embriones a 24 y 72 horas tras la inyección. N=6. \*\*  $p < 0.01$ . n.s. no significativo.

Por tanto, los resultados indican que los vCAF<sup>mCherry</sup> no afectan a la diseminación de los clústeres de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en los xenotrasplantes realizados, incluso se observa una tendencia hacia un efecto negativo sobre la diseminación de las células tumorales. Para entender mejor este resultado se realizaron xenotrasplantes de clústeres homotípicos y heterotípicos de estas líneas celulares en el espacio perivitelino de los embriones de pez cebra, desde donde las células xenotrasplantadas deben invadir e intravasarse activamente para poder acceder al sistema circulatorio y diseminarse a la cola<sup>195</sup>. En estos experimentos se evaluó por un lado la capacidad invasiva y de migración de las células tumorales, cuantificando el número de frentes de invasión tumoral, y por otro lado la capacidad de diseminación a la cola de los peces (**figura 23A**).



**Figura 23.** Efecto de vCAF<sup>mCherry</sup> en la diseminación de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en xenotrasplantes en el espacio perivitelino de embriones de pez cebra. **A.** Imágenes representativas de xenotrasplantes de clústeres homotípicos y heterotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> a tiempo inicial y 24 hpi. **B.** Número de frentes de invasión detectados en el sitio inicial del xenotrasplante en los peces inyectados con clústeres homotípicos (negro) y heterotípicos (gris), a 24 y 72 horas tras la inyección. **C.** Número de células diseminadas en la cola de embriones xenotrasplantados con clústeres homotípicos (negro) y heterotípicos (gris), a 24 y 72 horas tras la inyección. N=4. \*\*\* p < 0.001.

Los resultados muestran que el número de frentes de invasión detectados es significativamente mayor en aquellos embriones xenotrasplantados con clústeres homotípicos respecto a los heterotípicos, tanto a 24 ( $2.2 \pm 1$  vs.  $1.6 \pm 1.1$ ,  $p < 0.05$ ) como a 72 horas ( $2.8 \pm 1.5$  vs.  $2 \pm 1$ ,  $p < 0.05$ ) (**figura 23B**). Sin embargo, no se observó un mayor número de células tumorales diseminadas en la cola de los embriones en la población inyectada con clústeres heterotípicos (**figura 23C**).

### 3. COMPARATIVA DEL EFECTO DE vCAF<sup>mCherry</sup> Y FIBROBLASTOS NORMALES (BJ) SOBRE LA DISEMINACIÓN TUMORAL EN MODELOS IN VIVO

Debido a la inesperada falta de efecto de los vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la diseminación de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en el pez cebra, nos propusimos repetir los xenotrasplantes con una línea de fibroblastos primarios normales humanos BJ y comparar su comportamiento con el de vCAF<sup>mCherry</sup> respecto a la diseminación de las células tumorales. Estos fibroblastos primarios no han estado en un ambiente tumoral, por lo que no deberían modificar el potencial de diseminación de la línea tumoral. Para ello, se generaron clústeres heterotípicos formados por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y BJ, y xenotrasplantes en las mismas condiciones que se generaron en los experimentos con la línea vCAF<sup>mCherry</sup>.

#### 3.1. Los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> y BJ presentan el mismo comportamiento respecto a la diseminación de las células tumorales

La diseminación de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> a la cola de los embriones xenotrasplantados, medida en base a su fluorescencia, no varía entre aquellos individuos inyectados con clústeres homotípicos y heterotípicos formados por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y BJ (**figura 24**).

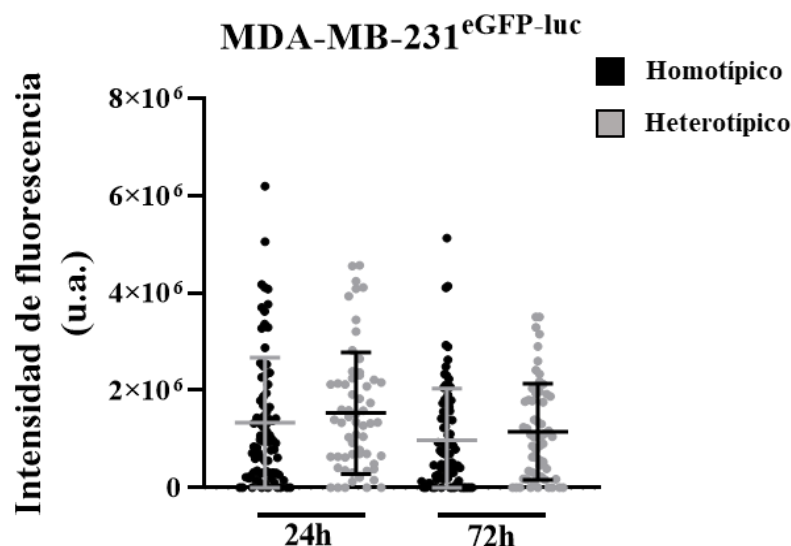


Figura 24. Intensidad de fluorescencia producida por la línea tumoral detectada en las colas de embriones xenotrasplantados con clústeres homotípicos (negro) y heterotípicos (gris) de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y BJ, a 24 y 72 horas tras el xenotrasplante. Cada punto representa un pez. N=2.

Las intensidades de fluorescencia detectadas son similares entre los embriones inyectados con clústeres homotípicos a 24 horas ( $1.13 \times 10^6 \pm 1.34 \times 10^6$ ) y 72 horas tras el xenotrasplante ( $9.78 \times 10^5 \pm 1.11 \times 10^6$ ), comparados con aquellos inyectados con clústeres heterotípicos a 24 horas ( $1.15 \times 10^6 \pm 1.25 \times 10^6$ ) y 72 horas tras el xenotrasplante ( $1.12 \times 10^6 \pm 9.89 \times 10^5$ ). Estos

resultados guardan una gran similitud con la diseminación de las células tumorales en los xenotrasplantes de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> con los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> previamente mostrados (**figura 21**), en la que los embriones xenotrasplantados con clústeres homotípicos y heterotípicos mostraban fluorescencias similares a las 24 y 72 horas tras la inyección.

El efecto similar que muestra la línea BJ comparada con la línea vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la diseminación de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> parece indicar que las células vCAF<sup>mCherry</sup>, pese a proceder de un ambiente tumoral, no poseen un fenotipo que favorezca la invasión de las células tumorales.

### **3.2. La presencia de vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados favorece la supervivencia y proliferación de las células tumorales**

Los resultados obtenidos en los xenotrasplantes de clústeres heterotípicos sugieren que la presencia de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> en el sitio de inyección (tumor primario) no parece ejercer un efecto pro-invasivo sobre la línea tumoral MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, de forma similar a como se comportan los fibroblastos no activados BJ. Sin embargo, en estos experimentos observamos que no todos los embriones xenotrasplantados muestran fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados en la cola, a pesar de sí observarse diseminación tumoral. Por ello, nos planteamos llevar a cabo un estudio más detallado del grado de diseminación celular. Así, el porcentaje de peces xenotrasplantados con clústeres heterotípicos que muestran vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados en la cola a las 24 horas tras la inyección es de un  $70 \pm 8 \%$ , y este disminuye hasta un  $42 \pm 10 \%$  a las 72 horas (**figura 25A**). Este fenómeno no parece ser exclusivo de los vCAF<sup>mCherry</sup>, ya que los fibroblastos BJ muestran un patrón de diseminación similar (**figura 25B**), y estaría indicando que se está produciendo una migración conjunta de los fibroblastos con las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en la mayoría de los embriones, derivada de la agregación celular en los clústeres. Si bien la diseminación inicial es similar entre vCAF<sup>mCherry</sup> y BJ (70% y 57%, respectivamente), esta parece disminuir en el tiempo (42% vs. 19%), lo que indicaría una supervivencia limitada en el embrión, siendo este efecto menos pronunciado para los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>.

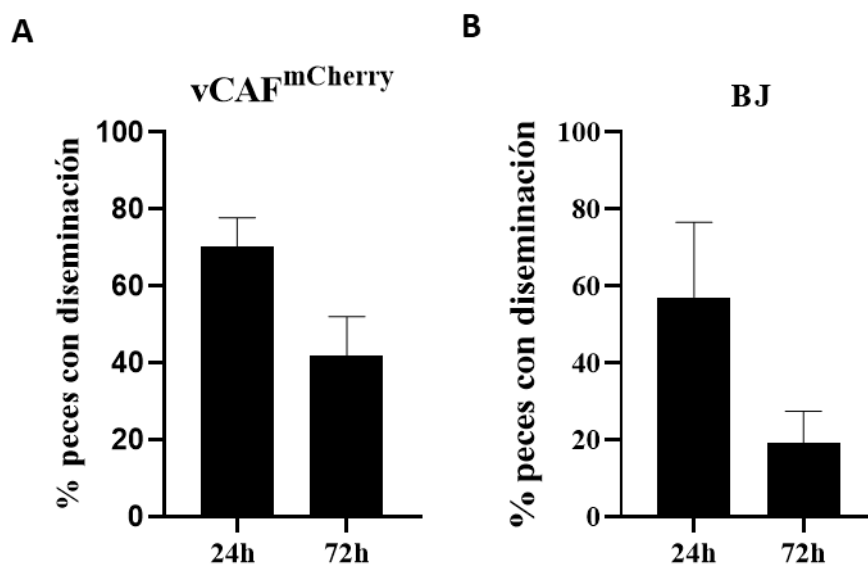


Figura 25. Porcentaje de diseminación de fibroblastos a la cola de embriones de pez cebra. A. Porcentaje de peces xenotrasplantados con clústeres heterotípicos formados por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> que muestran vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados en la cola a 24 y 72 horas tras el xenotrasplante. B. Porcentaje de peces xenotrasplantados con clústeres heterotípicos formados por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y BJ que muestran BJ diseminados en la cola a 24 y 72 horas tras el xenotrasplante.

Estos resultados indican que la supervivencia de los fibroblastos diseminados, tanto vCAF<sup>mCherry</sup> como BJ, disminuye en el tiempo y, además, que hay peces en los que las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> han diseminado en solitario hasta la cola y, por lo tanto, no como clústeres heterotípicos. En base a esta observación, nos planteamos analizar los resultados en función de la presencia o no de vCAF<sup>mCherry</sup> y BJ diseminados en la cola, con el fin de estudiar un posible efecto de su presencia sobre el volumen de células tumorales diseminadas a lo largo del tiempo, en términos de supervivencia y/o proliferación.

En este análisis se observa una mayor fluorescencia asociada a las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en la cola a 24 horas en los embriones con diseminación de vCAF<sup>mCherry</sup> comparado con aquellos que no presentan diseminación de fibroblastos ( $7.6 \times 10^5 \pm 5.1 \times 10^5$  vs.  $2.3 \times 10^5 \pm 2.7 \times 10^5$ ;  $p < 0.0001$ ; **figura 26A**). Estas diferencias entre ambas poblaciones de embriones se mantuvieron a las 72h ( $1.1 \times 10^6 \pm 7.5 \times 10^5$  vs.  $3.3 \times 10^5 \pm 3.7 \times 10^5$ ;  $p < 0.0001$ ). De forma interesante, en aquellos embriones con diseminación de vCAF<sup>mCherry</sup> en la cola, se observa un aumento significativo en el volumen de células tumorales diseminadas de 24 a 72 horas, determinado por un incremento en la señal de fluorescencia ( $7.6 \times 10^5$  a 24 horas vs.  $1.1 \times 10^6$  a 72 horas;  $p < 0.05$ ; **figura 26A**), efecto que no se observa en embriones sin vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados. Este resultado muestra que la diseminación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> es mayor en aquellos embriones en los que también se observan vCAF<sup>mCherry</sup> en la cola, lo que podría indicar que se ha producido una mayor diseminación general de ambas poblaciones celulares inyectadas, sin que los fibroblastos tengan un efecto aparente. Esto se ha corroborado mediante el análisis de diseminación de los embriones xenotrasplantados con clústeres heterotípicos con los fibroblastos BJ, el cual también muestra una mayor fluorescencia en la cola de los embriones con presencia de fibroblastos tanto a 24 como 72 horas, comparado con aquellos que no presentan diseminación de BJ (24h:  $2.12 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^6$  vs.  $8.83 \times 10^5 \pm 7.31 \times 10^5$ ; 72h:  $2.16 \times 10^6 \pm 7.65 \times 10^5$  vs.  $9.28 \times 10^5 \pm 8.93 \times 10^5$ ;  $p < 0.0001$ ; **figura 26B**).

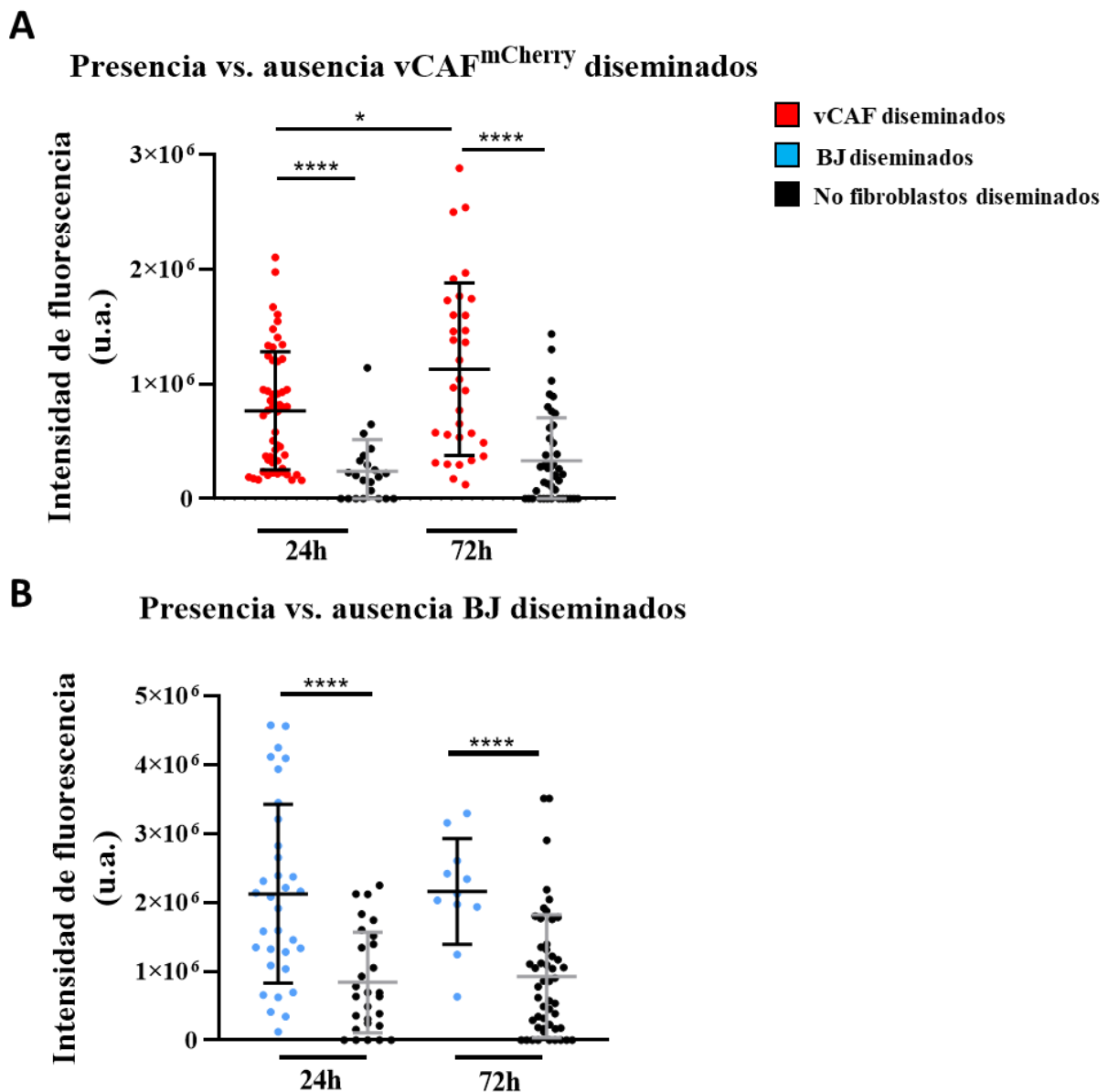


Figura 26. A. Intensidad de fluorescencia de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas a la cola de los embriones xenotrasplantados en función de la presencia (rojo) o ausencia (negro) de vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados. B. Intensidad de fluorescencia de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas a la cola de los embriones xenotrasplantados en función de la presencia (azul) o ausencia (negro) de BJ diseminados N=3. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Este resultado sugiere que, en ambos conjuntos de experimentos, la mayor presencia de las células tumorales cuando también han diseminado los fibroblastos se debe posiblemente a una diseminación conjunta y pasiva de ambos tipos celulares desde el sitio de inyección a la circulación, en lugar de a un efecto activo pro-diseminación de los vCAF<sup>mCherry</sup> sobre las células tumorales. En este sentido, un análisis de regresión lineal a las 24 horas entre los niveles de fluorescencia verde emitida por las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y la fluorescencia roja emitida por los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> no mostró una correlación clara entre ambas señales ( $R^2 = 0.15$  a 24h;  $R = 0.36$  a 72h), lo que sugiere que el volumen de células tumorales diseminadas no es dependiente del volumen de

fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> diseminado, y viceversa (**figura 27A y B**). En base a estos resultados, podemos interpretar que existe cierta diseminación pasiva de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> en el pez cebra, aunque no se puede descartar un mecanismo mediado por los fibroblastos.

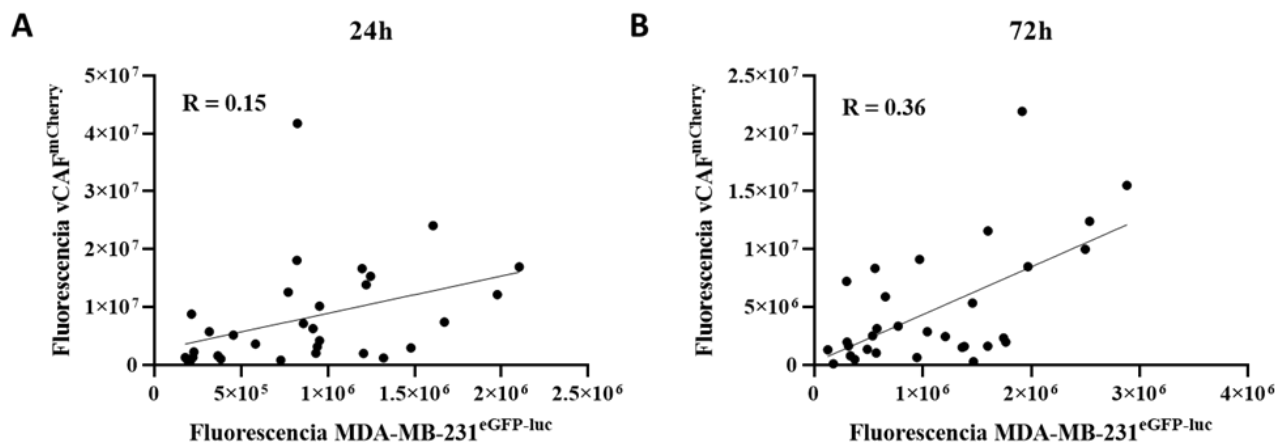


Figura 27. Análisis de regresión lineal entre la fluorescencia emitida por las células vCAF<sup>mCherry</sup> y MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas en cola 24 (A) y 72 (B) horas tras el xenotrasplante.

Es importante destacar que la presencia de vCAF<sup>mCherry</sup> en la cola de embriones xenotrasplantados con clústeres heterotípicos está acompañada de un aumento en el tiempo de la supervivencia y/o proliferación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas ( $p < 0.05$ ), lo que podría indicar que los fibroblastos podrían estar ejerciendo un efecto positivo sobre las células tumorales diseminadas. De hecho, este efecto no se observa en aquellos embriones con presencia de BJ diseminados ( $p > 0.05$ ). Por tanto, este resultado parece indicar que los vCAF<sup>mCherry</sup>, pese a no favorecer la diseminación inicial de las MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> desde el Ducto de Cuvier, podrían estar facilitando no solo la supervivencia, sino la proliferación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas en la cola del pez.

En conclusión, este conjunto de resultados muestra un efecto positivo de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la supervivencia y proliferación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, sin afectar de forma significativa su capacidad de invadir y diseminar en el embrión del pez cebra.

### 3.3. La supervivencia en el tiempo de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> favorece la proliferación de las células tumorales.

Previamente se ha mencionado que la supervivencia de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados disminuye en el tiempo (**figura 25A**), lo cual parece estar en contradicción con el incremento temporal en el volumen de células tumorales observado (**figura 26A**). Con el objetivo de entender mejor la posible regulación de los vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la supervivencia y proliferación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, nos propusimos analizar si dicho efecto era dependiente de la presencia mantenida en el tiempo de los fibroblastos, o establecido en las primeras horas tras la diseminación por la circulación del pez.

Para ello, los embriones con vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados se analizaron divididos en dos grupos según muestren fibroblastos en la cola tanto a 24 como a 72 horas (vCAF 24-72h), o solo a 24 horas (vCAF 24h) tras el xenotrasplante. Esto nos permite estudiar si la supervivencia de los fibroblastos en la cola del pez puede estar relacionada con la supervivencia y/o proliferación de las células tumorales diseminadas. Inicialmente, analizamos la señal de

fluorescencia asociada a los vCAF<sup>mCherry</sup> en ambos grupos. En este análisis se observa una tendencia hacia un mayor volumen de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados a las 24 horas tras el xenotrasplante en aquellos embriones del grupo vCAF 24-72h, en comparación con aquellos embriones vCAF 24h ( $6.38 \times 10^6 \pm 5.66 \times 10^6$  vs.  $3.95 \times 10^6 \pm 3.86 \times 10^6$ ;  $p=0.07$ ; **figura 28A**). El seguimiento en el tiempo de esos fibroblastos indica que el volumen de células diseminadas a las 72h no es significativamente diferente del observado a las 24 horas ( $6.27 \times 10^6 \pm 6.43 \times 10^6$  vs.  $4.8 \times 10^6 \pm 5.18 \times 10^6$ ;  $p=0.17$ ; **figura 28B**), aunque se observa una disminución asociada a muerte celular. Este resultado indicaría que algunos fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> tienen la capacidad de sobrevivir una vez diseminados en el pez.

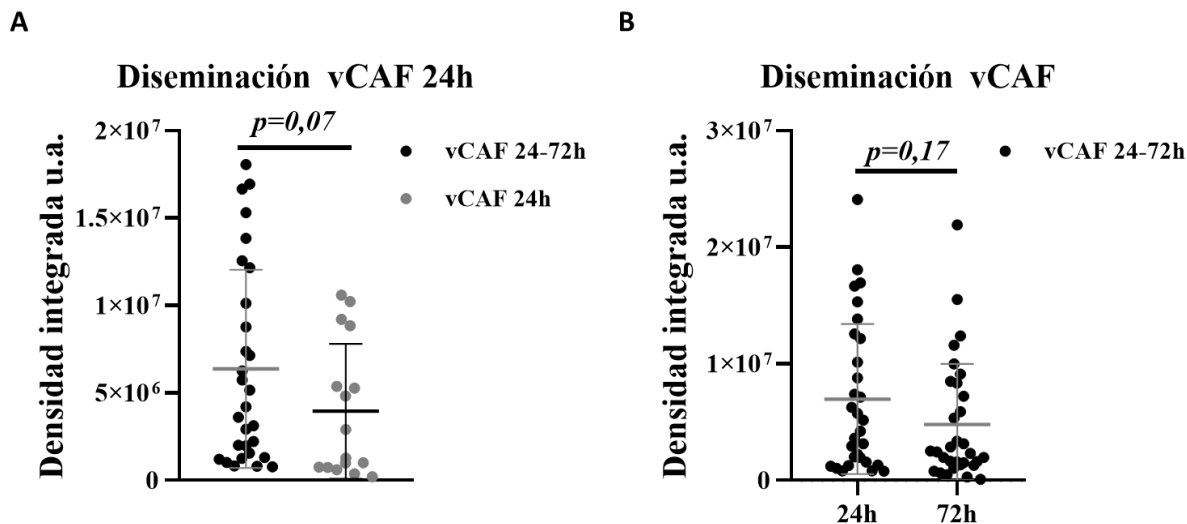


Figura 28. Diseminación de vCAF<sup>mCherry</sup> en peces xenotrasplantados con clústeres heterotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>. A. Volumen de diseminación de vCAF<sup>mCherry</sup> a las 24 horas tras el xenotrasplante en aquellos peces cuyos fibroblastos sobreviven a las 24 y 72 horas (negro) o solo a las 24 horas (gris). B. Supervivencia de vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados a lo largo del tiempo.

Por otro lado, llevamos a cabo el análisis de las señales de fluorescencia asociada a las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>. Veinticuatro horas tras el xenotrasplante, los embriones con vCAF<sup>mCherry</sup> presentes en ambos tiempos (vCAF 24-72h) muestran un mayor volumen de diseminación tumoral que los peces con vCAF<sup>mCherry</sup> solo presentes a 24 horas (vCAF 24h), si bien esta diferencia no es significativa ( $p=0.13$ ; **figura 29A**). Sin embargo, a las 72 horas, el número de células tumorales diseminadas es significativamente mayor en el primer grupo ( $1.1 \times 10^6 \pm 7.5 \times 10^5$  vs.  $4.7 \times 10^5 \pm 4.3 \times 10^5$ ;  $p<0.001$ ), debido a un claro aumento en el número de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> presentes en la cola de los embriones en el tiempo (24h =  $8.4 \times 10^5 \pm 5.4 \times 10^5$  vs. 72h =  $1.1 \times 10^6 \pm 7.5 \times 10^5$ ;  $p<0.05$ ; **figura 29A**). Este resultado no se observa en los experimentos control con la línea de fibroblastos BJ, donde a pesar de haber una mayor diseminación tumoral inicial en los embriones con BJ presentes a 24 y 72 horas ( $2.9 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^6$  vs.  $1.7 \times 10^6 \pm 1.1 \times 10^5$ ;  $p<0.05$ ), el volumen de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en este grupo disminuyó significativamente entre los puntos de 24 y 72 horas ( $2.9 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^6$  vs.  $1.3 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^6$ ;  $p<0.05$ ; **figura 29B**).

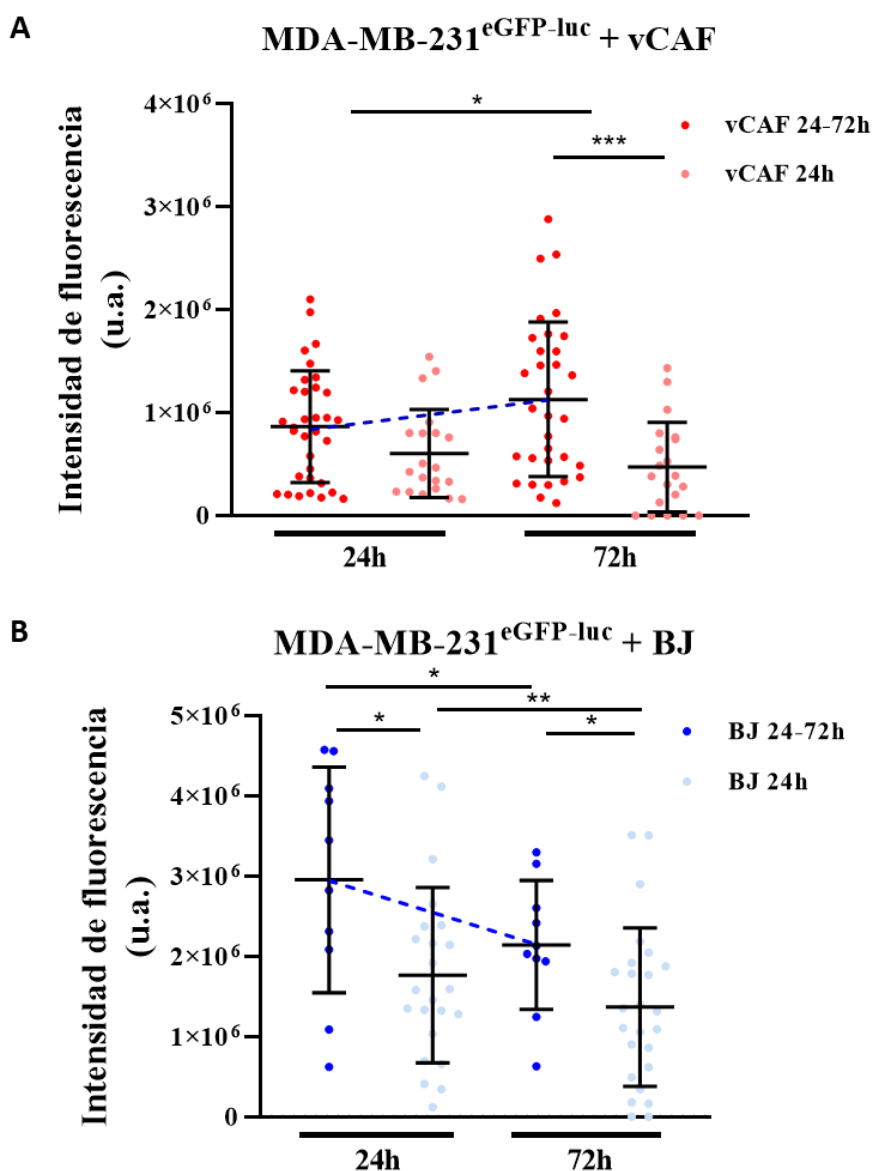


Figura 29. Volumen tumoral de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en la cola según la supervivencia de los fibroblastos a lo largo del tiempo. A. Intensidades de fluorescencia a 24 y 72 horas de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas en embriones con vCAF<sup>mCherry</sup> en cola a 24 y 72 horas (rojo oscuro) y solo a 24 horas (rojo claro). B. Intensidades de fluorescencia a 24 y 72 horas de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas en embriones con BJ en cola a 24 y 72 horas (azul oscuro) y solo a 24 horas (azul claro). N=3. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Para estudiar en detalle el efecto de los vCAF<sup>mCherry</sup> y BJ sobre la proliferación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en la cola de los embriones, se compararon los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos a 24 y 72 horas para los embriones con fibroblastos diseminados a 24 y 72 horas y embriones con fibroblastos diseminados solo a 24 horas. Este análisis nos permite determinar la proporción de embriones en los que el número de células tumorales diseminadas en las colas aumenta o disminuye con el tiempo en base a la supervivencia de los fibroblastos. Observamos que en el grupo vCAF 24-72h hay un mayor porcentaje de peces cuya cantidad de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas aumenta respecto al grupo de vCAF 24h ( $69.4 \pm$  vs.  $33.3 \pm 16.4$ ). Al mismo tiempo, en el grupo vCAF 24-72h hay

un menor porcentaje de peces con disminución de la cantidad de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas en comparación al grupo vCAF 24h ( $23.1 \pm 11.2$  vs.  $52.3 \pm 16.5$ ) (**figura 30A**). En el caso de la línea BJ, no se observan diferencias en estos porcentajes para ninguno de los dos grupos, observándose que la mayoría de los embriones con BJ diseminados ven reducido su cantidad de MDA en cola independientemente que los BJ sobrevivan o no hasta las 72 horas ( $61.1 \pm 1.6$  vs.  $73.9 \pm 1.6$ ) (**figura 30B**).

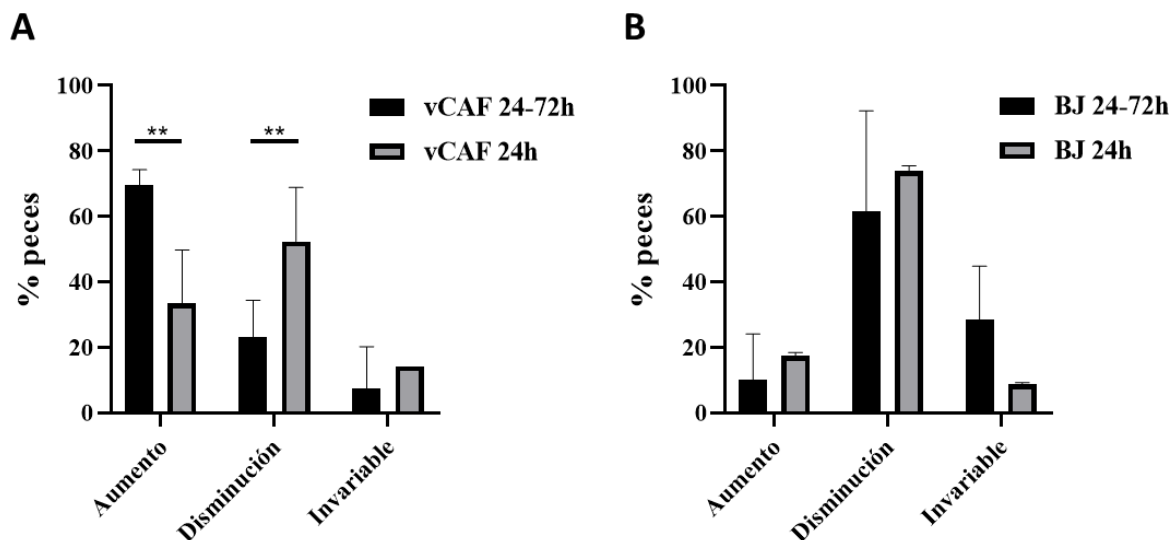


Figura 30. Porcentaje de embriones que muestran un aumento o disminución de la intensidad de fluorescencia emitida por las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas en la cola de 24 a 72 horas, tras el xenotrasplante con clústeres heterotípicos formados por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> + vCAF<sup>mCherry</sup> (A; N=2) y clústeres heterotípicos formados por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> + BJ (B; N=3). Cambios en fluorescencia de 24 a 72 horas menores del 10% se consideraron como invariables. \*\* p < 0.01

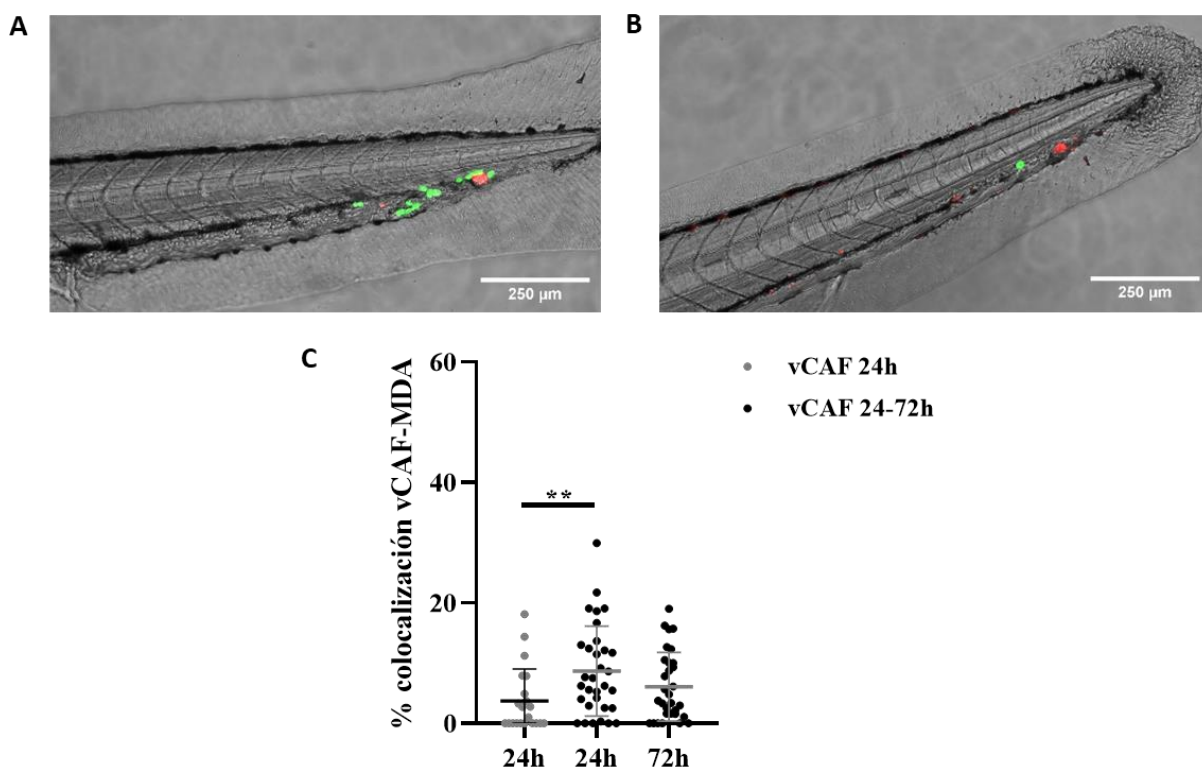
Estos resultados indican que hay un porcentaje de peces significativamente mayor que muestran un aumento de fluorescencia de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> de 24 a 72 horas cuando los vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados sobreviven en la cola, comparados con aquellos embriones que cuyos vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados mueren pasadas las 24 horas. Consecuentemente, se observa un mayor porcentaje de peces con disminución de la fluorescencia de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en el tiempo cuando los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados no sobreviven 72 horas tras el xenotrasplante. Estas diferencias refuerzan los resultados obtenidos de la figura 26A e indican que la presencia de vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados en la cola a lo largo del tiempo favorece la supervivencia y proliferación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas. En contraste, la mayor parte de los peces con BJ diseminadas muestran una disminución de la cantidad de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en el tiempo, independientemente de que los fibroblastos BJ sobrevivan o no hasta las 72 horas.

En conjunto, estos resultados indicarían que la supervivencia en el pez cebrá de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> tras su diseminación inicial favorece la proliferación de las células tumorales MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>.

### 3.4. El efecto de vCAF<sup>mCherry</sup> sobre MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> está determinado por la interacción física entre ambas poblaciones celulares.

Con el objetivo de discernir si la mayor supervivencia y proliferación de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en presencia de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados en la cola de los embriones xenotrasplantados clústeres heterotípicos se debe a una interacción física

(derivada de la clusterización) entre las células tumorales y los fibroblastos, se estudió la interacción entre ambos tipos celulares en la cola de los embriones. Si los vCAF<sup>mCherry</sup> están favoreciendo la capacidad metastásica de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, se esperaría que el clúster heterotípico se conserve tras su diseminación y que los fibroblastos aparezcan próximos a las células tumorales una vez hayan diseminado a la cola. Un análisis cualitativo mostró que en las colas de los peces xenotrasplantados con clústeres heterotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> se observaron dos situaciones, i) la colocalización de las células tumorales y los fibroblastos diseminados, y ii) la aparición de los dos tipos celulares separados físicamente en la cola (**figura 31A y B**). Mediante un estudio cuantitativo de colocalización celular, en base a las fluorescencias de ambos tipos celulares, determinamos que el porcentaje de colocalización a las 24 horas en aquellos embriones del grupo CAF 24h es menor que en aquellos peces del grupo CAF 24-72h ( $3.71 \pm 5.29$  % vs.  $8.68 \pm 7.47$ ;  $p < 0.01$ ), mientras que los porcentajes de colocalización en este último grupo de peces se mantienen entre las 24 y las 72 horas ( $8.68 \pm 7.47$  vs.  $7.36 \pm 9.12$ ;  $p > 0.05$ ) (**figura 31C**). No obstante, este análisis representa una infraestimación de la interacción física de ambas líneas celulares, ya que está basado en la determinación del solapamiento de las fluorescencias.



**Figura 31.** Análisis de la interacción vCAF<sup>mCherry</sup> con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en la cola de embriones xenotrasplantados con clústeres heterotípicos. A. Imagen representativa de la interacción física de vCAF<sup>mCherry</sup> con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en la cola de embriones xenotrasplantados con clústeres heterotípicos. B. Imagen representativa de vCAF<sup>mCherry</sup> y MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> separados físicamente en la cola de embriones xenotrasplantados con clústeres heterotípicos. C. Porcentaje de colocalización a 24 y 72 horas entre las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> en la cola de peces con vCAF<sup>mCherry</sup> supervivientes solo a las 24 horas (gris) y con CAF supervivientes a las 24 y 72 horas (negro). N=3. \*\*  $p < 0.01$ .

Estos resultados muestran que existe una mayor interacción física entre las células tumorales y los vCAF<sup>mCherry</sup> en el grupo de peces cuyos fibroblastos sobreviven en el tiempo, y parece indicar que dichas interacciones célula-célula tienen un papel en el aumento de la supervivencia y proliferación de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, y posiblemente de los fibroblastos.

Con el objetivo de entender cómo las interacciones físicas existentes entre MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados pueden estar favoreciendo la supervivencia de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, se llevó a cabo un inmunoensayo capaz de determinar los niveles relativos de un panel de citoquinas y quimiocinas producidas por las dos líneas en monocultivo y co-cultivo.

En este ensayo, las membranas donde están situados los anticuerpos específicos para cada citoquina fueron incubadas con medio proveniente de monocultivo de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, monocultivo de vCAF<sup>mCherry</sup>, cocultivo con interacción física entre MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, y cocultivo con separación física por una membrana permeable que permite el intercambio de factores solubles entre MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> (interacción paracrino). Se detectan diferentes niveles de expresión de las citoquinas dependiendo de la procedencia del medio con el que se incuban las membranas (**figura 32**).

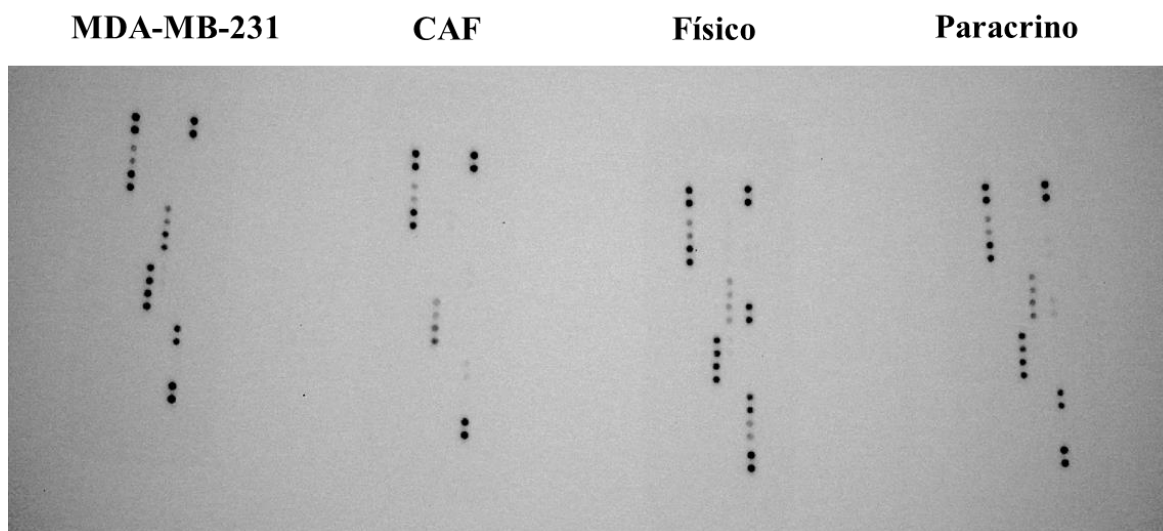
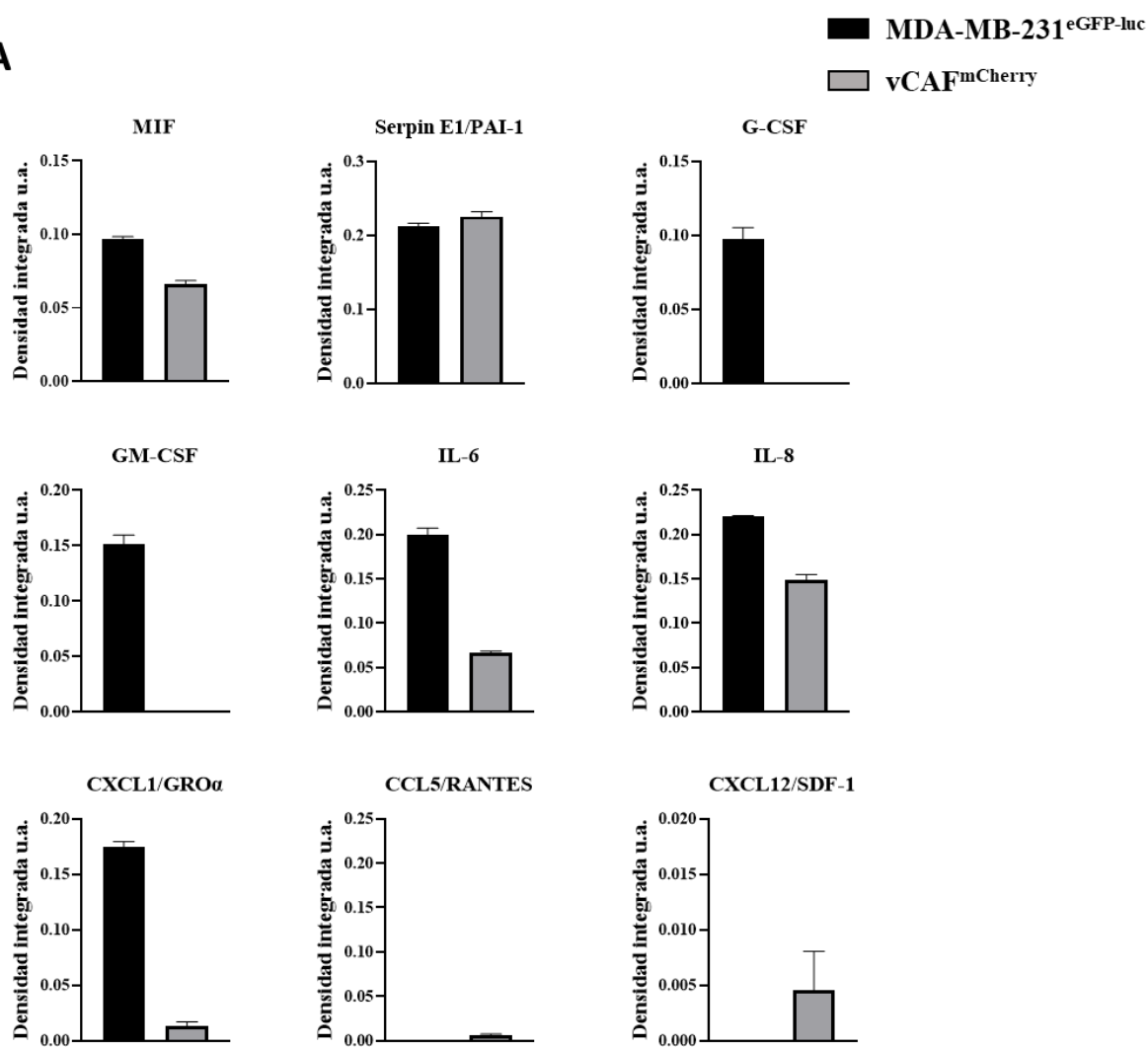


Figura 32. Determinación de citoquinas en medios de cultivo procedentes de monocultivos y cocultivos de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>. Membranas con anticuerpos contra diversas citoquinas incubadas con medio proveniente de cultivos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, vCAF<sup>mCherry</sup>, cocultivo de interacción física MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> + vCAF<sup>mCherry</sup> y cocultivo de interacción paracrino MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> + vCAF<sup>mCherry</sup>.

Los niveles de expresión de aquellas citoquinas que fueron detectadas en el ensayo se muestran en las **figuras 33A y B**. Un número de ellas no muestran variación en su expresión entre los monocultivos de cada línea celular y los cocultivos (MIF, Serpin E1/PAI-1 e IL-8), mientras que otras apenas se expresan en la línea vCAF<sup>mCherry</sup>, pero se detectan tanto en la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> como en ambos tipos de cocultivos (G-CSF, GM-CSF, IL-6 y CXCL1/GRO $\alpha$ ). Sin embargo, es interesante destacar aquellas citoquinas cuya expresión solo es detectada en los cocultivos, pero no en las líneas aisladas. Por ejemplo, CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10 e ICAM1/CD54 se expresan solamente en los cocultivos de interacción física de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, mientras que CCL2/MCP1 solo es detectada en los cocultivos separados físicamente.

**A**



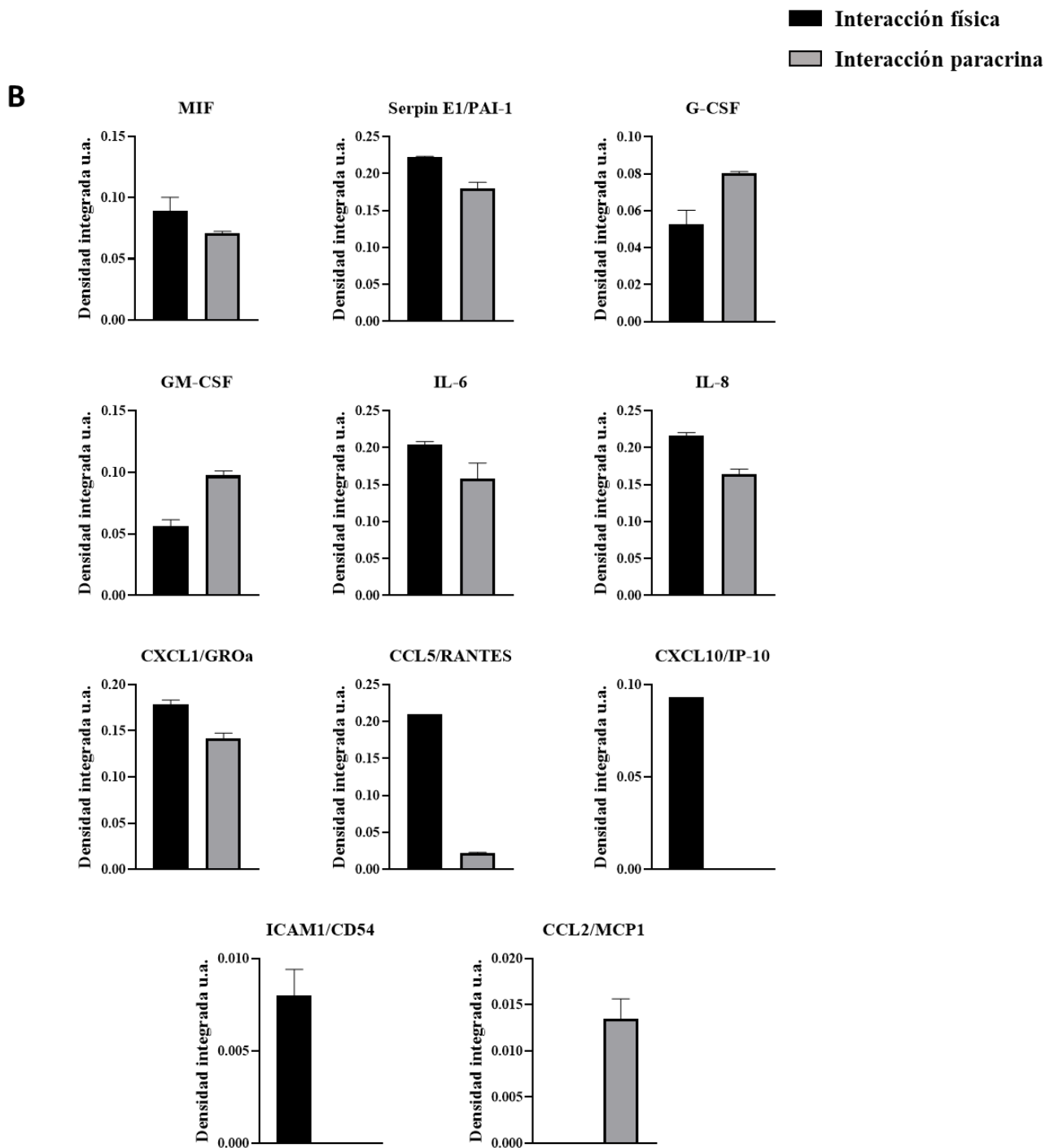


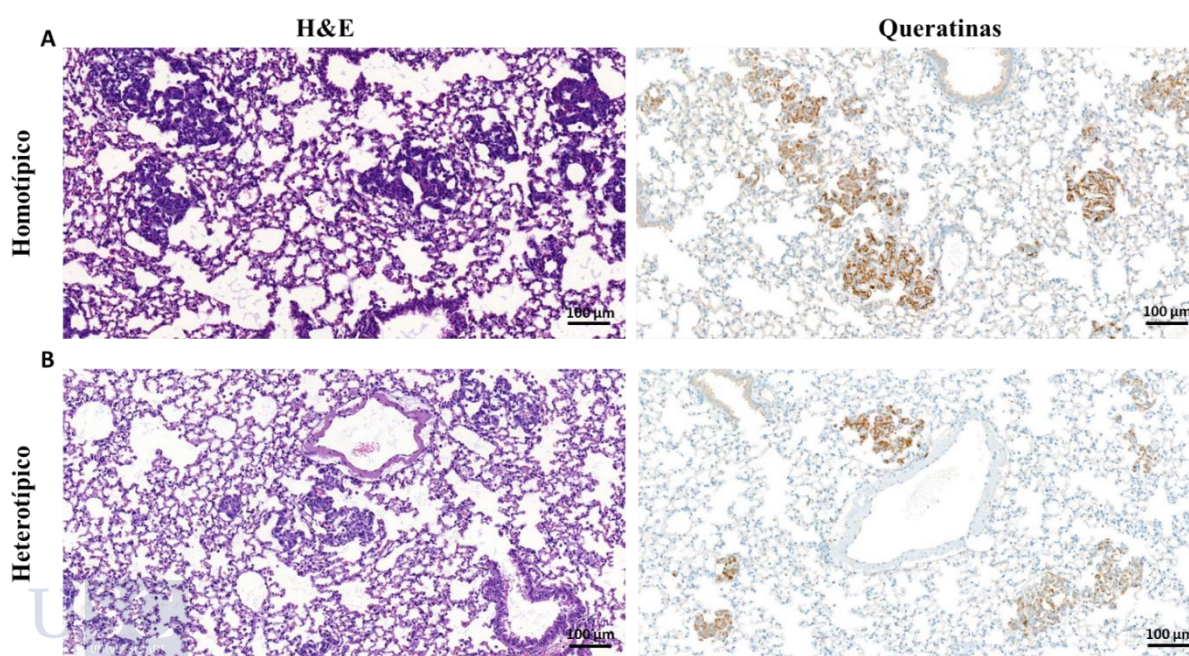
Figura 33. Niveles de citoquinas detectados en medios de cultivo procedentes de monocultivos y cocultivos de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y línea vCAF<sup>mCherry</sup>. A. Niveles de citoquinas expresados por la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> (negro) y la línea vCAF<sup>mCherry</sup> (gris). B. Niveles de citoquinas detectados en cocultivos de interacción física entre estas dos líneas (negro) y cocultivos de interacción paracrina separados físicamente por una membrana (gris). N=1.

Este resultado muestra que las líneas MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> secretan factores solubles que participan de una comunicación intercelular. Además, ciertas citoquinas son solo detectadas cuando ambas líneas celulares están en cocultivo, siendo la mayoría de ellas observadas en los cocultivos de interacción física, lo que sugiere un fenómeno de comunicación

dependiente en gran medida del contacto físico. Cabe destacar que las citoquinas CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10 e ICAM/CD54 aumentan la motilidad e invasión de las células tumorales, siendo CXCL10/IP-10 e ICAM/CD54 además potenciadoras de un fenotipo metastásico en células tumorales de cáncer de mama<sup>196-198</sup>. Por tanto, la secreción de estas citoquinas podría ser un factor contribuyente a la supervivencia y proliferación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> observada en la cola del pez, cuando los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> están presentes e interactuando con las células tumorales diseminadas.

### 3.5. Los clústeres heterotípicos no poseen una ventaja metastásica en el ratón

Debido a que los vCAF<sup>mCherry</sup> no favorecen la diseminación de las células tumorales a la cola del pez, pero sí su supervivencia y proliferación una vez diseminadas, se propuso un experimento de colonización pulmonar en modelos murinos, con el objetivo de estudiar las capacidades de anidamiento y crecimiento metastásico de las células tumorales en presencia de fibroblastos. Para ello, se generaron clústeres homotípicos y heterotípicos, formados por células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> o MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> en una ratio 1:2 (fibroblasto: célula tumoral), los cuales fueron inyectados en la vena lateral de la cola de ratones inmunodeficientes SCID-beige. Se estudió la colonización de las células tumorales en los pulmones de los ratones y su evolución a lo largo del tiempo mediante la medición de la señal bioluminiscente producida por la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> al metabolizar luciferina. Se puede observar la presencia de células tumorales en el tejido de pulmones extraídos de los ratones xenotrasplantados con clústeres homotípicos y heterotípicos al final del experimento (**Figura 34A y B**). Sin embargo, mediante los análisis histopatológicos no se pudo confirmar la presencia de vCAF<sup>mCherry</sup> en los pulmones de los ratones, por lo que no se puede saber si estos están presentes en las lesiones metastásicas.



**Figura 34.** Colonización pulmonar de clústeres homotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y heterotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> + vCAF<sup>mCherry</sup>. A. Imagen representativa de metástasis pulmonares generadas en ratones xenotrasplantados con clústeres homotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> (A) y clústeres heterotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> (B) visualizadas con hematoxilina-eosina (H&E), y secciones de tejido teñidas con un anticuerpo para queratinas humanas. Barras de escala 100 μm.

Mediante el estudio de la progresión metastásica a través de la bioluminiscencia, se observa una mayor señal en los ratones xenotrasplantados con clústeres homotípicos a lo largo del tiempo comparados con aquellos xenotrasplantados con clústeres heterotípicos (**figura 35A**). El volumen de metástasis pulmonar al final del ensayo es significativamente mayor en aquellos individuos que fueron inyectados con clústeres homotípicos en comparación con aquellos inyectados con clústeres heterotípicos ( $1.0 \times 10^6 \pm 1.5 \times 10^5$  vs.  $4.6 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^5$ ;  $p < 0.05$ ) (**figura 35B**), así como el número de metástasis observadas en el examen histológico de los tejidos pulmonares ( $321.2 \pm 101$  vs.  $129.4 \pm 87$ ;  $P < 0.05$ ; **figura 35C**). Asimismo, se observa una gran disminución de la señal bioluminiscente en los primeros tres días del ensayo en ambos grupos, indicativa de muerte celular (**figura 35A**). Así, el cambio relativo de la señal bioluminiscente en los pulmones de los ratones entre el tercer día del experimento respecto al día de la inyección celular es menor en los ratones xenotrasplantados con clústeres homotípicos respecto a heterotípicos ( $0.29 \pm 0.15$  vs.  $0.15 \pm 0.08$ ;  $p > 0.05$ ; **figura 35D**).

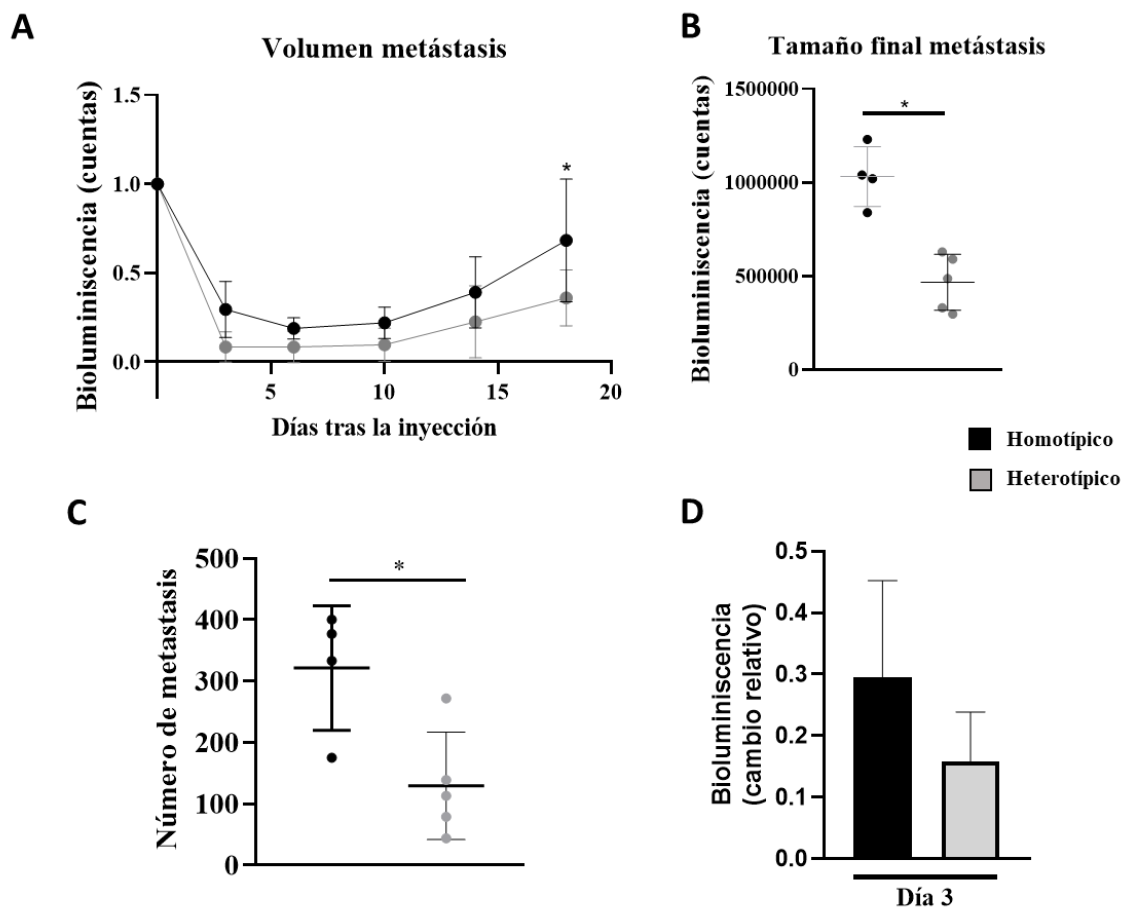


Figura 35. Colonización pulmonar de clústeres homotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y heterotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> + vCAF<sup>mCherry</sup>. A. Señal bioluminiscente a lo largo del tiempo de los ratones inyectados con clústeres homotípicos (negro) y heterotípicos (gris). B. Señal bioluminiscente de los pulmones a tiempo final en ratones inyectados con clústeres homotípicos (negro) y heterotípicos (gris). C. Número de metástasis a tiempo final en los pulmones de ratones inyectados con clústeres homotípicos (negro) y heterotípicos (gris). D. Cambio relativo de la señal bioluminiscente entre tiempo inicial y 3 días en ratones inyectados con clústeres homotípicos (negro) y heterotípicos (gris).

Estos datos muestran que la incidencia de muerte celular observada en los tres primeros días del ensayo es más acusada en los xenotrasplantes con clústeres heterotípico. Por lo tanto, los resultados indican que los clústeres homotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> tienen un mayor potencial metastásico que los clústeres heterotípicos con los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> cuando son xenotrasplantados en la vena lateral de la cola de ratones.

#### **4. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO MOLECULAR DE vCAF<sup>mCherry</sup> Y BJ**

Los resultados obtenidos hasta ahora muestran que la línea vCAF<sup>mCherry</sup> no favorece la diseminación de las células tumorales en los modelos de pez y ratón. Además, se observa que el efecto de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la diseminación de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en el pez cebra es muy similar al efecto de la línea BJ. Sin embargo, sí se observa un efecto sobre la supervivencia y proliferación de las células tumorales diseminadas no observado con las células BJ, aunque este efecto está restringido al modelo de pez cebra. Debido a esto, nos propusimos estudiar en detalle el perfil molecular de los vCAF<sup>mCherry</sup> (en comparación con los fibroblastos BJ) con el fin de determinar la expresión de marcadores moleculares asociados a la activación de los fibroblastos en el ambiente tumoral, ya que su comportamiento no parece ser el comúnmente atribuido a los CAF.

##### **4.1. Los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> presentan un perfil de expresión de marcadores de activación similar a fibroblastos BJ**

En primer lugar, mediante RT-qPCR se estudiaron los niveles basales de expresión de una serie de marcadores moleculares asociados a la activación de fibroblastos en el ambiente tumoral (FNA1, FSP1, FAP, ACTA2, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , y TNC), esperando observar diferencias de expresión entre la línea vCAF<sup>mCherry</sup> y la línea BJ. En los resultados de expresión génica no se observan diferencias significativas de expresión basal de los marcadores de activación de fibroblastos estudiados, aunque se detectan tendencias de una mayor expresión de los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas  $\alpha$  y  $\beta$  (PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$ ) en la línea vCAF<sup>mCherry</sup> ( $0,03 \pm 0,006$  y  $0,14 \pm 0,04$ , respectivamente) comparado con la expresión en la línea BJ ( $0,006 \pm 0,002$  y  $0,05 \pm 0,01$ ) (**figura 36**).

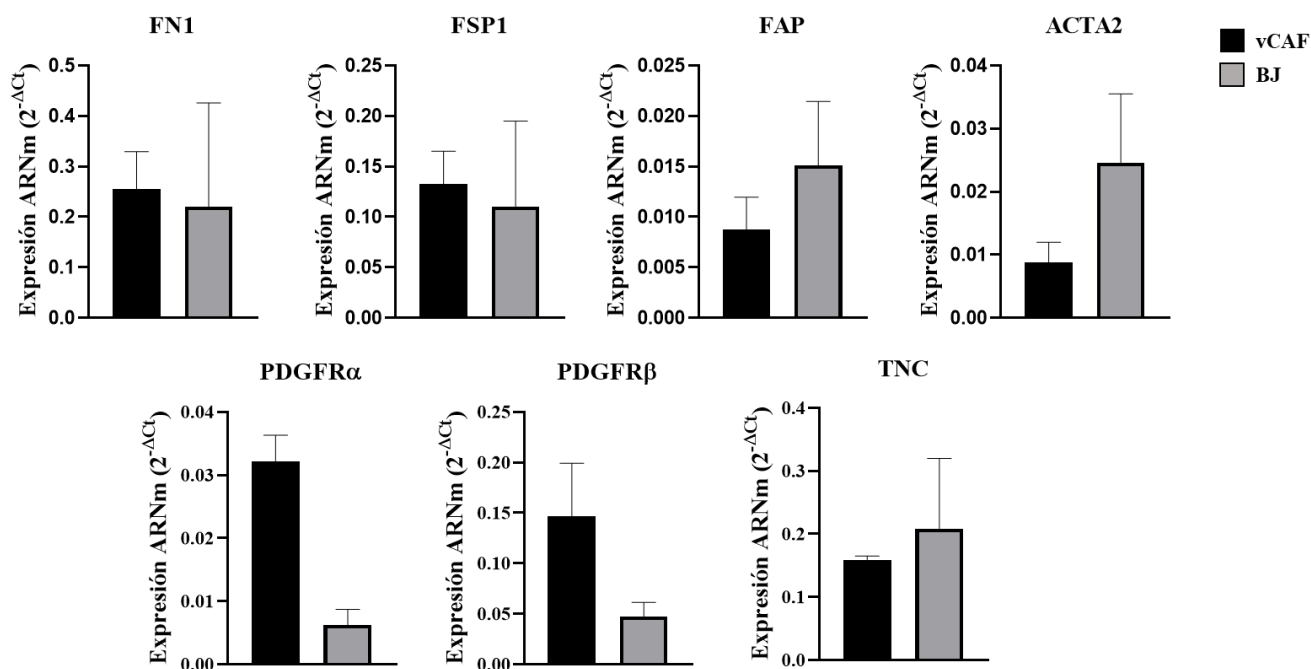


Figura 36. Expresión génica de marcadores de activación de fibroblastos para las líneas vCAF<sup>mCherry</sup> (negro) y BJ (gris). Los marcadores estudiados son: FN1, FSP1, FAP, ACTA2, PDGFRα, PDGFRβ y TNC. Los niveles de expresión se muestran como 2 elevado a la potencia negativa del ΔCt. N=3.

Estos resultados indican que el perfil molecular de ambas líneas de fibroblastos en estado basal es semejante, lo que podría explicar la falta de efecto de los vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la diseminación tumoral, ya que no se observan rasgos claros de activación. Asimismo, los resultados presentados en la sección 1.2 muestran que el intercambio de factores solubles entre vCAF<sup>mCherry</sup> y las células tumorales no es capaz de cambiar de forma sustancial el perfil molecular de estos fibroblastos, lo que sugiere que no son capaces de responder a los factores secretados por las células tumorales. Asimismo, el ensayo de producción de citoquinas mostró que en cocultivos con interacción exclusivamente paracrina no se detectan citoquinas detectadas en cocultivos con interacción física. Por tanto, estos resultados indican que los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> no se comunican de forma efectiva con las células tumorales, lo que puede limitar su acción sobre las mismas. Con el fin de testar esta hipótesis, nos planteamos estimular a los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> con TGF-β, una de las principales citoquinas que promueven la activación de fibroblastos a fibroblastos activados por cáncer<sup>199</sup>, y determinar su perfil molecular de activación.

#### 4.2. El tratamiento con TGF-β induce la activación de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> y promueve la diseminación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>

Para ello, llevamos a cabo un experimento tiempo-respuesta para determinar el tiempo de incubación de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> con 5 ng/mL de TGF-β adecuado para observar cambios en la expresión de cuatro de los principales marcadores de activación de fibroblastos (FN1, FSP1, FAP y ACTA2).

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con TGF-β induce cambios de expresión en los marcadores de activación de fibroblastos (figura 37). Así, tras la estimulación de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> con TGF-β se detecta un aumento significativo en la expresión de FN1 y FAP ( $2.96 \pm 0.75$  y  $5.03 \pm 0.52$ , respectivamente) en comparación con la línea vCAF<sup>mCherry</sup> sin tratar ( $1 \pm 0.41$  y  $1 \pm 0.25$ , respectivamente) a 24 horas de

incubación. Asimismo, se observan una tendencia al aumento de la expresión de ACTA2 en la población tratada a 24 horas ( $1.43 \pm 0.38$  para la población tratada y  $1 \pm 0.11$  para la población sin tratar). Estas diferencias se mantienen en el tiempo, siendo similares a 48 y 72 horas tras el inicio del tratamiento. En base a este experimento, se escogió el tiempo de 48 horas para el tratamiento con TGF- $\beta$  sobre las líneas de fibroblastos.

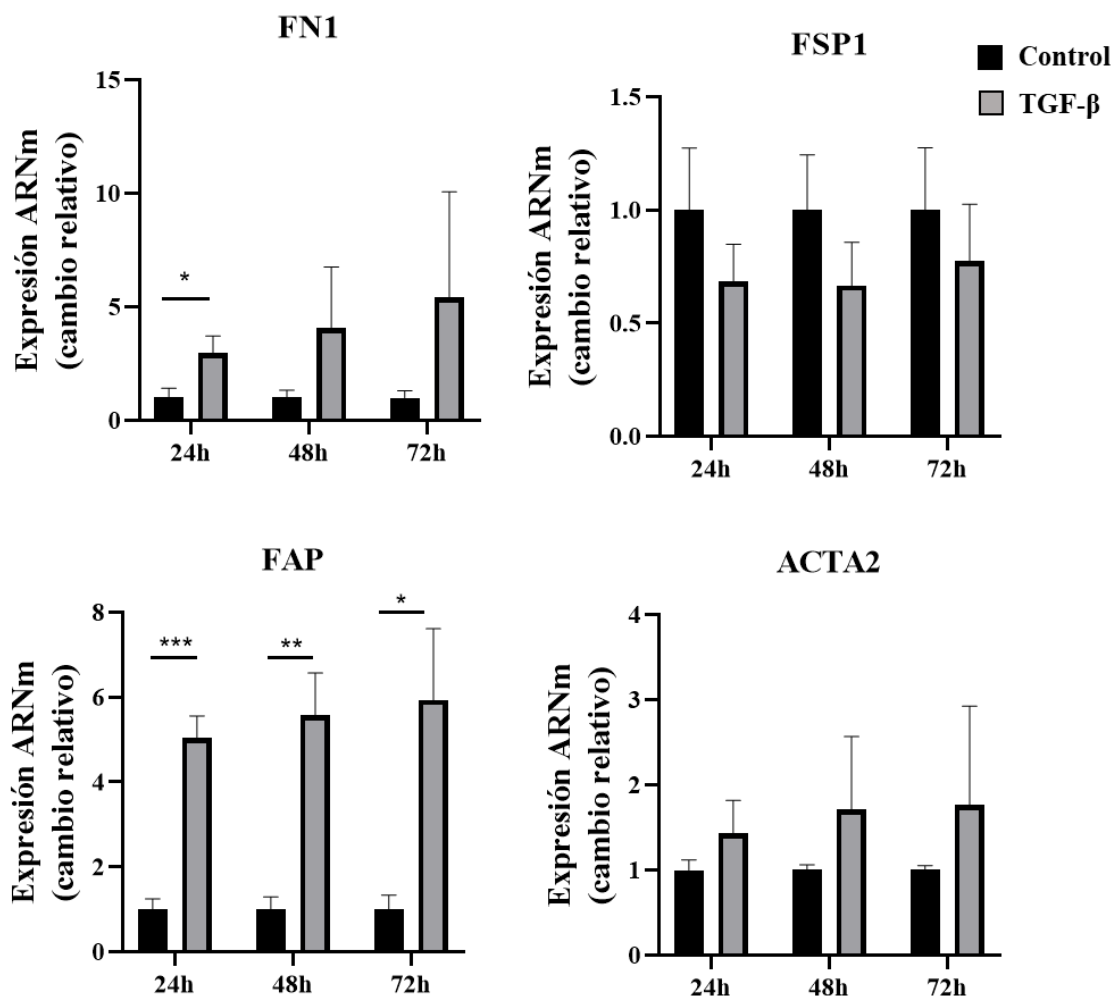


Figura 37. Cambios en la expresión génica de los marcadores de activación de fibroblastos FN1, FSP1, FAP y ACTA2 en la línea vCAF<sup>mCherry</sup>, con la incubación de 5ng/mL de TGF- $\beta$  durante 24, 48 y 72 horas. Los niveles de expresión se muestran como 2 elevado a la potencia negativa del  $\Delta$ Ct de las poblaciones tratadas dividido entre 2 elevado a la potencia negativa del  $\Delta$ Ct de las poblaciones control. N=3.

Posteriormente, se trató también la línea BJ con TGF- $\beta$  en las mismas condiciones que la línea vCAF<sup>mCherry</sup>. Nuestro objetivo es detectar diferencias en la respuesta al TGF- $\beta$  por parte de la línea de fibroblastos activados (vCAF<sup>mCherry</sup>) y de fibroblastos sin activar (BJ).

Se pueden observar diferencias en la respuesta al TGF- $\beta$  por parte de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> y la línea BJ (**figura 38**). Por un lado, la activación de vCAF<sup>mCherry</sup> con TGF- $\beta$  produce un aumento significativo de la expresión de FN1 ( $4.2 \pm 2.5$  vs.  $1 \pm 0.3$ ) y FAP ( $6.1 \pm 2.7$  vs.  $1 \pm 0.3$ ), mientras que se observan fuertes tendencias a una mayor expresión de ACTA2 ( $1.7 \pm 0.8$  vs.  $1 \pm 0.06$ ) y TNC ( $3.1 \pm 1.7$  vs.  $1 \pm 0.5$ ). Por otro lado, con la activación de BJ con TGF- $\beta$  se observa una tendencia a la mayor expresión de FN1 ( $14.8 \pm 7.1$  vs.  $\pm 0.9$ ), FAP ( $2 \pm 0.6$  vs.  $1 \pm$

0.4), ACTA2 ( $2.8 \pm 1.4$  vs.  $1 \pm 0.44$ ) y TNC ( $2.9 \pm 0.6$  vs.  $1 \pm 0.44$ ). Por tanto, los perfiles de activación de ambas líneas de fibroblastos al incubarlos con TGF- $\beta$  son muy similares.

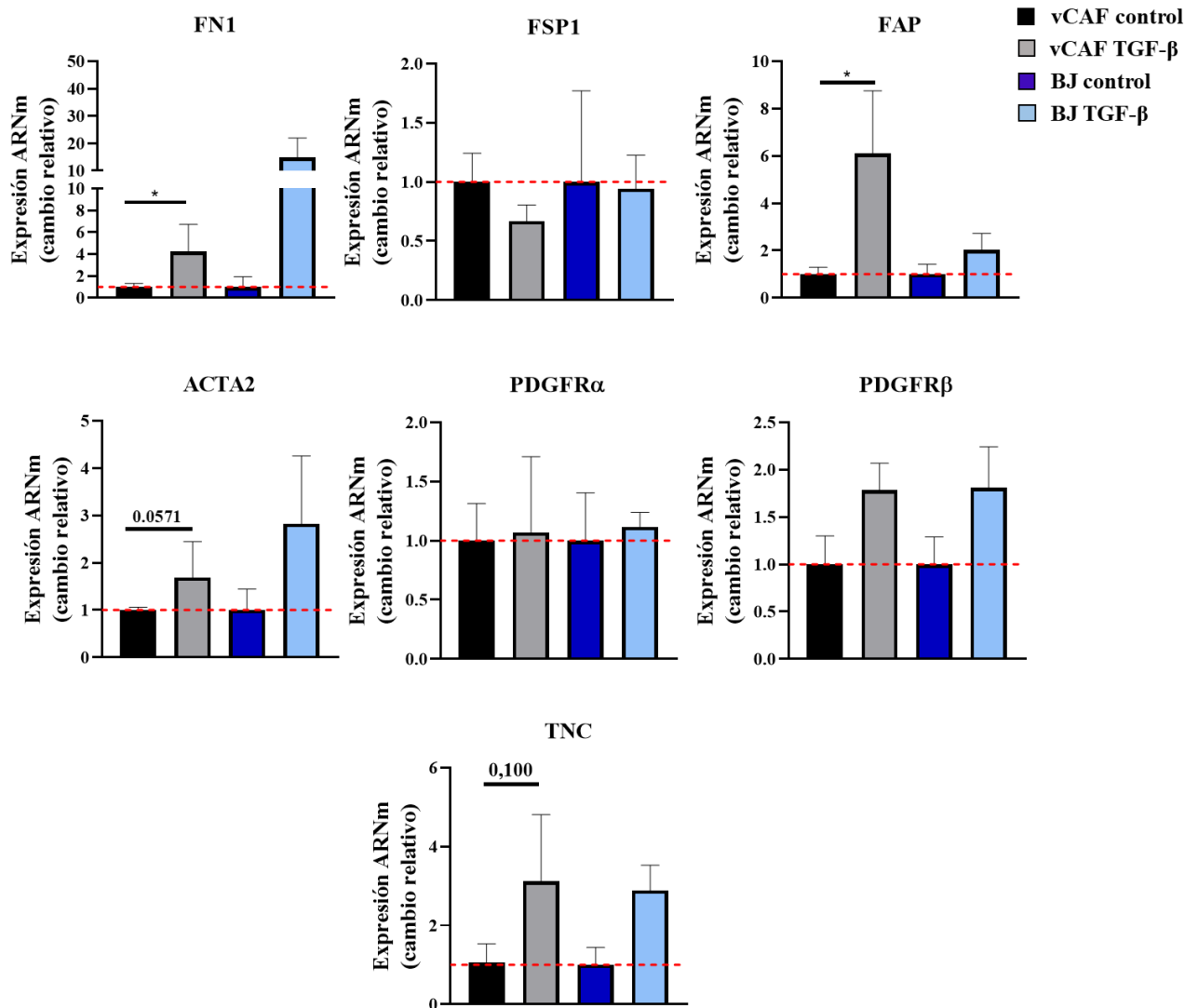


Figura 38. Cambios en la expresión génica de los marcadores de activación de fibroblastos para la línea vCAF<sup>mCherry</sup> control (negro) y tratada con 5 ng/mL durante 48 horas (gris), y la línea BJ control (azul oscuro) y tratada con 5 ng/mL durante 48 horas (azul claro). Los marcadores estudiados son: FN1, FSP1, FAP, ACTA2, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$  y TNC. Los niveles de expresión se muestran como 2 elevado a la potencia negativa del  $\Delta$ Ct de las poblaciones tratadas dividido entre 2 elevado a la potencia negativa del  $\Delta$ Ct de las poblaciones control.

Pese a que la línea vCAF<sup>mCherry</sup> fue establecida a partir de fibroblastos procedentes de tumor, su perfil de expresión génica respecto a los marcadores de activación propios de CAF, así como su respuesta al TGF- $\beta$ , sugieren que estos fibroblastos no tienen un fenotipo “activado” y que necesitan de estímulos para su activación.

Además de estudiar la expresión del ARN mensajero de los marcadores de activación de vCAF<sup>mCherry</sup>, se estudió la expresión proteica de los marcadores FAP y  $\alpha$ -SMA (codificada por el gen ACTA2) en las líneas de fibroblastos en respuesta a TGF- $\beta$ .

El tratamiento de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> con TGF- $\beta$  produce cambios en la expresión y distribución de  $\alpha$ -SMA y FAP. Respecto a  $\alpha$ -SMA, la señal detectada es mucho mayor en las células tratadas con TGF- $\beta$  y dicha señal se muestra mucho más localizada y

organizada en microfilamentos (**figura 39**). Respecto a la proteína FAP, tras el tratamiento con TGF- $\beta$  se observa un aumento en su localización en torno al núcleo celular.

En el caso de la línea BJ, parece que el tratamiento con TGF- $\beta$  también produce un aumento de la señal de  $\alpha$ -SMA respecto a las líneas sin tratar, aunque no se observa una organización de la proteína en microfilamentos como en el caso de la línea vCAF. Por otro lado, se aprecia también un aumento de la expresión de FAP en las células BJ tratadas con TGF- $\beta$ , pero no se observan cambios en su localización dentro de la célula (**figura 39**).

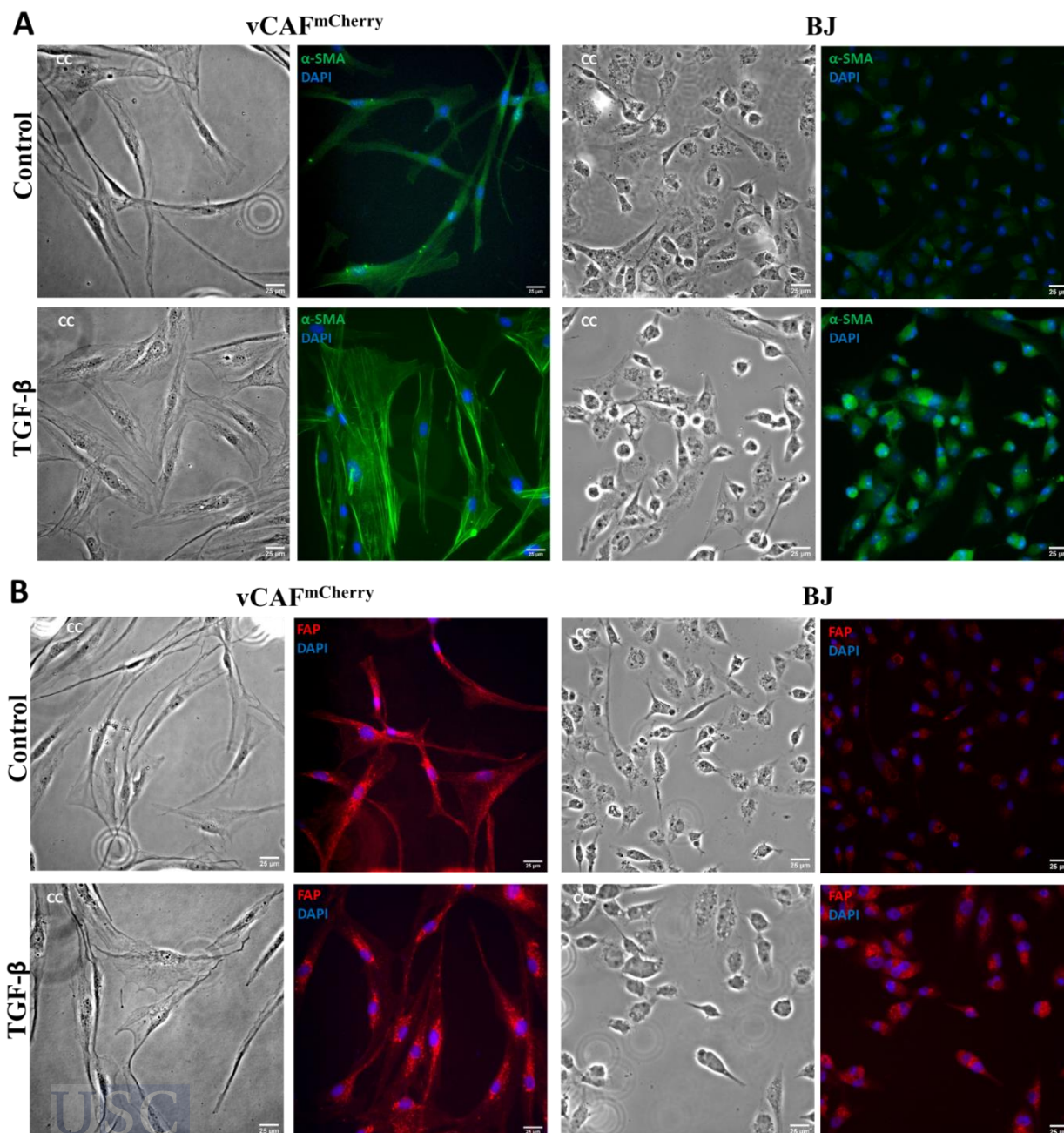


Figura 39. Expresión proteica de  $\alpha$ -SMA y FAP en las líneas vCAF<sup>mCherry</sup> y BJ control y tratadas con 5 ng/mL de TGF- $\beta$  durante 48 horas. A. Imágenes de vCAF<sup>mCherry</sup> y BJ en cultivo en campo claro y detección de la señal fluorescente producida con un anticuerpo anti-  $\alpha$ -SMA (verde). Los núcleos están marcados con DAPI (azul). B. Imágenes de vCAF<sup>mCherry</sup> y BJ en cultivo en campo claro y detección de la señal fluorescente producida con un anticuerpo anti- FAP (rojo lejano). Los núcleos están marcados con DAPI (azul). Barra de escala: 25  $\mu$ m.

En base a los resultados obtenidos, podemos decir que línea vCAF<sup>mCherry</sup> no presenta un perfil molecular de activación, pero sí que es capaz de adquirirlo mediante el tratamiento con TGF-β.

En consecuencia, nos planteamos realizar una serie de ensayos, *in vitro* y en el pez cebra, para estudiar la capacidad de diseminación e invasión de las células tumorales MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en presencia de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> activada por TGF-β.

En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de migración en insertos Transwell® con clústeres heterotípicos formados por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> control o activados por TGF-β. Se observó un mayor número de células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> migradas en los cocultivos cuyos fibroblastos fueron tratados con TGF-β respecto a los cocultivos de fibroblastos sin tratar (912 ± 93.07 vs. 598.25 ± 190.06; p=0.057) (**figura 40**). De este modo, podemos señalar que la activación de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> con TGF-β induce un cambio fenotípico sobre los fibroblastos capaz de favorecer la migración de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>.

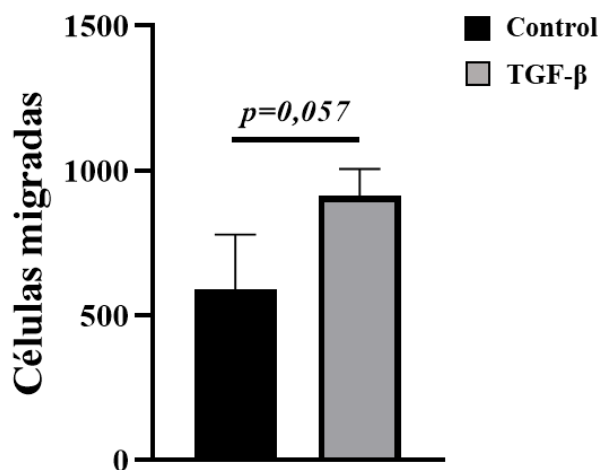


Figura 40. Células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> migradas a través de insertos Transwell® de cultivos heterotípicos formados por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> sin tratar (negro) y MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> tratadas con TGF-β (gris). N=2.

Por otro lado, se llevó a cabo un xenotrasplante de clústeres heterotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> y MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> tratados con TGF-β, con el objetivo de estudiar el comportamiento de las células tumorales diseminadas a la cola en presencia de ambas poblaciones de vCAF<sup>mCherry</sup>.

En concordancia con el ensayo de migración *in vitro*, la activación de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> con TGF- $\beta$  provoca una mayor diseminación de células tumorales en la cola de los embriones en comparación con aquellos vCAF<sup>mCherry</sup> sin tratar ( $5.17 \times 10^5 \pm 3.39 \times 10^5$  vs.  $3.19 \times 10^5 \pm 2.51 \times 10^5$ ) (**figura 41**). Estos resultados indican que la activación de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> con el TGF- $\beta$  parece estar produciendo un fenotipo pro-invasivo que potencia la diseminación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>.

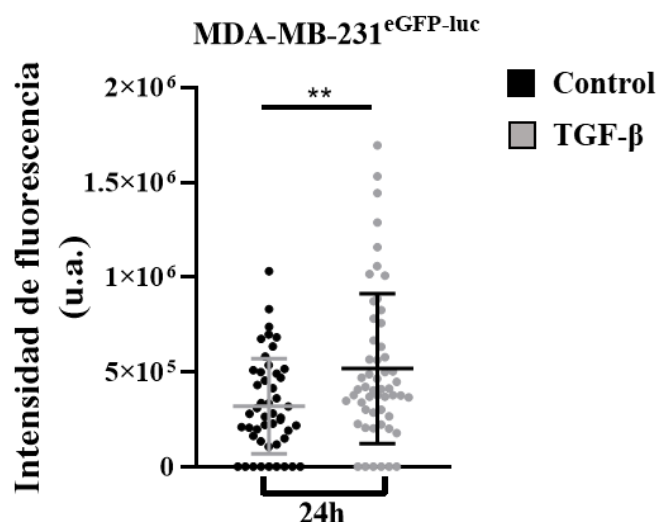


Figura 41. Efecto de la activación con TGF- $\beta$  sobre los vCAF<sup>mCherry</sup> en la diseminación de las MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en xenotrasplantes de clústeres heterotípicos en embriones de pez cebra. Intensidad de fluorescencia detectada en las colas de embriones xenotrasplantados con clústeres heterotípicos formados por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> sin tratar (negro) y clústeres heterotípicos formados por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> tratados (gris), a 24 horas tras el xenotrasplante. Cada punto representa un pez. N=1.

Este conjunto de resultados muestra que la línea vCAF<sup>mCherry</sup> es capaz de adquirir un fenotipo potenciador de la invasión tumoral en respuesta a estímulos del ambiente tumoral como el TGF- $\beta$ , lo que estaría indicando una comunicación ineficiente entre estos fibroblastos y las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, lo que podría explicar algunos de los resultados anteriormente mostrados donde la acción de los fibroblastos sobre las células tumorales es limitada.

## 5. EFECTO DE LOS vCAF<sup>mCherry</sup> SOBRE LA GENERACIÓN DE CTC Y CLÚSTERES DE CTC EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA

Diversos estudios sugieren que los fibroblastos asociados a cáncer pueden estar implicados en la formación y diseminación de los clústeres de CTC<sup>200</sup>. En base a esto, nuestra hipótesis de trabajo supone que si los CAF tienen un efecto beneficioso sobre la invasión de las células tumorales (efecto observado en los ensayos *in vitro*), el número de CTC y clústeres de CTC podría verse incrementado. Asimismo, se podría esperar la detección tanto de clústeres homotípicos como heterotípicos. Con el objetivo de estudiar el efecto de los vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la generación de CTC y clústeres de CTC, así como el crecimiento tumoral y la metástasis, se realizaron xenotrasplantes en el tejido graso de la mama de ratones SCID-beige con poblaciones celulares homotípicas formados por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y heterotípicas formados por MDA-

MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>. El seguimiento de la progresión del crecimiento de las células tumorales se realizó mediante la detección de la señal bioluminiscente producida por la luciferasa.

### 5.1. Los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> ralentizan el crecimiento tumoral y la formación de metástasis

En primer lugar, se generaron xenotrasplantes con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> en una proporción 1:1 y se estudió tanto la progresión tumoral como el crecimiento metastásico en los pulmones en comparación con el grupo de ratones control xenotrasplantados con las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>. En estos experimentos, se analizaron un total de veinticuatro ratones, doce por grupo experimental, de los cuales todos desarrollaron tumor primario en torno a la semana tres. Respecto a la detección de metástasis pulmonar, la mayoría de ratones mostraron metástasis pulmonar entre las semanas seis y ocho. Sin embargo, tres de los ratones xenotrasplantados con poblaciones celulares homotípicas y dos de aquellos xenotrasplantados con heterotípicas no desarrollaron metástasis pulmonar detectable a lo largo del experimento.

La **figura 42** muestra que existe un retardo en el crecimiento tumoral del grupo xenotrasplantado con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> respecto al xenotrasplantado con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, si bien no hay diferencias estadísticamente significativas. Asimismo, los volúmenes del tumor primario a tiempo final, medidos a través de la señal bioluminiscente, no muestran diferencias significativas en su tamaño ( $3.2 \times 10^7 \pm 3.1 \times 10^7$  en ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> vs.  $1.9 \times 10^7 \pm 2.5 \times 10^7$  en ratones inyectados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>). Respecto a los volúmenes de metástasis pulmonar, tampoco se aprecian diferencias en la bioluminiscencia detectada, siendo de  $8.4 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^6$  para los ratones xenotrasplantados con clústeres homotípicos y  $9.2 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^6$  para los ratones inyectados con poblaciones heterotípicas.

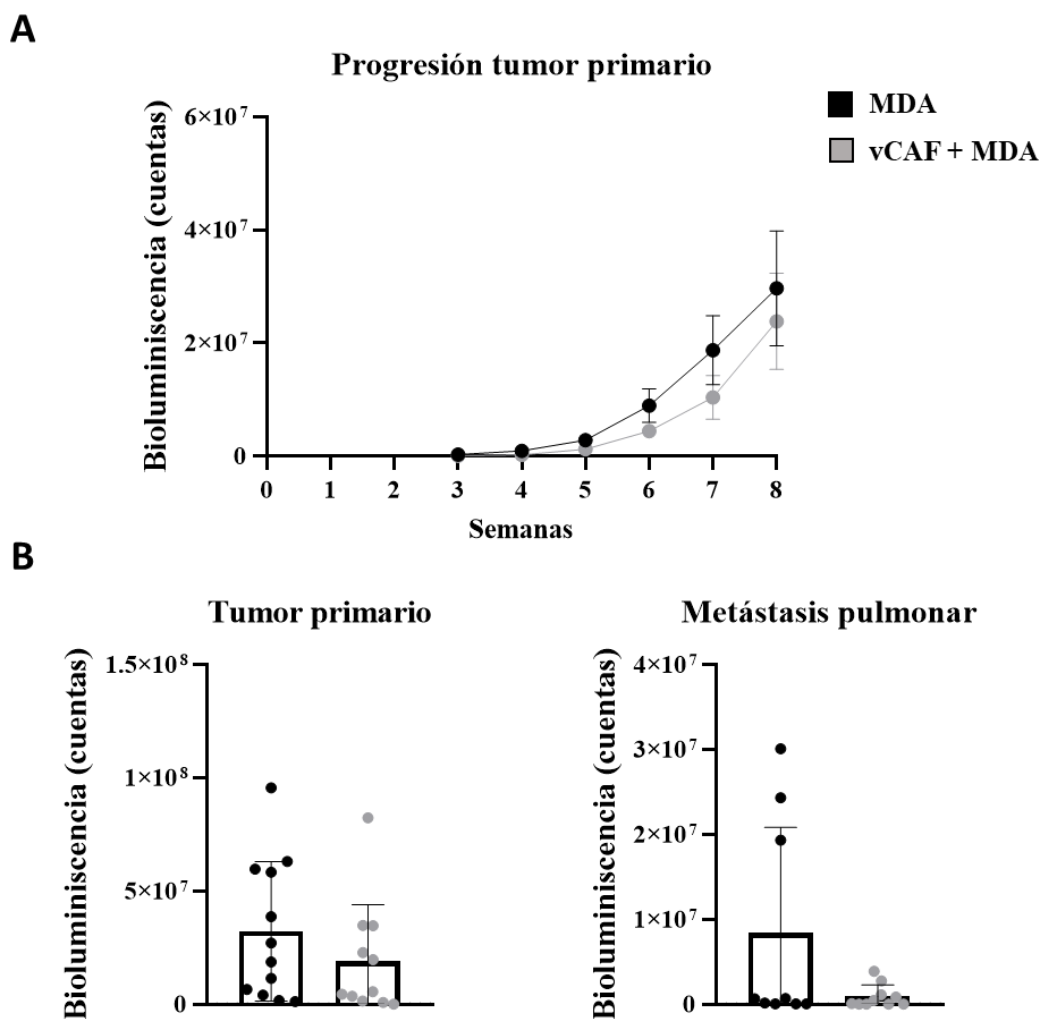


Figura 42. Efecto de los vCAF<sup>mCherry</sup> sobre el crecimiento tumoral y metastásico de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en un xenotrasplante ortotópico en ratones SCID-beige. A. Progresión tumoral a lo largo del tiempo, medida mediante la señal de bioluminiscencia, en ratones xenotrasplantados con la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> (negro) y ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> (gris). B. Volúmenes finales de tumor primario y de metástasis pulmonar medidos mediante la señal de bioluminiscencia, en ratones xenotrasplantados con la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> (negro) y ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> (gris).

Con el objetivo de determinar si el número de vCAF<sup>mCherry</sup> presente en el xenotrasplante afectaba al crecimiento tumoral y la incidencia de metástasis, se realizó un ensayo con una ratio diferente de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>. En este caso, se utilizó una proporción 1,5:1 (fibroblasto: célula tumoral).

Los resultados nos permitieron observar un claro impacto negativo de las células vCAF<sup>mCherry</sup> sobre el crecimiento tumoral de ratones xenotrasplantados. Así, se observó un descenso casi significativo ( $p=0.08$ ) del volumen tumoral al final del experimento en los ratones inyectados con poblaciones celulares heterotípicas ( $3.4 \times 10^6 \pm 6.3 \times 10^6$ ) respecto a los ratones inyectados con homotípicas ( $2 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^7$ ). Además, existen grandes diferencias entre la metástasis. En el caso de los ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, solo uno de ellos desarrolló metástasis a lo largo del experimento ( $9.3 \times 10^3$ ),

mientras que cinco de seis ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> desarrollaron lesiones metastásicas cuantificables ( $6.6 \times 10^4 \pm 4.1 \times 10^4$ ) (figura 43).

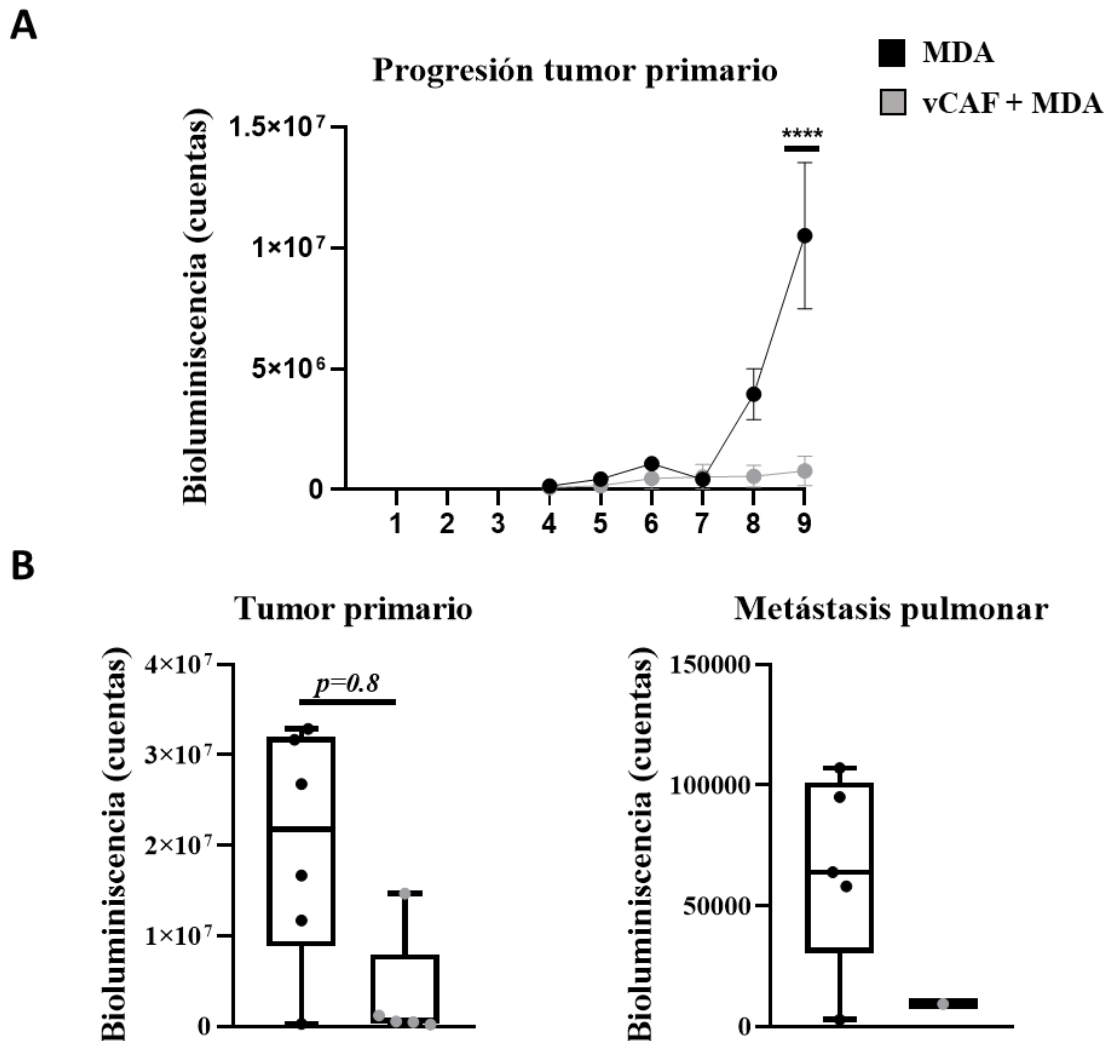


Figura 43. Efecto de los vCAF<sup>mCherry</sup> sobre el crecimiento tumoral y metastásico de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en un xenotrasplante ortotópico en ratones SCID-beige. A. Progresión tumoral a lo largo del tiempo, medida mediante la señal de bioluminiscencia, en ratones xenotrasplantados con la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> (negro) y ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> (gris). B. Volúmenes finales de tumor primario y de metástasis pulmonar medidos mediante la señal de bioluminiscencia, en ratones xenotrasplantados con la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> (negro) y ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> (gris).

En conjunto, estos resultados nos indica que la presencia de vCAF<sup>mCherry</sup> en el xenotrasplante ortotópico en este modelo murino no potencia el crecimiento tumoral o las capacidades metastásicas de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>. Al contrario, se observa una ralentización del crecimiento tumoral y metastásico en los individuos xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, efecto dependiente del número de fibroblastos inyectados, llegando a detectarse un descenso significativo a tiempo final en la señal tumoral y metastásica comparado con los ratones inyectados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> cuando la ratio de inyección es 1:1,5.

## 5.2. Efecto de los vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la generación de CTC y clústeres de CTC

Mediante el uso de técnicas de biopsia líquida, se llevó a cabo el estudio de las CTC y clústeres de CTC encontrados en la sangre de los ratones xenotrasplantados con poblaciones celulares homotípicas y heterotípicas en ratio 1:1. Para ello, se extrajo la sangre mediante punción cardíaca de los animales a término y se analizó la presencia de CTC individuales, clústeres homotípicos y heterotípicos, así como de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> circulantes (en el caso de xenotrasplantes heterotípicos) utilizando el sistema Parsortix<sup>TM</sup>. Mediante la expresión de las proteínas fluorescentes eGFP y mCherry presentes en las líneas celulares MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, se pudo identificar estas células en sangre. Debido al bajo volumen tumoral y la pobre incidencia de metástasis, no se llevó a cabo este análisis en todos los ratones del experimento.

En la **figura 44A y B**, se muestra la presencia de CTC y fibroblastos en la sangre extraída de ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>. El 78.7% de los ratones del grupo heterotípico y el 91.7% de los ratones del grupo homotípico muestran CTC en sangre. Asimismo, se detecta un mayor número de CTC individuales que de clústeres en ambos grupos, representando estos últimos en torno al 13% de las CTC detectadas en total. Por otro lado, se detectan fibroblastos en el 33% de los ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, demostrando la diseminación de este tipo celular. Sin embargo, en solo uno de los ratones con xenotrasplantes heterotípicos se encontraron en la sangre clústeres heterotípicos formados por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, siendo estos solo un 7 % del total de clústeres de CTC detectado en ese individuo. Esto parece indicar que de forma mayoritaria ambos tipos celulares no diseminan juntos en clústeres heterotípicos.

Hay que destacar que estos datos muestran una tendencia a una menor cantidad de CTC individuales aisladas en el grupo heterotípico respecto al grupo homotípico ( $31.2 \pm 32.5$  vs.  $54 \pm 80.1$  CTC individuales/100  $\mu$ L), lo cual podría estar relacionado con el retardo observado en el crecimiento tumoral de los ratones xenotrasplantados con poblaciones celulares heterotípicas (**figura 44C y D**). Por otro lado, el número de clústeres detectados es similar entre ambos grupos ( $6.6 \pm 9.6$  vs.  $5.5 \pm 5.2$  clústeres de CTC/100  $\mu$ L) (**figura 44D**).

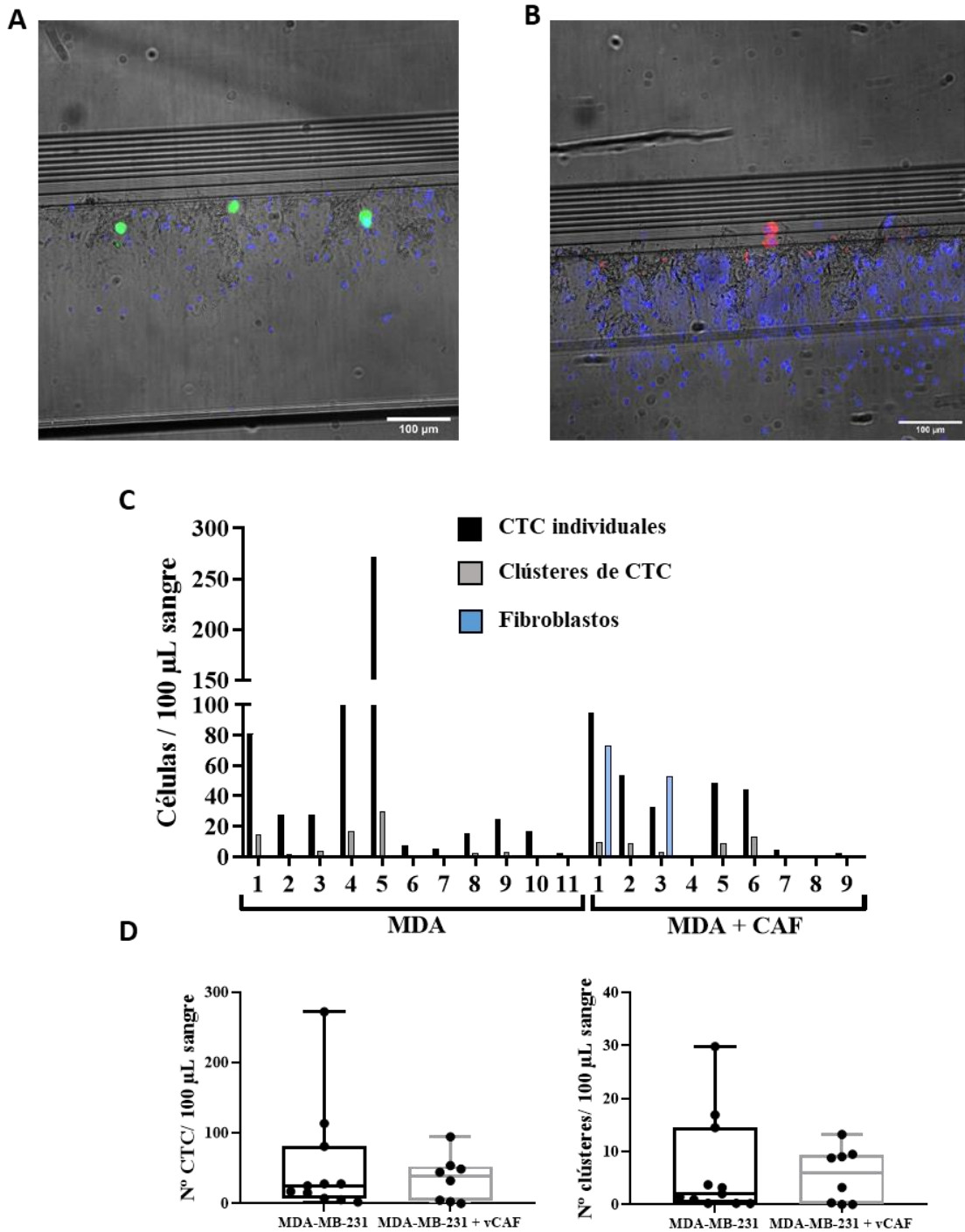


Figura 44. Detección de CTC individuales, clústeres y fibroblastos en la sangre de los ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> + vCAF<sup>mCherry</sup>. A. Imagen representativa de CTC capturadas por el sistema Parsortix<sup>TM</sup>, observándose en verde la célula tumoral y en azul los núcleos marcados por DAPI. B. Imagen representativa de un clúster de vCAF<sup>mCherry</sup> circulantes capturado por el sistema Parsortix<sup>TM</sup>, observándose en rojo los fibroblastos y en azul los núcleos marcados por DAPI. C. Cuantificación de CTC (negro), clústeres de CTC (gris) y fibroblastos (azul) en la sangre de los ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> + vCAF<sup>mCherry</sup>. Los datos se muestran como el número de células por cada 100 µL de sangre. D. Número de CTC individuales y clústeres de CTC por 100 µL de sangre. Cada punto representa un ratón.

La enumeración de las poblaciones circulantes en sangre nos permitió observar que en los ratones xenotrasplantados con vCAF<sup>mCherry</sup> se observa una tendencia a detectar clústeres de CTC con mayor frecuencia. Por tanto, estudiamos la relación entre el número de CTC individuales y clústeres de CTC en ambos grupos experimentales.

Mediante análisis de regresión lineal, se puede observar que existe una correlación directa entre el número de CTC y clústeres de CTC encontrados en la sangre de ratones xenotrasplantados con células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> ( $R^2= 0.94$ ). Sin embargo, en ratones xenotrasplantados también con fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>, esta correlación no es tan clara ( $R^2= 0.64$ ), indicando que la relación entre el número de clústeres y CTC individuales no es proporcional (**figura 45A**). Así, puede observarse que la relación clústeres de CTC/ CTC muestra una tendencia al alza en la sangre de ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> respecto a los xenotrasplantados exclusivamente con células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> ( $0.16 \pm 0.03$  vs  $0.09 \pm 0.01$ ) (**figura 45B**).

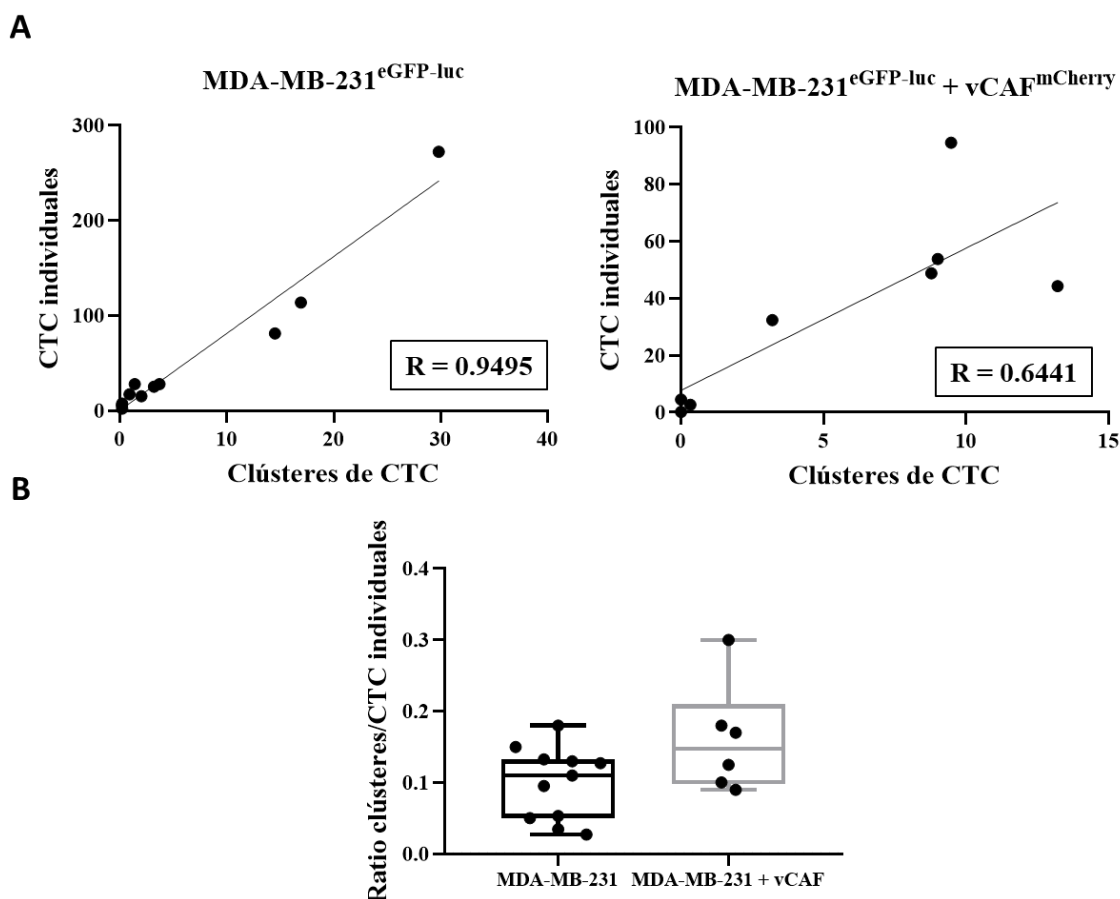


Figura 45 A. Correlación entre el número de CTC individuales y clústeres de CTC en la sangre de los ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> + vCAF<sup>mCherry</sup> A. Pendiente de la curva generada por la relación entre el número de clústeres de CTC y CTC individuales detectadas en la sangre de ratones con xenotrasplantes homotípicos y heterotípicos. B. Relación entre el número de clústeres de CTC y CTC individuales en ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> (negro) y MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> + vCAF<sup>mCherry</sup> (gris). Cada punto representa un ratón.

Estos resultados nos indican que la presencia de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> en el tumor primario parece afectar de forma positiva a la generación o liberación de clústeres de CTC a la sangre de estos ratones.

En conjunto, los resultados obtenidos en los xenotrasplantes ortotópicos de ratón nos muestra que la presencia de vCAF<sup>mCherry</sup> junto a las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en el tumor primario tiene un efecto ralentizador sobre el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. Sin embargo, estos fibroblastos podrían estar implicados en la formación y/o liberación de clústeres de CTC a la circulación, si bien apenas se ha podido observar la incidencia de clústeres heterotípicos. No obstante, este modelo experimental presenta limitaciones que no nos han permitido estudiar mejor el papel de los vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la génesis de los clústeres de CTC. Por ese motivo nos planteamos llevar a cabo ensayos *in vitro* con el fin de determinar un posible papel de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la clusterización de las células tumorales.

### **5.3. La interacción específica entre MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> favorece la agregación celular, pero no da lugar a estructuras conjuntas específicas**

Se realizaron ensayos de agregación con la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en presencia de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> para estudiar un posible efecto de los fibroblastos sobre la clusterización de las células tumorales. Para ello, se sembraron fibroblastos y células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en proporción 1:2 en placa de baja adherencia y se sometieron a agitación durante una hora. Posteriormente, se estableció el índice de agregación con la siguiente fórmula: “1- (nº células individuales a tiempo final/nº de células individuales a tiempo inicial)”.

El índice de agregación de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> es mucho mayor cuando se siembra junto a la línea vCAF<sup>mCherry</sup> ( $0.71 \pm 0.02$ ) que cuando se siembran solas ( $0.05 \pm 0.08$ ) (**Figura 46**), indicando un gran efecto agregador sobre la línea tumoral por parte de los fibroblastos. Además, se realizó un control con un mayor número de células tumorales para comprobar si la agregación observada en la población heterotípica se debía al mayor número de células totales presentes en el ensayo. No obstante, el índice de agregación obtenido para este control (0.36), pese a ser mayor que el de la población homotípica, no llegó al nivel de la población heterotípica. Hay que destacar, no obstante, que la agregación observada en los cultivos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y fibroblastos es tanto homotípica como heterotípica, es decir, que los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> se detectan formando clústeres heterotípicos con las células tumorales. Este resultado indicaría que los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> pueden ejercer un papel regulador sobre la formación de clústeres de CTC, pero no concordaría con los resultados obtenidos en los xenotrasplantes ortotópicos en ratón, en cuya sangre apenas se detectaron clústeres de CTC heterotípicos.

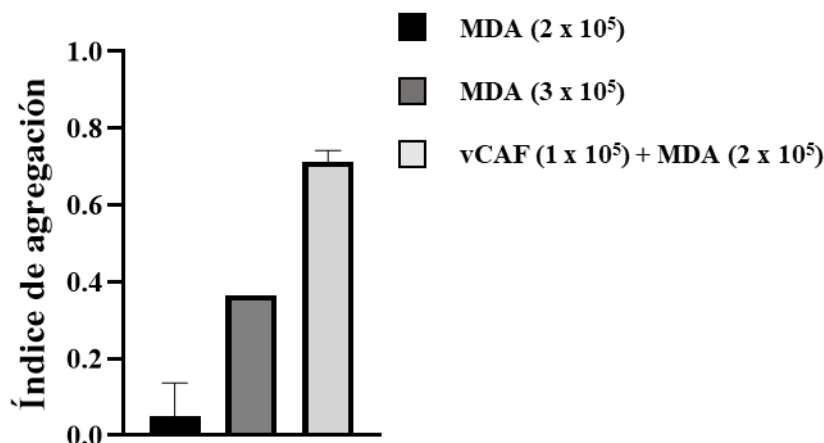


Figura 46. Índice de agregación de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> como población homogénea (negro), en control de exceso (gris oscuro) y junto a vCAF<sup>mCherry</sup> (gris claro).

Debido a esta discrepancia, y a las características del experimento en el que la agregación se produce en una hora, se llevaron a cabo ensayos de formación de esferoides con las líneas MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>. En estos experimentos, las células son incubadas durante cinco días en condiciones de no adherencia, por lo que además de las interacciones célula-célula, se evalúa la capacidad de formas agregados sólidos en estructuras más complejas. Además, se ha descrito que las células tumorales pueden unirse a fibroblastos activados, dando lugar a esferoides que poseen un mayor potencial metastásico<sup>201</sup>. Por tanto, se llevaron a cabo ensayos de formación de esferoides con cocultivos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, los cuales fueron cultivados en gotas con MammoCult<sup>TM</sup> durante una semana, un medio optimizado para el cultivo de mamosferas (método “hanging drop”).

En estos experimentos se observa que la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> no es capaz de formar esferoides en las gotas cultivadas (**figura 47A**), mientras que la línea vCAF<sup>mCherry</sup> sí es capaz de formar estas estructuras (**figura 47B**). Respecto a los cocultivos, no se observa la aparición de esferoides formados exclusivamente por las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, sino que los esferoides aparecen formados por un núcleo de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>, con las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> situadas alrededor, como formando una capa exterior (**figura 47C y D**).

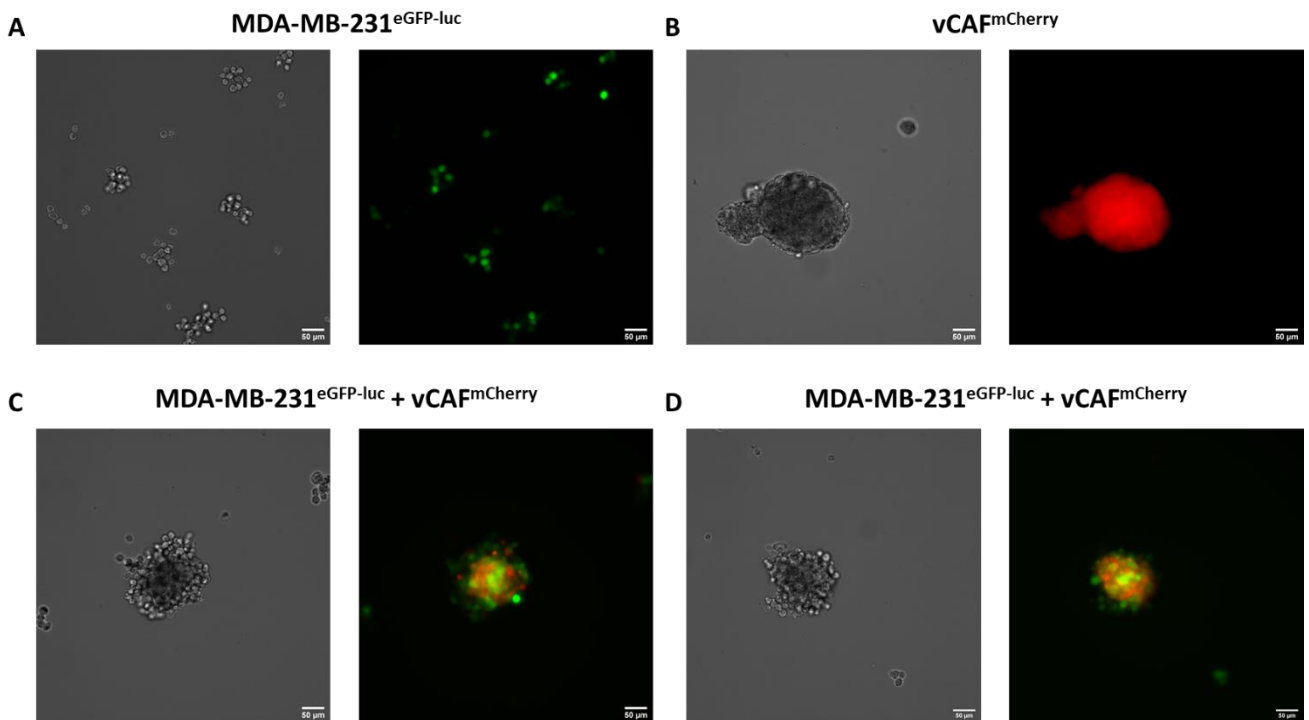


Figura 47. Ensayo de formación de esferoides a partir de cultivos de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> (A), cultivos de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> (B) y cocultivos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> (C y D).

Este resultado podría indicar que, si bien los vCAF<sup>mCherry</sup> pueden estar implicados en la agregación de células tumorales, la disposición de ambos tipos celulares en los esferoides resultantes no favorecería la migración conjunta y, por tanto, la formación de clústeres heterotípicos. Sin embargo, para demostrar esta idea, serían necesarios experimentos de invasión a partir de los esferoides. Asimismo, se deberían realizar experimentos adicionales para demostrar la implicación directa de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> en la formación de clústeres de CTC y en su aparición en la sangre de los ratones xenotrasplantados.



# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

El conocimiento actual pone a las CTC como principales responsables de la metástasis, y en particular a los clústeres de CTC. Diversos estudios han mostrado que los clústeres de CTC tienen un mayor potencial metastásico que las CTC individuales<sup>26,27,35</sup>, convirtiendo a estos grupos de células en importantes marcadores de pronóstico de la enfermedad metastásica. Por otro lado, las CTC que viajan en el torrente sanguíneo, así como las que consiguen extravasar a una localización distante del tumor primario, no siempre actúan en solitario, sino que pueden estar ayudadas por células del microambiente tumoral, tales como células inmunes, células endoteliales y fibroblastos asociados a cáncer<sup>14</sup>. Estas células del microambiente pueden jugar un papel crucial en el desarrollo metastásico, neutralizando vías de muerte celular, alterando el metabolismo energético de las células tumorales o ayudándolas a evadirse del sistema inmune<sup>14</sup>.

El aislamiento y la caracterización de los clústeres de CTC de pacientes de cáncer y modelos animales ha revelado que pueden estar formados exclusivamente por CTC (clústeres homotípicos) o que estas pueden viajar acompañados de células no tumorales (clústeres heterotípicos)<sup>72</sup>. Además, estudios previos han reflejado que la interacción de las CTC con las células del microambiente condiciona su potencial metastásico<sup>52,69,79</sup> y en particular, la interacción con los fibroblastos asociados a cáncer (CAF) ejerce una mejora en la supervivencia y el potencial metastásico de las CTC<sup>111,119,128,202,203</sup>.

El estudio de las CTC, y en especial de los clústeres, es crucial para entender la naturaleza del proceso metastásico. La biopsia líquida surge como una técnica que permite la detección de estas CTC en la sangre de pacientes y ya se le ha otorgado un valor pronóstico en diversos tipos de cánceres, como mama, próstata, colorrectal o pancreático<sup>24</sup>. Sin embargo, se estima que solo el 2-5% de las CTC son clústeres<sup>25</sup>, lo que supone una importante limitación para su estudio. Por tanto, el desarrollo de modelos que reflejen el comportamiento de los clústeres de CTC, así como su interacción con células del microambiente tumoral, es esencial para el estudio de estas agrupaciones celulares y entender las características fenotípicas que los hacen ser más metastásicos que las CTC individuales.

En la presente tesis doctoral, desarrollamos un modelo *in vitro* de clústeres de CTC homotípicos de células tumorales a partir de las líneas tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup>, y clústeres heterotípicos formados asimismo por fibroblastos asociados a cáncer (vCAF<sup>mCherry</sup>) y fibroblastos normales (BJ). Otros grupos de investigación han demostrado el valor de las líneas tumorales de cáncer de mama y otros tipos tumorales para el estudio de los clústeres de CTC<sup>26,29,204</sup>, incluido nuestro grupo<sup>193</sup>. Con el objetivo de estudiar la interacción de los fibroblastos asociados a cáncer con las células tumorales, se llevaron a cabo una serie de ensayos *in vitro* que servirían como modelo de las distintas fases del proceso metastásico: ensayos de proliferación, cierre de herida, colonogénesis y migración.

Los resultados de los ensayos funcionales *in vitro* muestran un comportamiento diferente para ambas líneas tumorales en presencia de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>, tanto cuando forman parte del cultivo como cuando forman parte de los clústeres. Así, la

presencia de estos fibroblastos en el cocultivo provoca una ralentización del crecimiento celular y una menor capacidad de migración en los ensayos de cierre de herida para la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, y se observa un menor tamaño de colonias formadas sobre agar por clústeres heterotípicos en comparación con los homotípicos. Por otro lado, se da el efecto contrario en la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup>, la cual ve aumentada su ritmo de proliferación y su capacidad de migración en presencia de estos fibroblastos, así como se observa la formación de un mayor número de colonias por los clústeres heterotípicos comparado con los homotípicos. Asimismo, la magnitud de dichos efectos es dependiente de la proporción fibroblasto: célula tumoral en el cultivo, siendo mayor cuantos más fibroblastos haya. Por otro lado, en los ensayos de migración/invasión en Transwell<sup>®</sup> se puede apreciar una mayor migración por parte de los clústeres heterotípicos de células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en comparación con los clústeres homotípicos.

La diferencia de fenotipos entre ambas líneas tumorales podría explicar los resultados observados en los ensayos *in vitro*. La línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> posee un fenotipo epitelial mientras que la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, pese a su origen epitelial, tiene rasgos mesenquimales debido a un fenómeno de transición epitelio-mesénquima (TEM), lo que le confiere una alta capacidad proliferativa e invasiva, y por tanto una mayor demanda metabólica. La interacción de estas dos líneas celulares, MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, podría ralentizar el crecimiento de la línea tumoral en el cocultivo debido a una competición por los nutrientes presentes en el medio. Además, el efecto negativo sobre la proliferación se ve potenciado por el mayor número de fibroblastos presentes. En este sentido, cabe mencionar que ensayos similares realizados por Dvorak et al. utilizando medios condicionados de una línea de CAF derivada de un tumor de mama, mostraron una disminución en la tasa de proliferación de las células MDA-MB-231 comparado con cultivos con medio normal<sup>205</sup>. Por el contrario, la interacción de una línea de fenotipo epitelial y otra mesenquimal, MCF7<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, mejora la proliferación de la línea tumoral, estando este efecto condicionado también por la ratio de fibroblasto: célula tumoral.

El menor cierre de la herida observado por la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en cocultivo con vCAF<sup>mCherry</sup> podría estar asociado a la ralentización de la proliferación de la línea tumoral en presencia de los fibroblastos, mientras que la mayor velocidad de cierre de herida mostrada por las MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en cocultivo puede asociarse tanto a la mayor tasa de proliferación observada en cocultivo con los vCAF<sup>mCherry</sup> como a una posible migración dirigida por los fibroblastos, los cuales pueden ejercer de células líder para arrastrar a las células tumorales en la diseminación, tal y como describieron Labernadie et al.<sup>136</sup>. Respecto a los ensayos de colonias, las MCF7<sup>eGFP-luc</sup> poseen una capacidad colonogénica mucho mayor que las MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, debido a su fenotipo epitelial. En este ensayo, los clústeres heterotípicos de MCF7<sup>eGFP-luc</sup> mostraron un mayor número de colonias en comparación con los clústeres homotípicos, sin embargo, no se observaron diferencias notables en el diámetro de las colonias. Este resultado sugiere que, en estas condiciones de no adherencia a sustrato, los vCAF<sup>mCherry</sup> pueden ejercer un efecto positivo sobre la supervivencia de las células MCF7<sup>eGFP-luc</sup> mediante la inhibición de apoptosis inducida por la falta de anclaje a sustrato, más que por ejercer un efecto pro-proliferativo. Observaciones similares fueron hechas por Ubaldo et al., quienes observaron que la supervivencia de las células MCF7 aumentaba en un cocultivo con un modelo de fibroblastos similares a CAF<sup>206,207</sup>. Asimismo, los vCAF<sup>mCherry</sup> podrían estar secretando componentes de la matriz extracelular (MEC) sobre los que las células tumorales pueden crecer<sup>208-210</sup>, explicando el mayor número de colonias observado en los clústeres heterotípicos de MCF7<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>. Sin embargo, las colonias formadas por las MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en presencia de vCAF<sup>mCherry</sup> son mucho más pequeñas que las formadas por las MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en

solitario, efecto que podría ser debido a la ralentización de la proliferación de esta línea tumoral.

Finalmente, el mayor número de células tumorales migradas en los ensayos de migración en *Transwell*<sup>®</sup> en los clústeres heterotípicos podría deberse a la capacidad de los CAF para degradar la membrana basal mediante la secreción de MMP, lo que facilitaría las propiedades de invasión de las células tumorales. Sin embargo, no podemos descartar que dicho efecto no sea debido al mayor número de células totales presentes en los insertos incubados con clústeres heterotípicos, ya que la mayor densidad celular podría estar induciendo una mayor migración tumoral. Este resultado es particularmente relevante para la línea celular MCF7<sup>eGFP-luc</sup>, la cual debido a su conservado fenotipo epitelial presenta una restringida invasión a través del recubrimiento de Matrigel y los poros de la membrana<sup>211</sup>.

Los resultados de los ensayos *in vitro* ponen de manifiesto una respuesta diferencial de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup> a la presencia de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>, así como una modificación de su comportamiento en procesos involucrados en la cascada metastásica. Estos resultados sugieren la existencia de modificaciones en los perfiles moleculares de las células tumorales. Asimismo, se sabe que existe una comunicación bidireccional entre las células tumorales y las células del estroma<sup>212,213</sup>. De hecho, los fibroblastos producen factores solubles en el medio que afectan a las células tumorales, como FGF, HGF, IGF y TGF- $\beta$ <sup>214</sup>, y de igual modo las células tumorales modifican la expresión génica de los fibroblastos<sup>215-217</sup>.

Con el objetivo de caracterizar las líneas MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, MCF7<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> en los cocultivos, se utilizaron insertos de membrana para separar físicamente las células del cocultivo, permitiendo analizar en cada población la expresión de genes asociados al fenómeno de TEM, así como evaluar genes asociados a la activación de fibroblastos. Como cabe esperar, la expresión del marcador epitelial CDH1, que codifica para la molécula de adhesión celular e-cadherina, no se detecta ni en MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> ni en vCAF<sup>mCherry</sup>, mientras que sí muestra expresión en células MCF7<sup>eGFP-luc</sup>. Asimismo, la expresión de los marcadores mesenquimales VIM y CDH2, que codifican para el filamento intermedio vimentina y la proteína de adhesión celular N-cadherina, respectivamente, solo es detectada en los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>, mientras que en las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> solo se detectó la expresión de VIM, demostrando que la transición epitelio mesénquima sufrida por estas células no es completa. Por lo tanto, la expresión de CDH1, CDH2 y VIM detectada está en línea con los fenotipos esperados para estos tipos celulares.

Sin embargo, el cocultivo de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> con las células MCF7<sup>eGFP-luc</sup> no afectó a la expresión de CDH1 ni ejerció un efecto inductor sobre la expresión de CDH2 y VIM, ya que ninguno fue detectado. Este resultado indica que, a pesar de las diferencias funcionales observadas, los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> no inducen una TEM en las células MCF7<sup>eGFP-luc</sup>. De forma similar, la inducción de TEM tampoco se observó en el cocultivo de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> con vCAF<sup>mCherry</sup>. Estos resultados contrastan con datos presentados en la literatura, donde se describe que los CAF son capaces de inducir una transición epitelio-mesénquima en células tumorales de mama<sup>117,218,219</sup>. Asimismo, no se observaron cambios en los niveles de expresión del marcador de “stemness” CD44 en presencia de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>. Esta molécula ha sido recientemente implicada en la formación de agregados celulares entre las células tumorales y los CAF<sup>203</sup>, pero bajo las condiciones experimentales estudiadas (sin interacción física) no sufre ninguna regulación. Independientemente, se observa que los niveles de expresión de CD44 son claramente superiores en la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en comparación con las células

MCF7<sup>eGFP-luc</sup>, correspondiendo con su capacidad metastásica<sup>203</sup>. En conjunto, estos resultados muestran que los factores secretados por la línea vCAF<sup>mCherry</sup> no ejercen un claro efecto sobre la expresión de genes asociados a TEM y agregación celular.

Por otro lado, el análisis de expresión del gen MKI67, que codifica para el marcador de proliferación ki-67, no detectó cambios de expresión en las células tumorales en presencia de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>, lo que no apoyaría las observaciones realizadas en los ensayos de proliferación; si bien este gen se expresa en mayor nivel en células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> que en MCF7<sup>eGFP-luc</sup>, en concordancia con los ritmos de crecimiento de estos tipos celulares. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en los ensayos *in vitro* existía una interacción física directa entre las células tumorales y los fibroblastos, mientras que los cambios de expresión génica son exclusivamente debidos a una comunicación paracrina. Por lo tanto, no es posible establecer una relación causa-efecto entre ambos tipos de ensayos. Además, se estudió la expresión de estos genes en la línea vCAF<sup>mCherry</sup>, observándose una tendencia al descenso en la expresión de CDH2 y VIM por parte de los vCAF<sup>mCherry</sup> cocultivados con las líneas tumorales, especialmente MCF7<sup>eGFP-luc</sup>. La proteína N-cadherina ha sido implicada en la formación de interacciones heterotípicas E-cadherina/N-cadherina entre las células tumorales y los CAF<sup>136</sup>. La falta de interacción física entre los dos tipos celulares en nuestros experimentos podría justificar la disminución de la expresión de CDH2 en los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>. Por otro lado, el descenso de VIM se podría traducir en cambios de organización del citoesqueleto de los fibroblastos o en su adhesión al sustrato y capacidad invasiva<sup>220</sup>. Ensayos específicos con los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> utilizando medios condicionados serían necesarios para demostrar estas hipótesis.

En cuanto a la expresión de genes asociados con la activación de fibroblastos, pudimos observar que la expresión de FSP1 y ACTA2 en los fibroblastos en cocultivo tiende a disminuir, pero no de forma significativa. FSP1 codifica a una proteína implicada en la movilidad celular, del mismo modo que ACTA2, que codifica a la actina de músculo liso *alpha*, por lo que la disminución de ambas podría deteriorar la movilidad de los fibroblastos<sup>221</sup>, e iría en línea con la disminución de VIM. Por otro lado, se puede ver una tendencia a una mayor expresión de FAP en vCAF<sup>mCherry</sup> cuando están en cocultivo con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, la cual codifica para la proteína de activación de fibroblastos, por lo que su mayor expresión podría indicar cierto grado de activación de los fibroblastos en presencia de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>.

Por tanto, nuestros resultados ponen de manifiesto que los factores secretados por las células tumorales de mama y los fibroblastos al medio de cultivo no son capaces de inducir cambios de expresión génica claros sobre marcadores de TEM en las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup> y sobre marcadores de activación de fibroblastos en vCAF<sup>mCherry</sup>. Es posible que esta limitada respuesta o comunicación pueda ser debida al origen de los vCAF<sup>mCherry</sup>, los cuales fueron aislados de un tumor vulvar, y por tanto se trate de una respuesta "dependiente del tejido". Sin embargo, los leves cambios de expresión génica observados podrían verse traducidos en cambios moleculares a nivel proteico, y por tanto funcionales, algo que no hemos evaluado.

La frecuencia de los clústeres de CTC en la sangre de los pacientes es muy escasa<sup>25</sup>, por lo que es necesario desarrollar modelos celulares que reflejen el comportamiento de los clústeres de CTC y las interacciones entre los tipos celulares que ocurren en los clústeres heterotípicos. Por ello, y en base a las modificaciones funcionales observadas en nuestros ensayos *in vitro*, se llevó a cabo la evaluación de la contribución de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> a estas agrupaciones celulares a través de ensayos funcionales en modelos animales.

Inicialmente, se procedió a la optimización del protocolo de generación de clústeres (homotípicos y heterotípicos) así como de las condiciones de xenotrasplante en embriones de

pez cebra. En este proceso de optimización se llevó a cabo una comparación entre dos protocolos diferentes en el que se estudió el comportamiento de poblaciones celulares individualizadas y clústeres celulares, con el fin de validar el modelo de clústeres de CTCs y su capacidad de representar la realidad más cercana a lo que ocurre en los pacientes. Estos estudios nos permitieron establecer las condiciones idóneas de xenotrasplante y determinar una menor capacidad de diseminación de los clústeres en comparación con las células individuales. Así, mientras que la diseminación a la zona ventral de la región caudal del embrión es prácticamente del 100% y similar entre ambas poblaciones, debido al fácil acceso de las células a los grandes vasos presentes en esta zona y que conforman el principal arco de circulación del embrión, se observa una mayor diseminación dorsal y lateral en las células individualizadas comparadas con los clústeres. Esto es debido a que el menor tamaño de las células individuales les permite viajar por los capilares más pequeños del embrión que llevan a las zonas dorsal y lateral. Sin embargo, hemos podido observar clústeres migrados a esas zonas, lo cual se puede explicar mediante la capacidad demostrada por los clústeres de atravesar capilares de pequeño tamaño, reorganizándose en cadenas de célula única que les permite reducir su resistencia hidrodinámica<sup>187</sup>. Asimismo, se observan diferencias en el volumen de células diseminadas a la cola del pez entre la población individual y la población de clústeres, siendo mucho menor en el caso de los segundos. Estos resultados indican que nuestro modelo de clústeres de CTC en combinación con el pez cebra es capaz de reproducir, en cierto grado, la baja frecuencia de clústeres de CTC encontrados en la sangre de pacientes con cáncer y en modelos experimentales de metástasis en ratón en comparación con las CTC individuales<sup>60</sup>. Esta optimización nos ha permitido publicar recientemente un trabajo evaluando la capacidad metastásica de los clústeres de CTC frente a las CTC individuales<sup>193</sup>. Por lo tanto, nuestro modelo de clústeres de CTC es óptimo para el estudio de su biología, y nos permite llevar a cabo una comparativa funcional entre clústeres de CTC homotípicos y heterotípicos respecto a la capacidad metastásica en embriones de pez cebra.

Los xenotrasplantes con la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> muestran una muy baja capacidad de diseminación tanto para los clústeres de CTC homotípicos como heterotípicos, presentando una disminución acusada en el porcentaje de peces que muestran diseminación a las 72 horas tras el xenotrasplante. Este resultado coincide con otros estudios que demostraron que la línea MCF7<sup>eGFP-luc</sup> es pobremente metastásica en el pez cebra, pues al contrario que la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, no puede colonizar el tejido caudal de la cola del embrión y sus células no sobreviven más de 5 días tras ser xenotrasplantadas<sup>192</sup>. Por lo tanto, la presencia de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> en los clústeres con las células MCF7<sup>eGFP-luc</sup> no ejerció un efecto positivo sobre la diseminación de estas. Sin embargo, sí se observan diferencias en la supervivencia de las células MCF7<sup>eGFP-luc</sup> en el sitio de inyección, siendo mayor en presencia de vCAF<sup>mCherry</sup>. Estos resultados coinciden con el resultado obtenido en los ensayos de colonogénesis y muestran que los vCAF<sup>mCherry</sup> parecen estar favoreciendo la supervivencia de las células MCF7<sup>eGFP-luc</sup>. Trabajos previos han descrito que las proteínas de la MEC derivadas de CAF promueven la proliferación y supervivencia de las células tumorales en los tumores primarios<sup>208,209,222,223</sup>. Por otro lado, los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> presentes en los clústeres heterotípicos podrían estar secretando componentes de la MEC a los que las células tumorales se podrían adherir favoreciendo señales de supervivencia dependientes de anclaje al sustrato<sup>208-210,224</sup>.

Previamente hemos demostrado en el modelo de pez cebra que la agregación de las células tumorales en clústeres favorece la supervivencia y proliferación de las mismas durante la diseminación metastásica<sup>193</sup>. En base a este trabajo previo, planteamos el estudio

del papel de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la diseminación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> mediante el xenotrasplante tanto de suspensiones celulares individualizadas homotípicas y heterotípicas como de clústeres. La inyección de suspensiones celulares en el Ducto de Cuvier de los embriones de pez cebra nos permitió observar que los vCAF<sup>mCherry</sup> afectan negativamente a la diseminación de las CTC en la cola de los embriones, así como un descenso en la supervivencia de las mismas en el tiempo. Este resultado está en línea con los resultados obtenidos *in vitro* donde se observaba una disminución de las capacidades proliferativas y migratorias de las MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> cuando son cocultivadas con los vCAF<sup>mCherry</sup>. En contraste, los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> no afectaron de forma significativa a la diseminación de las CTC cuando fueron inyectadas como clústeres heterotípicos, lo que indicaría que las interacciones célula tumoral-fibroblasto en los clústeres, a pesar de no tener un papel potenciador sobre la invasión tumoral, sí están ejerciendo una regulación sobre la misma. No obstante, cabe destacar que se observó una tendencia hacia una menor diseminación de los clústeres heterotípicos, lo que fue acompañado de una menor incidencia de frentes de invasión cuando los clústeres fueron inyectados en el espacio perivitelino. Asimismo, la comparación de ambos diseños experimentales nos permitió observar que la agregación de las células tumorales en los clústeres de CTC favorece su supervivencia, efecto que fue independiente de la presencia de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>. Este resultado coincide con nuestros resultados previos y con la mayor supervivencia atribuida a los clústeres de CTC en el sistema circulatorio<sup>24,193</sup>; incluso estudios clínicos han demostrado la baja incidencia de las CTC apoptóticas dentro de los clústeres homotípicos comparados con las CTC individuales<sup>35,39,42</sup>.

Sin embargo, el efecto observado en presencia de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> no coincide con estudios anteriores en los que se ha demostrado que diversas poblaciones de CAF aumentan las capacidades metastásicas de células de cáncer de mama cuando son xenotrasplantadas en modelos de pez cebra y murinos, aumentando el número de lesiones metastásicas<sup>137,210,225</sup>. Estas discrepancias podrían deberse al distinto tejido de origen de los fibroblastos y las células tumorales, que podría limitar la intercomunicación entre ambos tipos celulares, y que por otro lado podría condicionar el grado de activación de los fibroblastos<sup>226</sup>. En este sentido, el comportamiento de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> en nuestros ensayos funcionales y moleculares es en cierto grado semejante al comportamiento de fibroblastos normales no activados, los cuales pueden ejercer un efecto negativo sobre el crecimiento y progresión tumoral<sup>210,227</sup>. Por otro lado, los resultados de distintos trabajos plantean la posibilidad de que los CAF pueden ser poblaciones muy heterogéneas capaces de ejercer funciones antitumorales y protumorales, y que éstas pueden depender del tipo de tumor<sup>226,228,229</sup>. Por ejemplo, en el cáncer de mama se ha descrito la existencia de subpoblaciones de CAF especializadas, con funciones tanto pro-proliferativas y pro-invasivas como no, y con perfiles de expresión génica y molecular diferentes<sup>100,230,231</sup>.

Nuestros ensayos en pez cebra comparando la capacidad de diseminación de los clústeres homotípicos con los clústeres heterotípicos formados por los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> y los fibroblastos BJ muestran resultados muy similares para ambas poblaciones de fibroblastos, donde no se observan cambios significativos sobre la diseminación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>. Dichos resultados confirman que, a pesar de la procedencia tumoral de la línea vCAF<sup>mCherry</sup>, estos fibroblastos no poseen un fenotipo capaz de aumentar la capacidad invasiva de las células tumorales, al igual que los fibroblastos BJ.

El análisis de la sangre de pacientes con cáncer ha mostrado la presencia de CAF circulantes, en gran proporción asociados a CTC formando clústeres heterotípicos. Esta información sugiere que los CAF pueden viajar conjuntamente con las CTC ayudando en la

formación de metástasis. En este sentido, estudios preclínicos han mostrado a los CAF como facilitadores de la formación de metástasis, así como de la formación de los clústeres de CTC<sup>111,113,138</sup>. Sin embargo, en estos estudios la presencia de CAF en los clústeres de CTC, y en las metástasis formadas, no está clara, con evidencias en ambos sentidos. En nuestros experimentos de pez cebra, hemos observado la diseminación conjunta de los fibroblastos (tanto vCAF<sup>mCherry</sup> como BJ) con las células tumorales, aunque no en el total de los embriones xenotrasplantados. La capacidad de diseminación de los fibroblastos está en concordancia con trabajos previos en modelos murinos y de pez cebra<sup>111,137</sup>. En este sentido, pudimos observar que, tanto en embriones xenotrasplantados con clústeres heterotípicos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> como de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y BJ, la presencia de fibroblastos diseminados en la cola de los peces se asocia a una mayor diseminación tumoral. Este efecto no parece ser debido a un mecanismo activo de diseminación involucrando la acción de los fibroblastos, sino que parece ser debido a una diseminación conjunta de ambos tipos celulares desde el sitio de inyección a la circulación. Esta diseminación puede ser de forma pasiva o debido al arrastre de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, las cuales son altamente invasivas. Por lo tanto, podríamos especular que estamos ante una limitación del modelo experimental de pez cebra, derivada posiblemente del lugar de inyección escogido. Sin embargo, en base a nuestros análisis de regresión asociando la fluorescencia de las células tumorales y los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>, no podemos descartar cierto componente de migración de las células tumorales dependiente de la acción de los fibroblastos. Estos resultados están en contraste con datos previos de la literatura obtenidos en un modelo de pez cebra donde se ha observado que los CAF, en contraposición a los fibroblastos normales, son capaces de promover la metástasis celular<sup>137</sup>.

Por otro lado, cabe destacar que en nuestros experimentos la supervivencia de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> en la cola del embrión tras la diseminación de los clústeres heterotípicos es mayor a lo largo del tiempo comparado con la línea BJ. De forma interesante, en presencia de vCAF<sup>mCherry</sup> diseminados, la cantidad de células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en la cola aumenta de 24 a 72 horas, mientras que el número de células tumorales en individuos con BJ en la cola se mantiene estable. Estos resultados parecen indicar que, si bien los vCAF<sup>mCherry</sup> no ejercen un efecto pro-invasivo sobre la diseminación inicial desde el Ducto de Cuvier de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, sí están favoreciendo su anidamiento y posterior crecimiento, y por tanto su capacidad de colonización metastásica.

Asimismo, nuestros análisis nos permiten concluir que el efecto de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la supervivencia y proliferación de las MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> es dependiente de su presencia mantenida en el tiempo, ya que solo se pudo observar cuando los fibroblastos fueron capaces de sobrevivir tras su diseminación en el embrión de pez cebra. Contrariamente, en presencia de fibroblastos BJ el efecto fue el opuesto, observándose una reducción en el volumen de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas en aquellos embriones en los que estos fibroblastos fueron capaces de sobrevivir tras su diseminación. Esto se ve reforzado por los análisis de la variación de la fluorescencia de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en embriones cuyos fibroblastos sobreviven o no en el tiempo. Así, hay un mayor porcentaje de individuos con vCAF<sup>mCherry</sup> supervivientes a las 72 horas en los que aumentan la cantidad de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, en comparación con aquellos individuos cuyos vCAF<sup>mCherry</sup> no sobreviven hasta ese tiempo. Por el contrario, tanto si los fibroblastos BJ sobreviven como si no, se observa un gran porcentaje de embriones que muestra una reducción en la cantidad de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>. Sin embargo, y de forma contraintuitiva, existe una tendencia hacia una reducción en el número

de fibroblastos vCAF<sup>FmCherry</sup> a lo largo del tiempo, lo que parece sugerir que no todos los CAF diseminados tienen la capacidad de sobrevivir en las metástasis. Por tanto, cabe pensar que se esté produciendo un fenómeno de selección en el que la supervivencia de subpoblaciones de vCAF<sup>FmCherry</sup> con capacidad de modificar la proliferación de las células tumorales es favorecida, posiblemente gracias a la interacción física entre ambos tipos celulares. Dada la elevada heterogeneidad descrita para los CAF, es posible especular que la población de fibroblastos vCAF<sup>FmCherry</sup> albergue subpoblaciones con distintas características moleculares y funcionales, siendo la población general anti-proliferativa, pero con presencia de subclones con propiedades pro-proliferativas. Esto también podría ser explicado por los diferentes orígenes de los CAF responsables de su diversidad dentro de los tumores<sup>97,226,232,233</sup>. Para testar esta hipótesis, sería necesario llevar a cabo experimentos adicionales generando distintos clones a partir de esta línea celular y llevando a cabo una caracterización molecular y funcional de los mismos.

Un estudio en pez cebra mencionado anteriormente muestra que los CAF son capaces de promover la metástasis celular y, además, que permanecen estrechamente asociados a las células tumorales una vez diseminadas<sup>137</sup>. Este trabajo otorga un papel importante a los CAF dentro del establecimiento de la metástasis. En este sentido, nuestros resultados en base a los análisis de colocalización celular apoyan esta idea e indican que la interacción física entre las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y los fibroblastos vCAF<sup>FmCherry</sup> es necesaria para ejercer un efecto positivo sobre la supervivencia y proliferación de las células tumorales. Por lo tanto, podemos especular que las interacciones físicas célula-célula establecidas entre ambos tipos celulares en los clústeres heterotípicos se pueden mantener durante y tras la diseminación celular, ejerciendo un papel promotor de la capacidad metastásica de las células tumorales. No obstante, es necesario mencionar que en estos ensayos no todas las células tumorales muestran una interacción física con fibroblastos en la cola del embrión, lo cual parece indicar que parte de los clústeres heterotípicos xenotrasplantados puede desagregarse en la circulación del pez. Sin embargo, a pesar de la disminución de la presencia de vCAF<sup>FmCherry</sup> diseminados a lo largo del tiempo, los porcentajes de colocalización de las células tumorales y los fibroblastos se mantienen, lo que podría indicar la selección de subpoblaciones de fibroblastos favorecidas por el contacto con las células tumorales.

En concordancia con esta idea, el inmunoensayo realizado en distintas condiciones de cultivo (monocultivo, cocultivo con interacción física y cocultivo con interacción paracrina) muestra una producción diferencial de citoquinas, detectándose la secreción de CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10 e ICAM1/CD54, solo cuando existe interacción física entre las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y los fibroblastos vCAF<sup>FmCherry</sup>, y la detección de CCL2/MCP1 cuando existe una interacción paracrina entre ambos tipos celulares. CCL5/RANTES es reconocida como una quimioquina inflamatoria, capaz de modular la migración y metástasis de las células tumorales<sup>234</sup>. Particularmente en cáncer de mama, CCL5/RANTES puede ser secretada por células del microambiente tumoral y actuar de forma paracrina sobre las células tumorales aumentando su motilidad, invasión y metástasis<sup>196</sup>, y su expresión es elevada en tumores agresivos, correlacionado con estadios avanzados de la enfermedad<sup>235-240</sup>. Por otro lado, se ha observado que CXCL10/IP-10 promueve la proliferación de las células tumorales, la invasión y la infiltración de células inmunitarias, contribuyendo a la progresión del cáncer de mama. Estos efectos están mediados por la capacidad de CXCL10/IP-10 de inducir la transición epitelio-mesénquima en las líneas celulares de cáncer de mama<sup>197</sup>. En este mismo tipo tumoral, los niveles de CXCL10/IP-10 se han correlacionado con una menor supervivencia de las pacientes de cáncer de mama metastásico, principalmente del subtipo triple negativo, y se ha demostrado su implicación en la proliferación y crecimiento de las células tumorales en los nichos metastásicos en un modelo de metástasis con las células MDA-MB-231<sup>241</sup>. Respecto

a la molécula de adhesión ICAM/CD54, esta puede activar vías de señalización potenciadoras de un fenotipo metastásico, induciendo la invasión de células de cáncer de mama<sup>198</sup>. Asimismo, se ha observado que la expresión de ICAM1 es muy elevada en las metástasis pulmonares de xenotrasplantes derivados de pacientes con cáncer de mama triple negativo, activando vías celulares relacionadas con el ciclo celular y características “stem”, y que a través de mediar interacciones célula-célula es capaz de iniciar la formación de clústeres de CTC, así como favorecer la migración transendotelial de los mismos y la formación de metástasis<sup>159</sup>. Estos hechos indicarían que la detección de estas citoquinas/quimioquinas en el medio de cultivo de células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> interactuando físicamente puede ser un factor contribuyente a la supervivencia y proliferación tumoral en los ensayos de pez cebra. Por otro lado, se ha demostrado que en cocultivo con células de cáncer de mama, los CAF pueden aumentar la expresión y secreción de CCL2/MCP1 (solamente detectada en cocultivos de interacción paracrina), promoviendo características “stem” en las células tumorales<sup>242,243</sup>. Esto sugiere que, en nuestro ensayo, los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> son los productores de esta citoquina, y que esta puede estar favoreciendo las capacidades metastásicas de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> a través de una acción paracrina.

En conclusión, este conjunto de resultados muestra un efecto diferencial de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> y BJ sobre la supervivencia y proliferación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> diseminadas en la cola de los embriones, y que este efecto es dependiente tanto de la capacidad de supervivencia de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> como de su interacción física con las células tumorales derivadas de la agregación celular en los clústeres de CTC.

Los datos obtenidos en el modelo de pez cebra contrastan en cierto modo con los resultados obtenidos en el ensayo de colonización pulmonar realizado en ratones. En el primero, los clústeres heterotípicos no presentaron diferencias significativas en cuanto a la diseminación y anidamiento en comparación con los clústeres homotípicos, aunque se observó una tendencia hacia un menor grado de diseminación de los clústeres heterotípicos, mostrando a su vez que la presencia de fibroblastos diseminados favorece la proliferación de las células tumorales. En el segundo, sin embargo, hubo una clara disminución de la capacidad de anidamiento y crecimiento de los clústeres heterotípicos respecto a los homotípicos, generando un número inferior de metástasis, por lo que no se observa ningún efecto estimulador de la proliferación celular. Esta diferencia puede deberse a que en el ensayo de ratón existe una muerte celular muy acusada en los pulmones durante los primeros tres días tras la inyección, lo que podría limitar o enmascarar un posible efecto de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> que hayan sobrevivido al paso por la circulación y al anidamiento. En este sentido, el análisis histopatológico de los tejidos no fue concluyente y no se pudo confirmar la presencia de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> en los pulmones de los ratones, por lo que no podemos saber si estos están presentes o no en las lesiones metastásicas, y por tanto favorecer la proliferación tumoral. En este sentido, la transparencia del pez cebra es una herramienta muy útil que nos permite visualizar tanto el comportamiento de las células tumorales MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> como de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> en el tiempo, y observar fenómenos como la supervivencia y selección de poblaciones celulares. En cualquier caso, nuestros resultados en ratón son contrarios a un estudio anterior en el que se describió cómo la inyección en vena de cola de clústeres heterotípicos de células tumorales de MDA-MB-231 junto a CAF aumentaba el potencial metastásico de las células tumorales en comparación con clústeres homotípicos<sup>203</sup>. Tampoco estarían en consonancia con otro trabajo que sugiere que los CAF promueven la

supervivencia de las CTC al conferir resistencia a las fuerzas de cizalla en la circulación<sup>113</sup>.

Como se ha comentado anteriormente, los CAF son una población muy heterogénea con múltiples posibles precursores, tanto fibroblastos normales residentes como otros tipos celulares<sup>94,244–248</sup>. Esta gran variedad de posibles orígenes contribuye a la heterogeneidad observada en las subpoblaciones de CAF, tanto a nivel funcional como de expresión génica<sup>230,231,249</sup>. La heterogeneidad de los CAF es evidenciada por la variedad de marcadores biológicos con patrones de expresión selectiva que condicionan su función, siendo los más comúnmente usados para definir los CAF la actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), la proteína de activación de fibroblasto (FAP), la proteína específica del fibroblasto 1 (S100A4 o FSP1), y los receptores *alpha* y *beta* del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR $\alpha$  y PDGFR- $\beta$ )<sup>98</sup>. La expresión de estos marcadores en el estroma tumoral se ha asociado a un peor pronóstico en muchos tipos de cáncer<sup>98,100,250</sup>. Así, por ejemplo, la pérdida de FSP1 en ratones conlleva un impedimento en la movilidad de los fibroblastos, lo que se asocia a una reducción de la metástasis<sup>112</sup>, y en xenotrasplantes ortotópicos en modelos murinos el tratamiento dirigido contra fibroblastos con altos niveles de FAP muestra efectos antitumorales<sup>251,252</sup>. Por el contrario, en la literatura también hay reflejados trabajos en los que se ha propuesto un papel antitumoral para los CAF. Por ejemplo, la ablación de CAF  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> dio lugar tumores de páncreas más agresivos<sup>253</sup>.

Nuestros resultados moleculares muestran que el perfil de expresión génica de ambas líneas de fibroblastos, vCAF<sup>mCherry</sup> y BJ, para estos marcadores es similar, aunque se detectan tendencias a mayores niveles de PDGFR- $\alpha$  y PDGFR- $\beta$  en la línea vCAF<sup>mCherry</sup>. Esto parece indicar que, a pesar de proceder de un ambiente tumoral, los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> no presentan un patrón claro de activación en lo que a marcadores asociados a la migración, invasión y modificación de la matriz extracelular se refiere, lo que podría estar relacionado con la falta de un fenotipo potenciador de la diseminación tumoral en nuestros modelos *in vivo*. Sin embargo, es posible que la expresión de los receptores PDGFR- $\alpha$  y PDGFR- $\beta$  en los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> esté asociada con el efecto potenciador de estos fibroblastos sobre la proliferación de las células tumorales. De hecho, ambos receptores se encuentran sobreexpresados en múltiples tumores, incluyendo el cáncer de mama. En particular, la elevada expresión de PDGFR- $\beta$  en fibroblastos tumorales se asocia a un peor pronóstico en cáncer de mama<sup>254–256</sup> y la vía de señalización de este receptor juega un papel importante en la activación de CAF y su contribución a la progresión del cáncer de mama<sup>257</sup>. Estos resultados de expresión génica, conjuntamente con los llevados a cabo anteriormente en cocultivos para el estudio de la interacción paracrina con las células tumorales (sección 1.2 de resultados), el ensayo de producción de citoquinas (sección 3.4 de resultados) y los ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo*, parecen indicar que posiblemente la línea de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> podría corresponderse con una población de fibroblastos asociados a cáncer con limitada capacidad para la comunicación paracrina con las células de cáncer de mama y dependiente de las interacciones físicas con estas para ejercer un efecto regulador sobre ellas.

Esta hipótesis se ve reforzada por los resultados de los ensayos de estimulación con TGF- $\beta$ . Existe una comunicación cruzada entre las células tumorales y los fibroblastos del microambiente, principalmente a través de citoquinas como PDGF y TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$  es uno de los principales inductores de la activación de fibroblastos<sup>258</sup> y se ha comprobado que la inhibición de TGF- $\beta$  bloquea la diferenciación de células estromales en CAF<sup>259</sup>, la proliferación tumoral y la metástasis<sup>260</sup>. Asimismo, se ha descrito que fibroblastos normales activados con TGF- $\beta$  aumentan la metástasis en cáncer hepático y pulmonar<sup>137</sup>.

El análisis de expresión génica en fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> estimulados con TGF- $\beta$  mostró un aumento de la expresión de los genes FN1 y FAP, así como fuertes tendencias a un aumento

de ACTA2 y TNC. Estos resultados sugieren que los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> son capaces de responder a estímulos clásicos del microambiente tumoral adquiriendo rasgos moleculares de “activación”, los cuales no fueron observados en los cocultivos de interacción paracrina con las células tumorales MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y MCF7<sup>eGFP-luc</sup>. Asimismo, estos cambios de expresión génica inducidos por TGF- $\beta$  también fueron asociados a cambios en la expresión y localización proteica de los marcadores clásicos FAP y  $\alpha$ -SMA. Es particularmente reseñable la acción sobre la miosina de músculo liso, la cual se observa claramente localizada en fibras de estrés tras el tratamiento con TGF- $\beta$  y está implicada en la actividad contráctil de los fibroblastos<sup>261</sup>. De manera importante, estos cambios moleculares indicadores de activación de los fibroblastos se tradujeron en cambios funcionales. Ambas proteínas,  $\alpha$ -SMA y FAP, han sido implicadas en la movilidad celular y procesos de invasión en cáncer. Así, en ensayos de invasión en Transwell<sup>®</sup>, los cocultivos heterotípicos formados por MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> activados con TGF- $\beta$  muestran un mayor número de células tumorales migradas que los cultivos de MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> sin tratar, indicando que la incubación con TGF- $\beta$  está induciendo a esta línea de fibroblastos a un fenotipo potenciador de la invasión. En línea con estos resultados *in vitro*, en los xenotrasplantes en pez cebra, se observa una mayor diseminación de los clústeres heterotípicos cuando los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> han sido tratados previamente con TGF- $\beta$ . En esta ocasión, sí que se observa un efecto potenciador de la metástasis de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> activada por TGF- $\beta$ , tal y como describieron Ren et al., los cuales mostraron que la activación de fibroblastos a través de la ruta TGF- $\beta$  promovía la intravasación y extravasación de las células de cáncer de mama cuando son coinyectadas en el espacio perivitelino y el Ducto de Cuvier<sup>225</sup>. Este conjunto de resultados indica que los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> son capaces de adquirir un fenotipo impulsor de la invasión y diseminación tumoral en respuesta a estímulos del microambiente tumoral, y ponen de manifiesto que en nuestros ensayos la interacción paracrina entre las células tumorales de mama y estos fibroblastos es limitada.

Diversos estudios demuestran que los fibroblastos asociados a cáncer pueden estar implicados en la formación y diseminación de los clústeres de CTC<sup>128,131,138,139,203</sup>. Así, recientemente se ha descrito la presencia de clústeres de CTC heterotípicos en la sangre de pacientes con cáncer de mama en todos los estadios, así como una mayor capacidad de formar metástasis de estos clústeres en modelos experimentales de cáncer de mama<sup>203</sup>. En base a estas evidencias, decidimos estudiar el posible papel de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> como reguladores de la formación de CTC y clústeres de CTC a través de su uso en un modelo de cáncer de mama humano ortotópico de ratón generado con las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>.

Los xenotrasplantes realizados para generar tumores muestran que la coinyección de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> con las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> ejerce un efecto negativo sobre el desarrollo tumoral, observándose un retardo en la dinámica de crecimiento de estos tumores respecto a los tumores de ratones xenotrasplantados exclusivamente con las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>. Aunque en cierto modo inesperado, ya que un efecto inhibitorio del crecimiento tumoral es más esperado de los fibroblastos normales<sup>229,262</sup>, este resultado concuerda con el efecto negativo que ejercen los fibroblastos sobre la proliferación de las células tumorales observado en ensayos *in vitro*. Asimismo, el crecimiento tumoral retardado tuvo un impacto negativo sobre el desarrollo de las metástasis, siendo estas menores al final de los experimentos. Estos hechos parecen estar determinados por la cantidad de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> xenotrasplantados, ya que cuando se aumentó la proporción fibroblasto: célula tumoral en los xenotrasplantes, se pudo

observar un efecto inhibitor del crecimiento más acusado en los xenotrasplantes heterotípicos. En este ensayo, solo uno de los seis ratones inyectados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup> desarrolló metástasis pulmonar, mientras que cinco de los seis ratones inyectados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> mostraron lesiones metastásicas. En base a estos resultados, este modelo experimental no parece ser el más adecuado para el estudio de la formación de CTC y clústeres de CTC, ya que es esperado que el efecto negativo de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> sobre el crecimiento tumoral y desarrollo de la metástasis tenga un impacto en el número de CTC y clústeres liberados a la circulación sanguínea.

En el análisis de la sangre de estos ratones se detectó un mayor número de CTC individuales que de clústeres, representando estos últimos en torno al 13% de las CTC detectadas en total. Esta frecuencia de detección de clústeres de CTC está dentro del rango de detección de estudios previos<sup>60</sup>. Además, hay que destacar que se detectó un menor número de CTC individuales y clústeres de CTC en los ratones con xenotrasplantes heterotípicos respecto a los ratones con xenotrasplantes homotípicos, aunque estas diferencias no fueron significativas. Este resultado reflejaría el menor tamaño tumoral observado en este grupo experimental. Por otro lado, también se detectaron fibroblastos circulantes en algunos de los ratones xenotrasplantados con MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> y vCAF<sup>mCherry</sup>, demostrando la capacidad de diseminación de esta línea de fibroblastos<sup>136</sup>. Sin embargo, hay que destacar que los escasos fibroblastos encontrados en la sangre no forman parte de clústeres heterotípicos junto a las MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, indicando que ambos tipos celulares no diseminan en conjunto. Este resultado estaría en desacuerdo con otros trabajos, donde se ha observado la presencia de clústeres de CTC heterotípicos en la sangre de pacientes y modelos animales de cáncer<sup>111,128,131,203</sup>. Por otro lado, también indicaría que, en este modelo, los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> no están ejerciendo de células líder favoreciendo la migración colectiva de las células tumorales, como se ha descrito en otros trabajos<sup>136,263</sup>. Por el contrario, en la literatura también se ha reflejado que, en modelos experimentales de ratón, los CAF pueden favorecer la formación de clústeres de CTC sin que ellos vayan presentes en los mismos, ya que no se observó la presencia de CAF en las metástasis de estos animales<sup>138</sup>. Por lo tanto, la ausencia de vCAF<sup>mCherry</sup> en los clústeres de CTC no significa que estas células no puedan estar ejerciendo un papel regulador sobre el desprendimiento de las CTC y clústeres de CTC a partir del tumor primario.

De forma interesante, mientras que en los ratones con xenotrasplantes homotípicos existe una relación directa entre el número de CTC detectadas y el número de clústeres de CTC, esta relación se pierde en los ratones xenotrasplantados con fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>. Así, la proporción de clústeres de CTC frente a CTC individuales detectada en la sangre de ratones con xenotrasplantes heterotípicos es superior a la detectada en ratones con xenotrasplantes homotípicos, sugiriendo que, a pesar de que estos tumores arrojan un número menor de CTC individuales, el número de clústeres de CTC arrojados es mayor en proporción al número de CTC individuales. Esta observación estaría indicando que la presencia de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> en el tumor primario parece ejercer un efecto regulador sobre la formación de los clústeres de CTC o sobre la capacidad de estos de intravasarse y entrar en circulación. Así, los ensayos de agregación *in vitro* muestran que los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> favorecen la formación de agregados por parte de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, pero siendo estos tanto agregados celulares homotípicos como heterotípicos. Este resultado no iría en línea con la observación exclusiva de clústeres de CTC homotípicos en la sangre de los ratones. Sin embargo, los ensayos de formación de esferoides sugieren que, si bien ambos tipos celulares pueden formar parte del mismo esferoide, la arquitectura de los mismos (formada por un núcleo de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> cubierto por células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>) no estaría favoreciendo

el desprendimiento e invasión conjunta de ambos tipos celulares y por tanto favoreciendo la formación de clústeres heterotípicos. No obstante, la realización de experimentos de invasión a partir de los esferoides sería necesarios para demostrar esta idea, así como experimentos adicionales para demostrar la implicación directa de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> en la formación de clústeres de CTC. En cualquier caso, cabe destacar que en estos ratones la incidencia de las metástasis fue inferior a la del grupo con xenotrasplantes homotípicos, por lo que el número total de clústeres de CTC generados parece ser el factor principal que determina la incidencia metastásica.

Si bien se ha descrito que la presencia de clústeres de CTC en la sangre de pacientes se asocia a un peor pronóstico<sup>24,51</sup>, nuestros experimentos parecen indicar que los clústeres de CTC formados a partir de tumores heterotípicos no parecen tener un mayor potencial metastásico que los clústeres formados por tumores homotípicos. En base a nuestros experimentos en pez cebra que muestran que los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> favorecen la supervivencia y proliferación de las CTC una vez diseminadas, cabría esperar que los clústeres de CTC de xenotrasplantes heterotípicos tuviesen una ventaja metastásica sobre los clústeres de xenotrasplantes homotípicos. Sin embargo, los resultados muestran que esto no es así. No obstante, hay que reseñar que el efecto positivo de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la supervivencia y proliferación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> en el modelo de pez cebra fue dependiente de las interacciones físicas entre ambos tipos celulares. En este sentido, el análisis de la sangre de estos ratones muestra que no se están arrojando a la circulación clústeres heterotípicos y por tanto no se está dando este fenómeno de comunicación intercelular, hecho que podría explicar la falta de un efecto prometastásico mediado por una estimulación de la supervivencia y proliferación celular.

En conjunto, el desarrollo de un modelo de clústeres de CTC en combinación con ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo* y ensayos de caracterización nos ha permitido entender mejor la complejidad de las interacciones celulares entre las células tumorales y células del microambiente tumoral, como son los fibroblastos asociados a cáncer (CAF). Si bien el principal papel atribuido a los CAF como población es el de promover la progresión tumoral y facilitar la metástasis, los presentes resultados muestran que estas células pueden ejercer varios efectos reguladores sobre la metástasis mediada por los clústeres de CTC heterotípicos, tanto negativos como positivos. Asimismo, estos efectos reguladores son dependientes del fenotipo tumoral, del tipo de interacción establecida con las células tumorales (paracrina o física) e incluso de la selección de subpoblaciones celulares dentro de los CAF. Esto pone en evidencia la heterogeneidad funcional existente dentro de los CAF y la complejidad del estudio de sus interacciones con las células tumorales. Por lo tanto, el modelo de clústeres de CTC desarrollados en este proyecto de tesis es útil para ahondar sobre la biología de estas agrupaciones celulares y para el estudio de su papel en la metástasis del cáncer.



# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. El efecto de la línea de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> sobre las células tumorales en los ensayos *in vitro* es dependiente del fenotipo de estas últimas, aumentando o disminuyendo las capacidades de las líneas MCF7<sup>eGFP-luc</sup> y MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, respectivamente, en distintos procesos asociados con la metástasis.
2. La interacción paracrina bidireccional entre las células tumorales y los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> no parece ser suficiente para inducir cambios en la expresión de marcadores asociados a la transición epitelio-mesénquima en las células tumorales ni de marcadores clásicos de activación en los fibroblastos.
3. El desarrollo de un modelo *in vitro* de clústeres de CTC y la optimización de su xenotrasplante en pez cebra nos permite determinar que la presencia de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> en los clústeres heterotípicos no potencia la diseminación de las células tumorales MCF7<sup>eGFP-luc</sup> o MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>, aunque su supervivencia en la cola favorece la proliferación y supervivencia de las últimas una vez diseminadas.
4. El efecto positivo de la línea de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> sobre la supervivencia y proliferación de las células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup> es dependiente de interacciones físicas de estos fibroblastos con la línea tumoral, y posiblemente del intercambio de factores solubles derivados de dichas interacciones.
5. Existe una posible selección de sub-poblaciones de la línea vCAF<sup>mCherry</sup> en los xenotrasplantes de pez cebra, en la que se favorece a aquellos fibroblastos capaces de potenciar la proliferación de la línea MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>. Esto, junto al efecto dependiente del fenotipo tumoral, evidencia la heterogeneidad funcional existente dentro de los CAF.
6. La caracterización molecular de los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> muestra que, pese a proceder de un tumor, no presenta un fenotipo claro de activación y pro-invasivo, el cual puede ser adquirido mediante el tratamiento con TGF- $\beta$ . Esto sugiere una intercomunicación posiblemente deficiente entre las células tumorales de mama y los fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup>.
7. En nuestro modelo de xenotrasplante en ratón, la línea de fibroblastos vCAF<sup>mCherry</sup> afecta negativamente al desarrollo tumoral y la incidencia de metástasis. Sin embargo,

la proporción de clústeres de CTC respecto a CTC individuales en estos ratones es mayor que en aquellos xenotrasplantados exclusivamente con células MDA-MB-231<sup>eGFP-luc</sup>. Esto indica que la línea vCAF<sup>mCherry</sup> parece ejercer un efecto regulador sobre la formación de clústeres de CTC.

8. En la sangre de los ratones xenotrasplantados apenas se pudo detectar la presencia de clústeres heterotípicos, indicando que ambos tipos celulares no diseminan conjuntamente. En base a nuestros resultados de supervivencia y proliferación tumoral observados en el pez cebra, esta falta de interacción entre ambos tipos celulares podría explicar la reducida incidencia de metástasis observada en los ratones con xenotrasplantes heterotípicos.
9. La generación *in vitro* de clústeres de CTC ha demostrado ser un modelo de gran utilidad para el estudio de la biología de estos grupos celulares y su papel en la metástasis, así como para entender la interacción entre las CTC y los fibroblastos del microambiente tumoral.



# **AGRADECIMIENTOS**



## AGRADECIMIENTOS

Mis primeras palabras de agradecimiento son para mi tutor Rafael López y mi director de tesis Roberto Piñeiro, por la confianza depositada en mí durante estos años. Gracias **Rafa** por tu buena disposición y tus ganas de que siempre veamos juntos algún pez. Gracias **Roberto** por tu guía, tu buena mano y estar siempre disponible. Apostaste por mí desde el primer momento y supiste cuándo llevarme de la mano y cuándo dejarme libre para que aprendiese. Conociste pronto mis virtudes y defectos, sabiendo cómo aprovechar los primeros y cómo superar los segundos. Quiero agradecer tu confianza y tu infinita paciencia conmigo, por siempre escuchar mis ideas, tener en cuenta mi criterio y saber cuándo necesito unas palabras de aliento. Esta experiencia no habría sido lo mismo sin ti.

Gracias a toda la UM, desde los nuevos miembros hasta los que llevan desde el principio. **Ana** y **Cloti**, gracias por estar siempre dispuestas a escuchar y ayudarme en mis experimentos. **Gloria**, agradezco mucho el haberme dado la bienvenida al laboratorio y haber sido muy atenta conmigo para que me adaptara los primeros meses. Gracias a **Carmen** por aguantarme preguntando por enésima vez dónde están las cosas, a **Celso** y **Virgi** por echarme una mano cada vez que lo necesitaba y a Sabrina por haber sido una excelente alumna. **Thais**, te agradezco que fueras mi ejemplo a seguir en este sitio y que siempre estuvieras dispuesta a ser mi “observadora ciega” en los experimentos. **José Antonio**, tú eres el último en llegar, pero ya no imagino mi día a día sin ti. Tus ganas de trabajar, tu eficiencia y tu compromiso me han ayudado increíblemente durante los últimos meses de esta tesis. Gracias de verdad.

Quiero extender mi gratitud a los laboratorios 17 y 18 del FIDIS. A **Miguel** y **María**, por sus buenas ideas para la colaboración de nuestros grupos, a **Ali** y **Ramón** por su predisposición a ayudar en cualquier técnica o cualquier material que necesitara, a **Jorge** por su interés en nuestra buena formación como doctorandos y a **Alba** y **Lore** por sus buenos consejos en los experimentos.

Quiero agradecer también a **Jesús**, **Marta** y **Mónica**, quienes desde el CIEMAT me ayudaron a comenzar este viaje. Muchísimas gracias por todo.

No puedo olvidarme del Club de Wendoline. Gracias a **Patri**, **Carlos** y **Óscar**, por esas cañas de desahogo de conversaciones inenarrables, de verdad que hacen buena falta. **Aitor**, **Aida** y **Manu**, muchísimas gracias por todas las risas que nos hemos echado, quedar con vosotros es sinónimo de que me duela la boca de reírme a carcajadas durante horas. **Carol** y **Nuria**, no solo amigas sino compañeras de piso, gracias por los tres años de convivencia y por todas las series y charlas en el sofá. Ha sido un gustazo vivir con vosotras. A ti **Inés**, gracias por tu ayuda en todo el trabajo de la línea de investigación durante estos años y por las largas horas de palique en el animalario juntos. A **Sandra A.** y **Luis**, gracias por compartir vuestras historias, me encantan y estoy deseando escuchar más. A **Sandra D.** y las “nanogirls” gracias por esas cenas y por estar ahí para echar un cable cuando hacía falta. **Sainza**, muchas gracias por tu actitud y responsabilidad en nuestras colaboraciones, trabajar contigo ha sido una gran experiencia. Y **María**, pececillo, gracias por soportarme como profesor gruñón y tener paciencia con nuestros queridos peixiños; has sido una maravillosa compañera de pesca.

Mil gracias a **Laura** y **Sarai** por las quedadas y nuestras interesantes conversaciones y por nuestro más que interesante grupo, a **Iago**, **Alex** y **Dani** por hacerme partícipe de vuestros

hobbies y compartir frikadas juntos, a **Paula** por esa amabilidad que desprendes y por saber siempre qué decir y a **Fani** por confiar en mí, saber entenderme y aconsejarme sabiamente.

Cartagineses, esta va por vosotros, por todo lo que me habéis escuchado quejarme y por siempre estar ahí al pie del cañón cuando volvía a casa para quedar y ponernos al día. Gracias a **Carlos, Dani M., Fran, Javi e Irene** por las cenas, los paseos y las risas. A **Dani, Antonio y Pi**, gracias por ser tan atentos, dispuestos a quedar cada vez que ponía un pie en Cartagena y más que dispuestos para adentrarnos juntos una vez más en una Escape Room o en la Grieta. A **Vic** por intercambiar “impresiones” de tesis, mucho ánimo que ya te queda poco. A **Teresa** por todas las visitas en vacaciones, ya sean en la ciudad, playa o montaña, siempre es un placer quedar contigo. A **Pedro** por compartir el mismo camino desde el colegio y apoyarnos durante universidad, máster y doctorado; aunque estés más lejos que yo de casa siempre deseo que vuelvas a visitarnos. Por fin somos libres. Y **Marina**, no tengo palabras para describir lo que has hecho por mí todos estos años. Has sido la primera en escucharme y ayudarme, compartiendo lo bueno y lo malo sin excusas. Te estoy infinitamente agradecido por todo lo que hemos vivido y lo que nos queda por vivir.

Gracias a mi familia por vuestro apoyo ilimitado, en especial a mis padres y hermana por estar siempre dispuestos a ayudarme bajo cualquier circunstancia, anteponiendo mis problemas a los vuestros, y por las visitas con los padrinos trayéndome un trocito de casa. También a mis abuelos, tíos y primos, mil gracias por vuestros consejos y ánimos. Vosotros sois los que habéis hecho posible la conclusión de este capítulo.

**Miriam**, gracias por todo. Gracias por tu apoyo incondicional, por saber estar ahí y por las noches preparando seminarios hasta tarde. Gracias por levantarme el ánimo cuando lo veía todo negro y por implicarte en mi tesis casi tanto como en la tuya propia. Gracias por entenderme, por saber cuándo necesitaba un abrazo y cuándo estrellarme, y por tu paciencia conmigo. Has sido uno de mis pilares fundamentales durante esta etapa y por todo esto no puedo estar lo suficientemente agradecido.



## **REFERENCIAS**



## REFERENCIAS

1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
2. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* **70**, 7–30 (2020).
3. Obeidat, F. *et al.* Clinical and histopathological features of breast cancer in Jordan: Experience from a tertiary care hospital. *J. Pak. Med. Assoc.* **67**, 1206–1212 (2017).
4. Prabhu, J. S. *et al.* A majority of low (1-10%) er positive breast cancers behave like hormone receptor negative tumors. *J. Cancer* **5**, 156–165 (2014).
5. Jemal, A. *et al.* Cancer Statistics , 2009 BOTH SEXES FEMALE BOTH SEXES ESTIMATED DEATHS. *CA Cancer J Clin* **59**, 1–25 (2009).
6. Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* **168**, 670–691 (2017).
7. Alix-Panabières, C. & Pantel, K. Circulating tumor cells: Liquid biopsy of cancer. *Clin. Chem.* **59**, 110–118 (2013).
8. Alix-Panabières, C., Mader, S. & Pantel, K. Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. *J. Mol. Med.* **95**, 133–142 (2017).
9. Quesnel, B. Systems Biology of Tumor Microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.* **936**, 181–200 (2016).
10. Strilic, B. & Offermanns, S. Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. *Cancer Cell* **32**, 282–293 (2017).
11. Wirtz, D., Konstantopoulos, K. & Searson, P. C. The physics of cancer: The role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 512–522 (2011).
12. Gorelik, E., Wiltrot, R. H., Okumura, K., Habu, S. & Herberman, R. B. Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int. J. Cancer* **30**, 107–112 (1982).
13. Bockhorn, M., Jain, R. K. & Munn, L. L. Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet Oncol.* **8**, 444–448 (2007).
14. Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309–322 (2012).
15. Luzzi, K. J. *et al.* Multistep nature of metastatic inefficiency: Dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.* **153**, 865–873 (1998).
16. Langenbeck, B. On the development of cancer in the veins, and the transmission of cancer from man to the lower animals. *Edinb. Med. Surg. J.* **55**, 251–253 (1841).
17. Ashworth, T. R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust. Med. J.* **14**, 146–147 (1869).
18. Miller, M. C., Doyle, G. V. & Terstappen, L. W. M. M. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast

- Colorectal and Prostate Cancer. *J. Oncol.* **2010**, 1–8 (2010).
19. Habli, Z., Alchamaa, W., Saab, R., Kadara, H. & Khraiche, M. L. Circulating tumor cell detection technologies and clinical utility: Challenges and opportunities. *Cancers (Basel)*. **12**, 1–30 (2020).
  20. Cristofanilli, M. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *Semin. Oncol.* **33**, 9–14 (2006).
  21. Jordan, N. V. *et al.* HER2 expression identifies dynamic functional states within circulating breast cancer cells. *Nature* **537**, 102–106 (2016).
  22. Gasch, C. *et al.* Frequent detection of PIK3CA mutations in single circulating tumor cells of patients suffering from HER2-negative metastatic breast cancer. *Mol. Oncol.* **10**, 1330–1343 (2016).
  23. Pixberg, C. F. *et al.* Analysis of DNA methylation in single circulating tumor cells. *Oncogene* **36**, 3223–3231 (2017).
  24. Hong, Y., Fang, F. & Zhang, Q. Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). *Int. J. Oncol.* **49**, 2206–2216 (2016).
  25. Cho, E. H. *et al.* Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors. *Phys. Biol.* **9**, (2012).
  26. Aceto, N. *et al.* Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* **158**, 1110–1122 (2014).
  27. Cheung, K. J. *et al.* Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E854–E863 (2016).
  28. Maddipati, R. & Stanger, B. Z. Pancreatic cancer metastases harbor evidence of polyclonality. *Cancer Discov.* **5**, 1086–1097 (2015).
  29. Liu, X. *et al.* Homophilic CD44 interactions mediate tumor cell aggregation and polyclonal metastasis in patient-derived breast cancer models. *Cancer Discov.* **9**, 96–113 (2019).
  30. Glinisky, V. V. *et al.* Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res.* **63**, 3805–3811 (2003).
  31. Haeger, A., Krause, M., Wolf, K. & Friedl, P. Cell jamming: Collective invasion of mesenchymal tumor cells imposed by tissue confinement. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1840**, 2386–2395 (2014).
  32. Wendel, M. *et al.* Fluid biopsy for circulating tumor cell identification in patients with early-and late-stage non-small cell lung cancer: A glimpse into lung cancer biology. *Phys. Biol.* **9**, (2012).
  33. Yu, M., Stott, S., Toner, M., Maheswaran, S. & Haber, D. A. Circulating tumor cells: Approaches to isolation and characterization. *J. Cell Biol.* **192**, 373–382 (2011).
  34. Nowell P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (80-. )*. **194**, 23–28 (1976).
  35. Hou, J. M. *et al.* Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **30**, 525–532 (2012).
  36. Chang, M. C. *et al.* Clinical significance of circulating tumor microemboli as a prognostic marker in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Chem.* **62**, 505–513 (2016).
  37. Yu, J.-J. *et al.* The Presence of Circulating Tumor Cell Cluster Characterizes an Aggressive Hepatocellular Carcinoma Subtype. *Front. Oncol.* **11**, 1–10 (2021).
  38. Long, E. *et al.* High expression of TRF2, SOX10, and CD10 in circulating tumor

- microemboli detected in metastatic melanoma patients. A potential impact for the assessment of disease aggressiveness. *Cancer Med.* **5**, 1022–1030 (2016).
39. Paoletti, C. *et al.* Significance of circulating tumor cells in metastatic triple-negative breast cancer patients within a randomized, phase II trial: TBCRC 019. *Clin. Cancer Res.* **21**, 2771–2779 (2015).
  40. Mu, Z. *et al.* Prospective assessment of the prognostic value of circulating tumor cells and their clusters in patients with advanced-stage breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **154**, 563–571 (2015).
  41. Larsson, A. M. *et al.* Longitudinal enumeration and cluster evaluation of circulating tumor cells improve prognostication for patients with newly diagnosed metastatic breast cancer in a prospective observational trial. *Breast Cancer Res.* **20**, 1–14 (2018).
  42. Jansson, S., Bendahl, P. O., Larsson, A. M., Aaltonen, K. E. & Rydén, L. Prognostic impact of circulating tumor cell apoptosis and clusters in serial blood samples from patients with metastatic breast cancer in a prospective observational cohort. *BMC Cancer* **16**, 1–15 (2016).
  43. Paoletti, C. *et al.* Circulating tumor cell clusters in patients with metastatic breast cancer: A SWOG S0500 translational medicine study. *Clin. Cancer Res.* **25**, 6089–6097 (2019).
  44. Costa, C. *et al.* Analysis of a real-world cohort of metastatic breast cancer patients shows circulating tumor cell clusters (Ctc-clusters) as predictors of patient outcomes. *Cancers (Basel)*. **12**, (2020).
  45. Wang, C. *et al.* Longitudinally collected CTCs and CTC-clusters and clinical outcomes of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **161**, 83–94 (2017).
  46. Watanabe, S. The metastasizability of tumor cells. *Cancer* **7**, 215–223 (1954).
  47. Fidler, I. J. & Talmadge, J. E. Evidence That Intravenously Derived Murine Pulmonary Melanoma Metastases Can Originate from the Expansion of a Single Tumor Cell. *Cancer Res.* **46**, 5167–5171 (1986).
  48. Küsters, B. *et al.* Micronodular transformation as a novel mechanism of VEGF-A-induced metastasis. *Oncogene* **26**, 5808–5815 (2007).
  49. Chen, J. F. *et al.* Subclassification of prostate cancer circulating tumor cells by nuclear size reveals very small nuclear circulating tumor cells in patients with visceral metastases. *Cancer* **121**, 3240–3251 (2015).
  50. De Wit, S. *et al.* The detection of EpCAM+ and EpCAM- circulating tumor cells. *Sci. Rep.* **5**, 1–10 (2015).
  51. Bulfoni, M. *et al.* Dissecting the heterogeneity of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: Going far beyond the needle in the Haystack. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–25 (2016).
  52. Yu, M. *et al.* Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science (80-. )*. **339**, 580–584 (2013).
  53. Yao, X. *et al.* Functional analysis of single cells identifies a rare subset of circulating tumor cells with malignant traits. *Integr. Biol. (United Kingdom)* **6**, 388–398 (2014).
  54. Zhao, Q. *et al.* Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis. *Mol. Cancer* **9**, 1–12 (2010).
  55. Labuschagne, C. F., Cheung, E. C., Blagih, J., Domart, M. C. & Vousden, K. H. Cell Clustering Promotes a Metabolic Switch that Supports Metastatic Colonization. *Cell Metab.* **30**, 720-734.e5 (2019).
  56. Thangavel, H. *et al.* A CTC-Cluster-Specific Signature Derived from OMICS Analysis

- of Patient-Derived Xenograft Tumors Predicts Outcomes in Basal-Like Breast Cancer. *J. Clin. Med.* **8**, 1772 (2019).
57. Gkoutela, S. *et al.* Circulating Tumor Cell Clustering Shapes DNA Methylation to Enable Metastasis Seeding. *Cell* **176**, 98-112.e14 (2019).
  58. Li, C. F. *et al.* Snail-induced claudin-11 prompts collective migration for tumour progression. *Nat. Cell Biol.* **21**, 251–262 (2019).
  59. Padmanaban, V. *et al.* E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer. *Nature* **573**, 439–444 (2019).
  60. Aceto, N. Bring along your friends: Homotypic and heterotypic circulating tumor cell clustering to accelerate metastasis. *Biomed. J.* **43**, 18–23 (2020).
  61. Amintas, S. *et al.* Circulating tumor cell clusters: United we stand divided we fall. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
  62. DeNardo, D. G. *et al.* Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* **1**, 54–67 (2011).
  63. Curiel, T. J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* **10**, 942–949 (2004).
  64. Liguori, M., Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A. & Allavena, P. Tumor-associated macrophages as incessant builders and destroyers of the cancer stroma. *Cancers (Basel)*. **3**, 3740–3761 (2011).
  65. De Bock, K., Cauwenberghs, S. & Carmeliet, P. Vessel abnormalization: Another hallmark of cancer?. Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 73–79 (2011).
  66. Goel, S. *et al.* Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol. Rev.* **91**, 1071–1121 (2011).
  67. Senger, D. R. *et al.* American association for the advancement of science. *J. Franklin Inst.* **202**, 834 (1926).
  68. Donato, C. *et al.* Hypoxia Triggers the Intravasation of Clustered Circulating Tumor Cells. *Cell Rep.* **32**, 108105 (2020).
  69. Szczerba, B. M. *et al.* Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature* **566**, 553–557 (2019).
  70. Labelle, M., Begum, S. & Hynes, R. O. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell* **20**, 576–590 (2011).
  71. De Wever, O., Van Bockstal, M., Mareel, M., Hendrix, A. & Bracke, M. Carcinoma-associated fibroblasts provide operational flexibility in metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **25**, 33–46 (2014).
  72. Aceto, N., Toner, M., Maheswaran, S. & Haber, D. A. En Route to Metastasis: Circulating Tumor Cell Clusters and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Trends in Cancer* **1**, 44–52 (2015).
  73. Stegner, D., Dütting, S. & Nieswandt, B. Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. *Thromb. Res.* **133**, S149–S157 (2014).
  74. Mammadova-Bach, E. *et al.* Platelet integrin  $\alpha 6 \beta 1$  controls lung metastasis through direct binding to cancer cell-derived ADAM9. *JCI Insight* **1**, 1–17 (2016).
  75. Palumbo, J. S. *et al.* Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* **105**, 178–185 (2005).
  76. Kopp, H. G., Placke, T. & Salih, H. R. Platelet-derived transforming growth factor- $\beta$  down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity.

- Cancer Res.* **69**, 7775–7783 (2009).
77. Placke, T. *et al.* Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res.* **72**, 440–448 (2012).
  78. Coupland, L. A., Chong, B. H. & Parish, C. R. Platelets and P-selectin control tumor cell metastasis in an organ-specific manner and independently of NK cells. *Cancer Res.* **72**, 4662–4671 (2012).
  79. Sprouse, M. L. *et al.* PMN-MDSCs enhance CTC metastatic properties through reciprocal interactions via ROS/notch/nodal signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
  80. Huh, S. J., Liang, S., Sharma, A., Dong, C. & Robertson, G. P. Transiently entrapped circulating tumor cells interact with neutrophils to facilitate lung metastasis development. *Cancer Res.* **70**, 6071–6082 (2010).
  81. Park, J. *et al.* Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci. Transl. Med.* **8**, (2016).
  82. Cools-Lartigue, J., Spicer, J., Najmeh, S. & Ferri, L. Neutrophil extracellular traps in cancer progression. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 4179–4194 (2014).
  83. Najmeh, S. *et al.* Abstract LB-258: Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells via beta 1 integrin mediated interactions. LB-258-LB-258 (2014) doi:10.1158/1538-7445.am2014-lb-258.
  84. Spiegel, A. *et al.* Neutrophils suppress intraluminal NK cell-mediated tumor cell clearance and enhance extravasation of disseminated carcinoma cells. *Cancer Discov.* **6**, 630–649 (2016).
  85. Coffelt, S. B. *et al.* IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* **522**, 345–348 (2015).
  86. Chen, M. B. *et al.* Inflamed neutrophils sequestered at entrapped tumor cells via chemotactic confinement promote tumor cell extravasation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 7022–7027 (2018).
  87. Qian, B. *et al.* A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS One* **4**, (2009).
  88. Qian, B. *et al.* Estp – tp1 annee 2006-2007 application 1. **475**, 1–9 (2007).
  89. Chen, Q., Zhang, X. H. F. & Massagué, J. Macrophage Binding to Receptor VCAM-1 Transmits Survival Signals in Breast Cancer Cells that Invade the Lungs. *Cancer Cell* **20**, 538–549 (2011).
  90. Liu, L. *et al.* Stromal myofibroblasts are associated with poor prognosis in solid cancers: A meta-analysis of published studies. *PLoS One* **11**, 1–16 (2016).
  91. Qiu, W. *et al.* No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas. *Nat. Genet.* **40**, 650–655 (2008).
  92. Bechtel, W. *et al.* Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat. Med.* **16**, 544–550 (2010).
  93. Paunescu, V. *et al.* Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: More similarities than differences. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 635–646 (2011).
  94. Wikström, P., Marusic, J., Stattin, P. & Bergh, A. Low stroma androgen receptor level in normal and tumor prostate tissue is related to poor outcome in prostate cancer patients. *Prostate* **69**, 799–809 (2009).
  95. Dulauroy, S., Di Carlo, S. E., Langa, F., Eberl, G. & Peduto, L. Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12 + perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury. *Nat. Med.* **18**, 1262–1270 (2012).

96. Jotzu, C. *et al.* Adipose tissue derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor derived factors. *Cell. Oncol.* **34**, 55–67 (2011).
97. Sahai, E. *et al.* A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 174–186 (2020).
98. Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 582–598 (2016).
99. Cremasco, V. *et al.* FAP delineates heterogeneous and functionally divergent stromal cells in immune-excluded breast tumors. *Cancer Immunol. Res.* **6**, 1472–1485 (2018).
100. Pelon, F. *et al.* Cancer-associated fibroblast heterogeneity in axillary lymph nodes drives metastases in breast cancer through complementary mechanisms. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
101. Kwa, M. Q., Herum, K. M. & Brakebusch, C. Cancer-associated fibroblasts: how do they contribute to metastasis? *Clin. Exp. Metastasis* **36**, 71–86 (2019).
102. Reid, S. E. *et al.* Tumor matrix stiffness promotes metastatic cancer cell interaction with the endothelium. *EMBO J.* **36**, 2373–2389 (2017).
103. Kalluri, R. & Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 392–401 (2006).
104. Pietras, K. & Östman, A. Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *Exp. Cell Res.* **316**, 1324–1331 (2010).
105. Stover, D. G., Bierie, B. & Moses, H. L. A delicate balance: TGF- $\beta$  and the tumor microenvironment. *J. Cell. Biochem.* **101**, 851–861 (2007).
106. Vong, S. & Kalluri, R. The Role of Stromal Myofibroblast and Extracellular Matrix in Tumor Angiogenesis. *Genes and Cancer* **2**, 1139–1145 (2011).
107. Olive, K. P. *et al.* Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science (80- )*. **324**, 1457–1461 (2009).
108. Provenzano, P. P. *et al.* Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **21**, 418–429 (2012).
109. Sotgia, F. *et al.* Caveolin-1 and cancer metabolism in the tumor microenvironment: Markers, models, and mechanisms. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **7**, 423–467 (2012).
110. Rattigan, Y. I. *et al.* Lactate is a mediator of metabolic cooperation between stromal carcinoma associated fibroblasts and glycolytic tumor cells in the tumor microenvironment. *Exp. Cell Res.* **318**, 326–335 (2012).
111. Duda, D. G. *et al.* Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21677–21682 (2010).
112. Grum-Schwensen, B. *et al.* Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene. *Cancer Res.* **65**, 3772–3780 (2005).
113. Ortiz-Otero, N. *et al.* Cancer associated fibroblasts confer shear resistance to circulating tumor cells during prostate cancer metastatic progression. *Oncotarget* **11**, 1037–1050 (2020).
114. Yu, Y. *et al.* Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- $\beta$  signalling. *Br. J. Cancer* **110**, 724–732 (2014).
115. Petersen, O. W. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am. J. Pathol.* **162**, 391–402 (2003).
116. Semba, S. *et al.* Direct cancer-stromal interaction increases fibroblast proliferation and enhances invasive properties of scirrhous-type gastric carcinoma cells. *Br. J. Cancer* **101**, 1365–1373 (2009).
117. Soon, P. S. H. *et al.* Breast cancer-associated fibroblasts induce epithelial-to-

- mesenchymal transition in breast cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* **20**, 1–12 (2013).
118. Ziani, L., Chouaib, S. & Thiery, J. Alteration of the antitumor immune response by cancer-associated fibroblasts. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
  119. Monteran, L. & Erez, N. The dark side of fibroblasts: Cancer-associated fibroblasts as mediators of immunosuppression in the tumor microenvironment. *Front. Immunol.* **10**, 1–15 (2019).
  120. Luga, V. *et al.* Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* **151**, 1542–1556 (2012).
  121. Donnarumma, E. *et al.* Cancer-associated fibroblasts release exosomal microRNAs that dictate an aggressive phenotype in breast cancer. *Oncotarget* **8**, 19592–19608 (2017).
  122. Hu, J. L. *et al.* CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Mol. Cancer* **18**, 1–15 (2019).
  123. Hu, Y. *et al.* Fibroblast-derived exosomes contribute to chemoresistance through priming cancer stem cells in colorectal cancer. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).
  124. Yang, X., Li, Y., Zou, L. & Zhu, Z. Role of exosomes in crosstalk between cancer-associated fibroblasts and cancer cells. *Front. Oncol.* **9**, 1–6 (2019).
  125. Fang, T. *et al.* Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer. *Nat. Commun.* **9**, 1–13 (2018).
  126. Kaplan, R. N. *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**, 820–827 (2005).
  127. Sharma, U. *et al.* Heterotypic clustering of circulating tumor cells and circulating cancer - associated fibroblasts facilitates breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* **189**, 63–80 (2021).
  128. Ao, Z. *et al.* Identification of cancer-associated fibroblasts in circulating blood from patients with metastatic breast cancer. *Cancer Res.* **75**, 4681–4687 (2015).
  129. Ishii, G. *et al.* Presence of Human Circulating Progenitor Cells for Cancer Stromal Fibroblasts in the Blood of Lung Cancer Patients. *Stem Cells* **25**, 1469–1477 (2007).
  130. Wintzell, M., Hjerpe, E., Åvall Lundqvist, E. & Shoshan, M. Protein markers of cancer-associated fibroblasts and tumor-initiating cells reveal subpopulations in freshly isolated ovarian cancer ascites. *BMC Cancer* **12**, (2012).
  131. Jones, M. L., Siddiqui, J., Pienta, K. J. & Getzenberg, R. H. Circulating fibroblast-like cells in men with metastatic prostate cancer. *Prostate* **73**, 176–181 (2013).
  132. Friedl, P., Locker, J., Sahai, E. & Segall, J. E. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* **14**, 777–783 (2012).
  133. Pearson, G. W. Control of Invasion by Epithelial-to-Mesenchymal Transition Programs during Metastasis. *J. Clin. Med.* **8**, 646 (2019).
  134. Gaggioli, C. *et al.* Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1392–1400 (2007).
  135. Yamaguchi, H. *et al.* Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. *PLoS One* **9**, 1–12 (2014).
  136. Labernadie, A. *et al.* A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* **19**, 224–237 (2017).
  137. Liu, C. *et al.* A zebrafish model discovers a novel mechanism of stromal fibroblast-mediated cancer metastasis. *Clin. Cancer Res.* **23**, 4769–4779 (2017).

138. Matsumura, Y. *et al.* Stromal fibroblasts induce metastatic tumor cell clusters via epithelial–mesenchymal plasticity. *Life Sci. Alliance* **2**, 1–24 (2019).
139. Giannoni, E. *et al.* Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res.* **70**, 6945–6956 (2010).
140. Clarke, R. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer - The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* **39**, 69–86 (1996).
141. Steel, G. G., Courtenay, V. D. & Peckham, M. J. The response to chemotherapy of a variety of human tumour xenografts. *Br. J. Cancer* **47**, 1–13 (1983).
142. Bosma, G. C., Custer, R. P. & Bosma, M. J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* **301**, 527–530 (1983).
143. Mosier, D. Transfer of functional human immune system to mice. 256–259 (1988).
144. Mosier, D. E., Lynn Stell, K., Gulizia, R. J., Torbett, B. E. & Gilmore, G. L. Homozygous scid/scid; beige/beige mice have low levels of spontaneous or neonatal T cell-induced B cell generation. *J. Exp. Med.* **177**, 191–194 (1993).
145. Schackert, G., Price, J. E., Bucana, C. D. & Fidler, I. J. Unique patterns of brain metastasis produced by different human carcinomas in athymic nude mice. *Int. J. Cancer* **44**, 892–897 (1989).
146. Briinner, N., Fojo, A., Freter, C. E., Lippman, M. E. & Clarke, R. Acquisition of Hormone-independent Growth in MCF-7 Cells Is Accompanied by Increased Expression of Estrogen-regulated Genes but Without Detectable DNA Amplifications. *Cancer Res.* **53**, 283–290 (1993).
147. Thompson, E. W. *et al.* The invasive and metastatic properties of hormone-independent but hormone-responsive variants of MCF-7 human breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* **11**, 15–26 (1993).
148. Briinner, N. *et al.* MCF7/LCC2: A 4-Hydroxytamoxifeii Resistant Human Breast Cancer Variant That Retains Sensitivity to the Steroidal Antiestrogen ICI 182,780. *Cancer Res.* **53**, 3229–3232 (1993).
149. Meyvisch, C. Influence of implantation site on formation of metastases. *Cancer Metastasis Rev.* **2**, 295–306 (1983).
150. Morikawa, K. *et al.* Influence of Organ Environment on the Growth, Selection, and Metastasis of Human Colon Carcinoma Cells in Nude Mice. *Cancer Res.* **48**, 6863–6871 (1988).
151. Holliday, D. L. & Speirs, V. Choosing correct breast cancer cell line for breast cancer research. *Breast cancer Res.* **13**, 1–7 (2011).
152. Cleris, L., Daidone, M. G., Fina, E. & Cappelletti, V. The Detection and Morphological Analysis of Circulating Tumor and Host Cells in Breast Cancer Xenograft Models. (2019).
153. Wei, R. *et al.* CTC clusters induced by heparanase enhance breast cancer metastasis. *Nat. Publ. Gr.* 1–12 (2018) doi:10.1038/aps.2017.189.
154. Agarwal, A. & Balic, M. Circulating Tumor Cells. **24**, 70–77 (2018).
155. Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R. J. & Speirs, V. Breast cancer cell lines: Friend or foe? *Breast Cancer Res.* **5**, 89–95 (2003).
156. Ramani, V. C. *et al.* Investigating circulating tumor cells and distant metastases in patient-derived orthotopic xenograft models of triple- negative breast cancer. 1–16 (2019).
157. Derose, Y. S. *et al.* Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically

- reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat. Med.* **17**, 1514–1520 (2011).
158. Giuliano, M. *et al.* Circulating and disseminated tumor cells from breast cancer patient-derived xenograft-bearing mice as a novel model to study metastasis. 1–9 (2015) doi:10.1186/s13058-014-0508-5.
  159. Taftaf, R. *et al.* ICAM1 initiates CTC cluster formation and trans-endothelial migration in lung metastasis of breast cancer. *Nat. Commun.* (2021) doi:10.1038/s41467-021-25189-z.
  160. Marangoni, E. *et al.* A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin. Cancer Res.* **13**, 3989–3998 (2007).
  161. Tentler, J. J. *et al.* Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **9**, 338–350 (2012).
  162. Murayama, T. & Gotoh, N. Patient-Derived Xenograft Models of Breast Cancer and Their Application. *Cells* **8**, 621 (2019).
  163. DeRose, Y. S. *et al.* *Patient-derived models of human breast cancer: Protocols for in vitro and in vivo applications in tumor biology and translational medicine. Current Protocols in Pharmacology* (2013). doi:10.1002/0471141755.ph1423s60.
  164. Whittle, J. R., Lewis, M. T., Lindeman, G. J. & Visvader, J. E. Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. *Breast Cancer Res.* **17**, (2015).
  165. Zhang, L. *et al.* NIH Public Access. **5**, (2013).
  166. Tumor, C., Ctcs, C., Pawlikowska, P. & Farace, F. CTC-Derived Models : A Window into the Seeding. *Cells* 1–17 (2019).
  167. Baccelli, I. *et al.* Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat. Biotechnol.* **31**, 539–544 (2013).
  168. Pereira-Veiga, T. *et al.* CTCs-derived xenograft development in a triple negative breast cancer case. *Int. J. Cancer* **144**, 2254–2265 (2019).
  169. Girotti, M. R. *et al.* Application of sequencing, liquid biopsies, and patient-derived xenografts for personalized medicine in melanoma. *Cancer Discov.* **6**, 286–299 (2016).
  170. Hodgkinson, C. L. *et al.* Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat. Med.* **20**, 897–903 (2014).
  171. Drapkin, B. J. *et al.* Genomic and functional fidelity of small cell lung cancer patient-derived xenografts. *Cancer Discov.* **8**, 600–615 (2018).
  172. Vishnoi, M. *et al.* The identification of a TNBC liver metastasis gene signature by sequential CTC-xenograft modeling. *Mol. Oncol.* **13**, 1913–1926 (2019).
  173. Andree, K. C. *et al.* Toward a real liquid biopsy in metastatic breast and prostate cancer: Diagnostic LeukApheresis increases CTC yields in a European prospective multicenter study (CTCTrap). *Int. J. Cancer* **143**, 2584–2591 (2018).
  174. Faugeroux, V. *et al.* Genetic characterization of a unique neuroendocrine transdifferentiation prostate circulating tumor cell-derived eXplant model. *Nat. Commun.* **11**, 1–16 (2020).
  175. Hörstgen-Schwark, G. Production of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Aquaculture* **112**, 25–37 (1993).
  176. Kirchberger, S., Sturtzel, C., Pascoal, S. & Distel, M. Quo natus, Danio?—Recent Progress in Modeling Cancer in Zebrafish. *Front. Oncol.* **7**, (2017).
  177. Lam, S. H., Chua, H. L., Gong, Z., Lam, T. J. & Sin, Y. M. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: A gene expression

- profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol.* **28**, 9–28 (2004).
178. He, S. *et al.* Neutrophil-mediated experimental metastasis is enhanced by VEGFR inhibition in a zebrafish xenograft model. 431–445 (2012).
  179. Wang, J. *et al.* Novel Mechanism of Macrophage-Mediated Metastasis Revealed in a Zebrafish Model of Tumor Development. **75**, 306–316 (2015).
  180. Lee, L. M. J., Seftor, E. A., Bonde, G., Cornell, R. A. & Hendrix, M. J. C. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: Assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev. Dyn.* **233**, 1560–1570 (2005).
  181. Haldi, M., Ton, C., Seng, W. L. & McGrath, P. Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis* **9**, 139–151 (2006).
  182. Hason, M. & Bartůněk, P. Zebrafish models of cancer-new insights on modeling human cancer in a non-mammalian vertebrate. *Genes (Basel)*. **10**, 1–30 (2019).
  183. Barriuso, J., Nagaraju, R. & Hurlstone, A. Zebrafish: A new companion for translational research in oncology. *Clin. Cancer Res.* **21**, 969–975 (2015).
  184. Follain, G. *et al.* Hemodynamic Forces Tune the Arrest, Adhesion, and Extravasation of Circulating Tumor Cells. *Dev. Cell* **45**, 33-52.e12 (2018).
  185. Osmani, N. *et al.* Metastatic Tumor Cells Exploit Their Adhesion Repertoire to Counteract Shear Forces during Intravascular Arrest. *Cell Rep.* **28**, 2491-2500.e5 (2019).
  186. Allen, T. A. *et al.* Circulating tumor cells exit circulation while maintaining multicellularity, augmenting metastatic potential. *J. Cell Sci.* **132**, (2019).
  187. Au, S. H. *et al.* Clusters of circulating tumor cells traverse capillary-sized vessels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 4947–4952 (2016).
  188. Marques, I. J. *et al.* Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model. *BMC Cancer* **9**, 1–14 (2009).
  189. Banasavadi-Siddegowda, Y. K. *et al.* PRMT5 as a druggable target for glioblastoma therapy. *Neuro. Oncol.* **20**, 753–763 (2018).
  190. Wu, J. Q. *et al.* Patient-derived xenograft in zebrafish embryos: A new platform for translational research in gastric cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **36**, 1–10 (2017).
  191. Yan, C. *et al.* Visualizing Engrafted Human Cancer and Therapy Responses in Immunodeficient Zebrafish. *Cell* **177**, 1903-1914.e14 (2019).
  192. Mercatali, L. *et al.* Development of a patient-derived xenograft (PDX) of breast cancer bone metastasis in a Zebrafish model. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
  193. Martínez-Pena, I. *et al.* Dissecting breast cancer circulating tumor cells competence via modelling metastasis in zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–20 (2021).
  194. Cabezas-Sainz, P. *et al.* Morphological abnormalities and gene expression changes caused by high incubation temperatures in zebrafish xenografts with human cancer cells. *Genes (Basel)*. **12**, 1–12 (2021).
  195. Ren, J., Liu, S., Cui, C. & Ten Dijke, P. Invasive behavior of human breast cancer cells in embryonic zebrafish. *J. Vis. Exp.* **2017**, 1–9 (2017).
  196. Karnoub, A. E. *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **449**, 557–563 (2007).
  197. Kim, M., Choi, H. Y., Woo, J. W., Chung, Y. R. & Park, S. Y. Role of CXCL10 in the progression of in situ to invasive carcinoma of the breast. *Sci. Rep.* **11**, 1–12 (2021).
  198. Rosette, C. *et al.* Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells.

- Carcinogenesis* **26**, 943–950 (2005).
199. Chen, H., Yang, W. W., Wen, Q. T., Xu, L. & Chen, M. TGF- $\beta$ -induced fibroblast activation protein expression, fibroblast activation protein expression increases the proliferation, adhesion, and migration of HO-8910PM. *Exp. Mol. Pathol.* **87**, 189–194 (2009).
  200. Hurtado, P., Martínez-Pena, I. & Piñeiro, R. Dangerous liaisons: Circulating tumor cells (ctcs) and cancer-associated fibroblasts (cafs). *Cancers (Basel)*. **12**, 1–23 (2020).
  201. Gao, Q. *et al.* Heterotypic CAF-tumor spheroids promote early peritoneal metastasis of ovarian cancer. *J. Exp. Med.* **216**, 688–703 (2019).
  202. Cells, T. & Microenvironment, B. Never Travel Alone : The Crosstalk of Circulating. 1–12 (2019).
  203. Sharma, U. *et al.* Heterotypic clustering of circulating tumor cells and circulating cancer-associated fibroblasts facilitates breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* **189**, 63–80 (2021).
  204. May, A. N., Crawford, B. D. & Nedelcu, A. M. In vitro model-systems to understand the biology and clinical significance of circulating tumor cell clusters. *Front. Oncol.* **8**, 9–12 (2018).
  205. Dvorak, K. M. *et al.* Carcinoma associated fibroblasts (CAFs) promote breast cancer motility by suppressing mammalian Diaphanous-related formin-2 (mDia2). *PLoS One* **13**, 1–22 (2018).
  206. Martinez-Outschoorn, U. E. *et al.* Tumor cells induce the cancer associated fibroblast phenotype via caveolin-1 degradation: Implications for breast cancer and DCIS therapy with autophagy inhibitors. *Cell Cycle* **9**, 2423–2433 (2010).
  207. Martinez-Outschoorn, U. E. *et al.* Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival: Role of hypoxia, HIF1 induction and NF $\kappa$ B activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell Cycle* **9**, 3515–3533 (2010).
  208. Butcher, D. T., Alliston, T. & Weaver, V. M. A tense situation: Forcing tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 108–122 (2009).
  209. De Palma, M., Biziato, D. & Petrova, T. V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 457–474 (2017).
  210. Characteristics, M. *et al.* Breast Fibroblasts Modulate Early Dissemination , Tumorigenesis , and Metastasis through Alteration of Extracellular. *Neoplasia* **15**, 249–262, IN1–IN7 (2013).
  211. Chen, P. *et al.* Breast cancer associated fibroblasts promote MCF-7 invasion in vitro by secretion of HGF. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. - Med. Sci.* **32**, 92–96 (2012).
  212. Wu, F. *et al.* Signaling pathways in cancer-associated fibroblasts and targeted therapy for cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 1–35 (2021).
  213. Izar, B. *et al.* Bidirectional cross talk between patient-derived melanoma and cancer-associated fibroblasts promotes invasion and proliferation. *Pigment Cell Melanoma Res.* **29**, 656–668 (2016).
  214. Bhowmick, N. A., Neilson, E. G. & Moses, H. L. and progression. **432**, (2004).
  215. Bronzert, D. A. *et al.* Synthesis and secretion of platelet-derived growth factor by human breast cancer cell lines. **84**, 5763–5767 (1987).
  216. Peña, C., Céspedes, M. V. & Lindh, M. B. STC1 expression by cancer-associated fibroblasts drives metastasis of colorectal cancer. (2012) doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1875.
  217. Elenbaas, B. & Weinberg, R. A. Heterotypic Signaling between Epithelial Tumor Cells and Fibroblasts in Carcinoma Formation. **184**, 169–184 (2001).

218. Orimo, A. *et al.* Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1 / CXCL12 Secretion. *121*, 335–348 (2005).
219. Erdogan, B. & Webb, D. J. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. *Biochem. Soc. Trans.* **45**, 229–236 (2017).
220. Strouhalova, K. *et al.* Vimentin intermediate filaments as potential target for cancer treatment. *Cancers (Basel)*. **12**, 1–20 (2020).
221. Li, Z. H. & Bresnick, A. R. The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with myosin-IIA. *Cancer Res.* **66**, 5173–5180 (2006).
222. Adams, E. F. *et al.* Effects of human breast fibroblasts on growth and 17 $\beta$ -estradiol dehydrogenase activity of MCF-7 cells in culture. *Breast Cancer Res. Treat.* **11**, 165–172 (1988).
223. Trimis, G., Chatzistamou, I., Politi, K., Kiaris, H. & Papavassiliou, A. G. Expression of p21waf1/Cip1 in stromal fibroblasts of primary breast tumors. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3596–3600 (2008).
224. Frisch, S. M. & Francis, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* **124**, 619–626 (1994).
225. Ren, J. *et al.* Gremlin 1 promotes breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* **21**, 1–19 (2019).
226. LeBleu, V. S. & Kalluri, R. A peek into cancer-associated fibroblasts: Origins, functions and translational impact. *DMM Dis. Model. Mech.* **11**, 1–9 (2018).
227. Peng, Q. *et al.* Biological Characteristics and Genetic Heterogeneity between Carcinoma-Associated Fibroblasts and Their Paired Normal Fibroblasts in Human Breast Cancer. *PLoS One* **8**, (2013).
228. O’Connell, J. T. *et al.* VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4 + stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16002–16007 (2011).
229. Alkasalias, T., Moyano-Galceran, L., Arsenian-Henriksson, M. & Lehti, K. Fibroblasts in the tumor microenvironment: Shield or spear? *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–21 (2018).
230. Costa, A. *et al.* Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* **33**, 463-479.e10 (2018).
231. Sebastian, A. *et al.* Single-Cell Transcriptomic Analysis of Heterogeneity in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. **12**, E1307 (2020).
232. Chen, X. & Song, E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 99–115 (2019).
233. Shiga, K. *et al.* Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers (Basel)*. **7**, 2443–2458 (2015).
234. SUN, X. & CHEN, Z. Cancer-associated fibroblast-derived CCL5 contributes to cisplatin resistance in A549 NSCLC cells partially through upregulation of lncRNA HOTAIR expression. *Oncol. Lett.* **22**, 1–11 (2021).
235. Amino, S. & Disulfide, P. M. Alternate names Family. **5**,.
236. Niwa, Y. *et al.* Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**, 285–289 (2001).
237. Soria, G. & Ben-Baruch, A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Lett.* **267**, 271–285 (2008).
238. Velasco-Velázquez, M. *et al.* CCR5 antagonist blocks metastasis of basal breast cancer cells. *Cancer Res.* **72**, 3839–3850 (2012).

239. Ali, S. & Lazenec, G. Chemokines: Novel targets for breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 401–420 (2007).
240. Lipson, E. J. Re-orienting the immune system: Durable tumor regression and successful re-induction therapy using anti-PD1 antibodies. *Oncoimmunology* **2**, 4–7 (2013).
241. Clark, A. M., Heusey, H. L., Griffith, L. G., Lauffenburger, D. A. & Wells, A. IP-10 (CXCL10) Can Trigger Emergence of Dormant Breast Cancer Cells in a Metastatic Liver Microenvironment. *Front. Oncol.* **11**, 1–10 (2021).
242. Tsuyada, A. *et al.* CCL2 mediates cross-talk between cancer cells and stromal fibroblasts that regulates breast cancer stem cells. *Cancer Res.* **72**, 2768–2779 (2012).
243. Yoshimura, T. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: A foe or ally? *Cell. Mol. Immunol.* **15**, 335–345 (2018).
244. Arina, A. *et al.* Tumor-associated fibroblasts predominantly come from local and not circulating precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 7551–7556 (2016).
245. Yin, C. *et al.* Hepatic stellate cells in liver development , regeneration , and cancer Find the latest version : Review series Hepatic stellate cells in liver development , regeneration , and cancer. *J. Clin. Invest.* **123**, 1902–1910 (2013).
246. Quante, M. *et al.* Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth. *Cancer Cell* **19**, 257–272 (2011).
247. Iwano, M. *et al.* Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* **110**, 341–350 (2002).
248. Zeisberg, E. M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M. & Kalluri, R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* **67**, 10123–10128 (2007).
249. Bartoschek, M. *et al.* Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
250. Nurmik, M., Ullmann, P., Rodriguez, F., Haan, S. & Letellier, E. In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *Int. J. Cancer* **146**, 895–905 (2020).
251. Kraman, M. Suppression of Antitumor. **827**, (2014).
252. Liao, D., Luo, Y., Markowitz, D., Xiang, R. & Reisfeld, R. A. Cancer Associated Fibroblasts Promote Tumor Growth and Metastasis by Modulating the Tumor Immune Microenvironment in a 4T1 Murine Breast Cancer Model. **4**, (2009).
253. Pentcheva-hoang, T. *et al.* Article Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. 719–734 (2014) doi:10.1016/j.ccr.2014.04.005.
254. Frings, O. *et al.* Prognostic Significance of a Gene Signature Capturing Stromal PDGF Signaling. *Am. J. Pathol.* **182**, 2037–2047 (2013).
255. Paulsson, J., Ehnman, M. & Östman, A. PDGF receptors in tumor biology : prognostic and predictive potential. **10**, 1695–1708 (2014).
256. Paulsson, J. *et al.* Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor  $\beta$ -receptor expression in human breast cancer. *Am. J. Pathol.* **175**, 334–341 (2009).
257. Pinto, M. P., Dye, W. W., Jacobsen, B. M. & Horwitz, K. B. Malignant stroma increases luminal breast cancer cell proliferation and angiogenesis through platelet-derived growth factor signaling. *BMC Cancer* **14**, 1–12 (2014).
258. Kojima, Y. *et al.* Autocrine TGF- $\beta$  and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling

- drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 20009–20014 (2010).
259. Yang, L. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate to hepatic myofibroblasts by transforming growth factor- $\beta$ 1 via sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis. *Am. J. Pathol.* **181**, 85–97 (2012).
260. Sun, D., Wu, J., He, Z., He, M. & Sun, H. Cancer-associated fibroblast regulate proliferation and migration of prostate cancer cells through TGF- $\beta$  signaling pathway. *Life Sci.* **235**, 116791 (2019).
261. Han, C., Liu, T. & Yin, R. Biomarkers for cancer-associated fibroblasts. *Biomark. Res.* **8**, 1–8 (2020).
262. Alkasaliasa, T. *et al.* Inhibition of tumor cell proliferation and motility by fibroblasts is both contact and soluble factor dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 17188–17193 (2014).
263. Richardson, A. M. *et al.* Vimentin is required for lung adenocarcinoma metastasis via heterotypic tumor cell–Cancer-associated fibroblast interactions during collective invasion. *Clin. Cancer Res.* **24**, 420–432 (2018).



# APÉNDICES



## APÉNDICES

### INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL



VICERREITORADO DE INVESTIGACIÓN  
E INNOVACIÓN  
Oficina de Investigación e Tecnoloxía

Edificio CACTUS – Campus universitario sur  
15782 Santiago de Compostela  
Tel: 981 547 040 - Fax 981 547 077  
Correo electrónico: [ctinfo@usc.es](mailto:ctinfo@usc.es)  
<http://imsisd.usc.es>

#### Informe del Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de los centros usuarios de animales de experimentación de la USC en el Campus de Santiago

El CEEA de los centros usuarios de animales de experimentación de la USC en el Campus de Santiago, tras evaluar el Proyecto titulado “Desarrollo de xenotrasplantes derivados de Células Tumorales Circulantes (CTC) de pacientes metastásicos en modelos murinos” del que es Investigadora Responsable Dña. Clotilde Costa Nogueira, acordó con fecha 1 de Octubre de 2018 emitir

#### INFORME FAVORABLE

para la realización de dicho proyecto, así como los procedimientos que incluye, en las instalaciones del establecimiento usuario Animalario del CIMUS, con número de registro ES150780275701, siempre que, en cumplimiento del RD 53/2013, se obtenga la correspondiente autorización administrativa.

En Santiago, a 3 de Octubre de 2018

Fdo. El secretario

Fdo. El presidente

Responsable administrativo:

Nombre: Raúl Vieira Miguel  
Cargo: Director de la RIAIDT de USC

V.B. Firma y sello



**CERTIFICADO DE CAPACITACIÓN EN EL MANEJO DE ANIMALES**

REGISTRO DE SALIDA  
Ref.: 10/237839 9/16 Fecha: 10/11/2016 14:46

CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE  
ADMINISTRACIÓN LOCAL  
Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO

Cons. Medio Amb. Admon. Local y O.  
Reg. C. Medio Amb. Adm. Local y Ord. T. (ALC)  
Destino: Pablo Hurtado Blanco

Ref.: CAP-0162-16

**Comunidad de Madrid**

D./D.ª PABLO HURTADO BLANCO  
C/ SANTA VALENTINA, 1, ESC. IZQ.  
28029 MADRID- MADRID

Notifico a Vd. que el Sr. Director General de Agricultura y Ganadería, ha dictado la siguiente Resolución:

“Vista la solicitud formulada por D./D.ª. PABLO HURTADO BLANCO, con DNI 23310411A, para obtener el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de EUTANASIA DE LOS ANIMALES, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS en ROEDORES.

Visto el informe favorable del Área de Protección Animal.

Considerando que el solicitante cumple los requisitos para estimar su solicitud, por lo dispuesto en la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.


Esta Dirección General ha resuelto: reconocer la capacitación a D./D.ª. PABLO HURTADO BLANCO, con DNI 23310411A, para realizar las funciones de EUTANASIA DE LOS ANIMALES, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS en ROEDORES.

El mantenimiento de esta capacitación se debe demostrar al menos cada ocho años, en los términos que establece el artículo 20 de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, a partir de la fecha de esta Resolución.

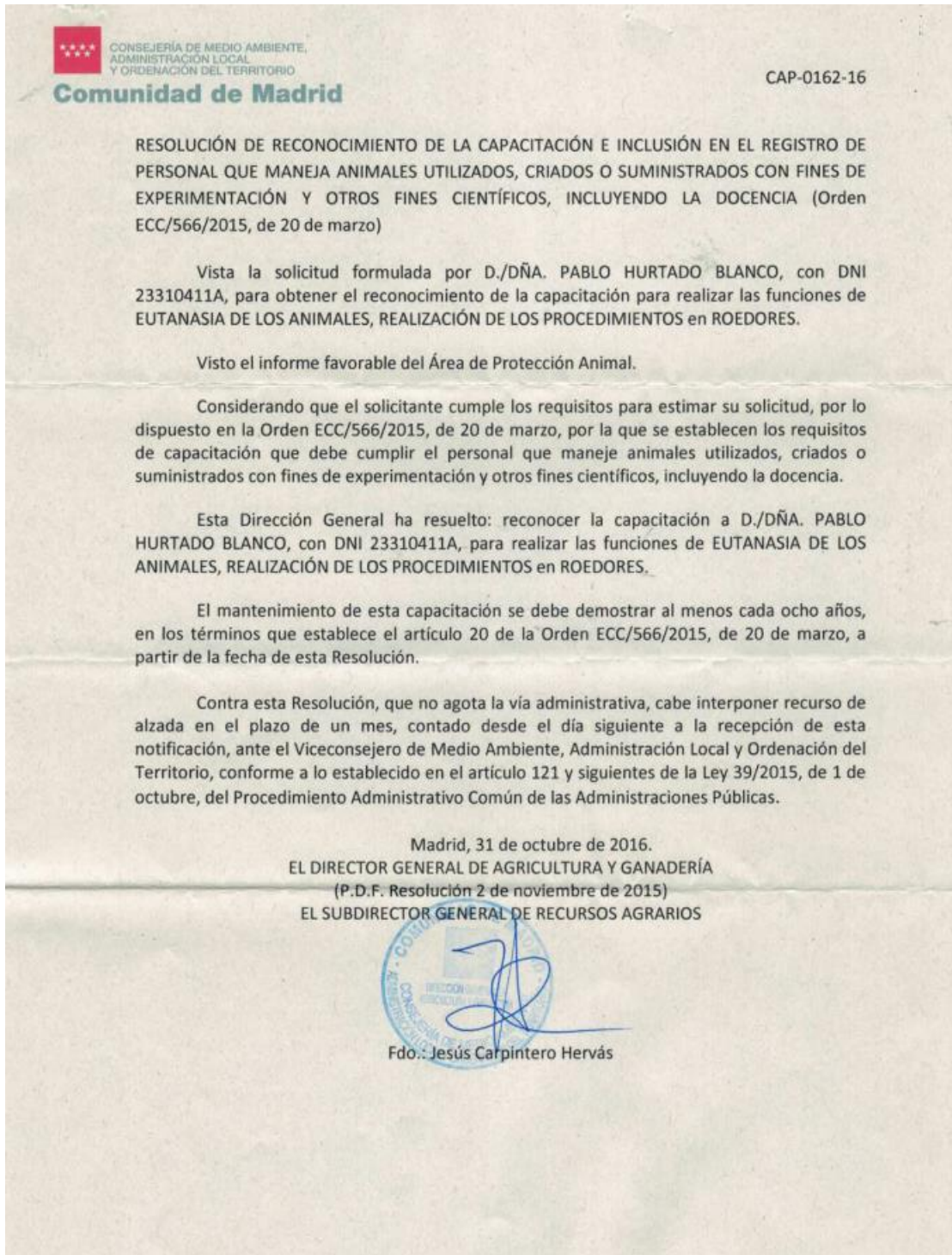
Contra esta Resolución, que no agota la vía administrativa, cabe interponer recurso de alzada en el plazo de un mes, contado desde el día siguiente a la recepción de esta notificación, ante el Viceconsejero de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, conforme a lo establecido en el artículo 121 y siguientes de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas.”

Se adjunta Certificado de Capacitación.

Madrid, 31 de octubre de 2016  
ÁREA DE PROTECCIÓN ANIMAL  
LA JEFA DE SECCIÓN TÉCNICA I

  
Fdo.: Sonia García Gómez

 CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE, ADMINISTRACIÓN LOCAL Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO <b>Comunidad de Madrid</b>	
<b>Certificado de reconocimiento de la capacitación para manejar animales                  utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines                  científicos, incluyendo la docencia. Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo</b>	
D./Dña. <b>PABLO HURTADO BLANCO</b> , con DNI <b>23310411A</b> , ha obtenido el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de:	
EUTANASIA DE LOS ANIMALES REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS	
en los siguientes grupos de especies animales:	
ROEDORES	
<b>Nº de certificado: CAP-0162-16</b>	
<b>ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO</b> Dirección General de Agricultura y Ganadería. Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio. Comunidad de Madrid	
El reconocimiento de la capacitación para la realización de las funciones relacionadas en este certificado surtirá efecto en todo el territorio nacional.	
<b>Fecha</b> 31 de octubre de 2016	<b>Sello</b> 
EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA (P.D.F. Resolución 2 de noviembre de 2015)	
EL SUBDIRECTOR GENERAL DE RECURSOS AGRARIOS  Fdo: Jesús Carpintero Hervás	





El 90% de las muertes asociadas con cáncer se deben a la metástasis, proceso en el que la intercomunicación dinámica existente entre el tumor y el microambiente tumoral es un factor clave. Las células tumorales circulantes o CTC son aquellas células capaces de diseminar y formar nuevos focos tumorales, viajando en la sangre de forma individual o en clústeres. Nuestro objetivo es estudiar cómo el microambiente de los tumores de mama condiciona el potencial metastásico de CTC y clústeres de CTC. Para ello, se emplearán co-cultivos celulares que representen la heterogeneidad celular presente en los tumores y a partir de los que obtener clústeres de CTC de distinta composición. Esto nos permitirá estudiar la contribución de sus componentes, centrándonos en los fibroblastos asociados a cáncer, a la diseminación tumoral.