

Células madre tumorales de PANC-1: estudio preliminar del efecto de Olaparib y doxorubicina

Francisco Quiñonero^{1,2,3}, Ana Cepero^{1,2,3}, David Urbano¹, Inmaculada Zafra¹, Cristina Jiménez-Luna^{1,3}, Gloria Perazzoli^{1,3}, Cristina Mesas^{1,2,3}, Celia Velez^{1,2,3}

¹Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Center of Biomedical Research (CIBM), University of Granada, Granada, Spain

²Department of Anatomy and Embryology, University of Granada, Granada, Spain

³Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), SAS-Universidad de Granada, Granada, Spain

*Corresponding author: C. Vélez. Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), University of Granada, 18100 Granada, Spain. Phone: +34-958-249322; mail: mariaceliavelez@ugr.es

Introducción

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDA), posee una elevada tasa de mortalidad debido a su agresividad clínica y diagnóstico tardío [1]. Representa el 2,7% de todos los cánceres y es la séptima causa más común de muerte) [2]. Su tasa de supervivencia anual a los 5 años es del 6% [3, 4]. Su tratamiento se basa en la resección quirúrgica que sólo puede llevarse a cabo en el 20% [6]. La cirugía se complementa con el uso de quimiorradiación o de quimioterapia [7]. La gemcitabina (GEM) y 5-fluorouracilo (5-FU) son los agentes más utilizados en estadios no metastásicos [8], e irinotecán, 5-FU, oxaliplatino y leucovorina (FOLFIRINOX) en estadios metastásicos [9].

El fracaso del tratamiento quimioterapéutico en PAD se debe en gran medida al desarrollo de resistencia a los medicamentos. En este contexto, la existencia de células madre en el cáncer (CSCs) es uno de los factores esenciales ya que este tipo celular desarrolla mecanismos de resistencia que evitan la acción de los citotóxicos. Además, las CSCs postula

parecen responsables de la recurrencia del tumor y metástasis (migración celular) [10]. Algunos de estos mecanismos implica la sobreexpresión de proteínas P-glicoproteína, BCRP y MRP, que expulsan drogas al exterior de la célula, NFκB y STAT3 que evitan la apoptosis o la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) que es capaz de reparar del ADN lesionado por los citotóxicos [11]. La sobre-expresión de PARP-1 ha sido encontrada en diferentes tumores humanos, como el colorrectal, mama, piel, pulmón o hepatocelular [12]. No obstante, poco se sabe en cuánto a PARP-1 y su relación con CSCs. Algunos estudios han relacionado la PARP-1 con los procesos iniciales de reprogramación celular y pluripotencialidad en células madre [13]. No obstante, el desarrollo de fármacos inhibidores de PARP-1 independientemente de su presencia en CSCs si parece que actúan como quimio y radio sensibilizador [14]. Uno de los más estudiados ha sido Olaparib (15). Finalmente, las CSCs se caracterizan por su alta expresión de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), su habilidad de mantenerse quiescente y por

ser moduladas por el microambiente tumoral [16,17,18,19,20]. Por tanto, las CSCs parecen una buena diana a tratar en los tumores, para permitir una respuesta más efectiva y duradera en el tiempo, y evitar así recidivas tumorales.

Presentamos un estudio preliminar de la presencia de CSCs en una línea de adenocarcinoma de páncreas y los efectos del tratamiento con olaparib en las características biológicas de estas células.

Metodología

1. Cultivos celulares y reactivos

En este estudio se usó sólo la línea celular tumoral PANC-1 (cáncer de páncreas) procedente del Banco de Células del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. La línea PANC-1 fue mantenida en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Biowest) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Fetal Bovine Suerum) y antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina). Los cultivos se mantuvieron en un incubador a 37 °C, en una atmósfera saturada de humedad y con 5% de CO₂, cambiando el medio de cultivo, tripsinizando y replicando los cultivos cuando las condiciones de confluencia lo determinaban. Estas células se caracterizan por su alta expresión de PARP-1 (21). Las células se trataron con Doxorubicina (1 µg/ml). El tratamiento con Olaparib (10 µM, 72h) se realizó para inhibir PARP-1 y siguiendo el protocolo establecido por Hou et al. (22).

2. Formación de tumorosferas

Además de mantener la línea parental de PANC-1 en medio de cultivo normal (parentales), estas células fueron cultivadas también en medio de esferas (ME): DMEM:F12 suplementado con 1% de estreptomina/penicilina, Hidrocortisona (1 µg/ml), Heparina (4 ng/ml), ITS (insulina, 10

µg/ml), B27 (concentración 1x), EGF (10 ng/ml) y FGF (20 ng/ml). Se usaron en una placa de 96 pocillos. La concentración de partida de 500 células. Una vez formadas las tumorosferas (en suspensión) se centrifugaron, se añadió 1 ml de tripsina y se disgregaron. Después de neutralizar la tripsina con medio con suero normal, se centrifugaron de nuevo y estas células disgregadas volvieron a sembrarse en medio de esferas (CSC). Además, estas células también se sembraron en medio normal denominándose excancer stem cells (ExCSC).

3. Estudios de aldefluor en los diferentes cultivos celulares

Para asegurar la proporción de CSCs en los diferentes cultivos, se usó la actividad de la enzima aldehído-deshidrogenasa (ALDH) utilizando el kit ALDEFLUOR™ (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), siguiendo el protocolo del kit. Células tripsinizadas fueron centrifugadas (250 g durante 5 min a 4 °C), y resuspendidas en tampón. Se les añadió dietilaminobenzaldehído (DEAB) (10 µl/ml) para inhibir la actividad ALDH, se añadió ALDEFLUOR™ (5 µl/ml) y se incubaron a 37 °C, 40 minutos en oscuridad. Tras centrifugación (250 g, 4 °C, 5 minutos), se resuspendieron en 0,5 ml de tampón. La actividad de ALDH se analizó mediante FACS Aria II (BD Bio- Sciences) con módulo de separación (Sorting) celular. Las células separadas en función de sus niveles de ALDH, fueron contenidas en tubos con medio DMEM separados en "ALDH positivas" y "ALDH negativas".

Resultados y discusión

Análisis de células aldefluor positivas en diferentes cultivos de PANC-1

De los cultivos de la línea tumoral PANC-1 se obtuvieron 3 tipos de células diferentes denominadas parentales, células derivadas de esferas (CSCs) y células derivadas de

esferas en cultivo normal (exCSC). El estudio de la actividad ALDH+, demostró que las células derivadas de esferas (CSCs) presentaban la más alta actividad ALDH, muy superior a la de las parentales y que las exCSCs (figura 1) y que las exCSCs fueron las que presentaron menor marcaje.

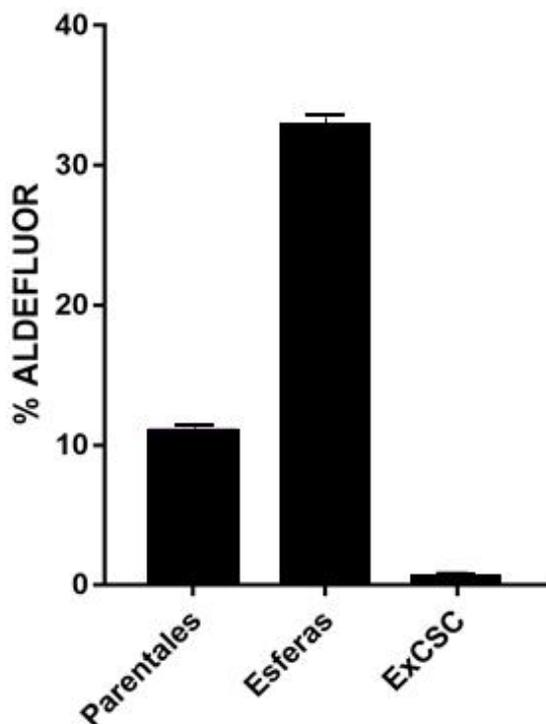


Figura 1. Porcentaje de células ALDEFLUOR + en células PANC-1 parentales, derivadas de esferas (CSCs) y derivadas de esferas en cultivo normal (exCSC).

Modulación de la actividad de la Doxorubicina en cultivos de PANC-1

Dado que las células PANC-1 presentan expresión constitutiva de PARP-1, se realizó un estudio de mediante tratamiento con Olaparib, que bloquea PAR-1, y el agente a Doxorubicina para ver la modulación de su actividad. Como se observa en la Figura 2, las células derivadas de las esferas (CSCs) y con mayor presencia de células ALDH+, fueron muy resistentes a Doxorubicina mientras que las ExCSCs, con la menor tasa células ALDH+, fueron las más sensibles. Por otro lado, el inhibidor de PARP-1 Olapararib, potencian débilmente la muerte celular de Doxorubicina en CSCs. Este efecto no pudo ser observado en las ExCSCs.

Los estudios en la línea tumoral PANC-1 permitieron obtener tres cultivos diferentes, parental, esferas y exCSC en los que se realizaron análisis del porcentaje de células ALDEFLUOR positivas, observando una mayor proporción de ALDH positivas en las esferas, lo cual se relacionaría con una mayor proporción de CSC en comparación la línea parental. El estudio de la resistencia de las esferas y las ExCSC se realizó mediante la exposición a Doxorubicina con y sin Olaparib. Los resultados mostraron que las esferas presentaban una mayor resistencia al fármaco, lo cual podría indicar que la proporción de CSC en ellas es mucho mayor. Además, se observó que la adición de Olaparib provocaba una sensibilización de estas células al fármaco, mientras que en las ExCSC no se observaban diferencias significativas, hecho descrito por otros autores. Por tanto, Olaparib representa una opción interesante para su uso específico frente a las CSCs.

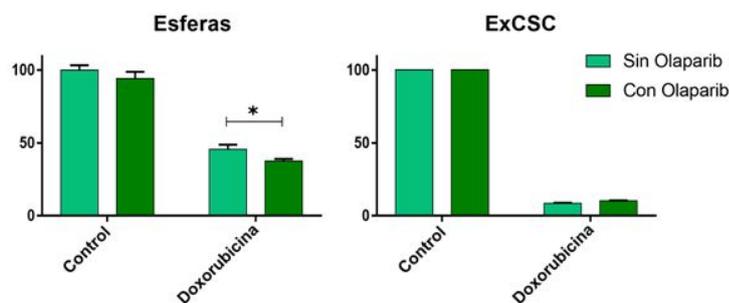


Figura 2. Resistencia a Doxorubicina en presencia o ausencia de Olaparib. Doxorubicina 1 µg/mL. Olaparib 10 µM. * P < 0,05.

En conclusión, en este muy preliminar estudio, las esferas de la línea celular PANC-1 presentan mayor resistencia a fármacos que las ExCSC y una mayor expresión de marcadores relacionados con la pluripotencia y que olaparib en las esferas potencia el efecto citotóxico de Doxorubicina. Estos resultados deben ser confirmados y completados con estudios más profundos que dilucidan la importancia de CSCs en ADP, la función de PARP-1 y los efectos de Olaparib.

Referencias

- Zhang C, Yan Y, Zou Q, Chen J, Li C. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR imaging of pancreatic cancer: Potential for early diagnosis through targeted strategies. *Asia Pac J Clin Oncol* 2016; 12: 13-21.
- Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Available at: <https://gco.iarc.fr/> [accessed November 15, 2019]
- The Cancer Survival in High-Income Countries (SURVMARK-2) project, International Cancer Benchmarking Partnership (ICBP). Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). Available at: <http://gco.iarc.fr/survival/survmark/visualizations/> [accessed November 30, 2019].
- Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 9694-705.
- Kurtanich T, Roos N, Wang G, et al. Pancreatic Cancer Gene Therapy Delivered by Nanoparticles. *SLAS Technol* 2019; 24: 151-60.
- PDQ Adult Treatment Editorial Board. Pancreatic Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002.
- Sociedad Española de Oncología Médica. Cáncer de páncreas. Available at: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/pancreas?showall=1> [accessed November 30, 2019].
- Conroy T, Hammel P, Hebbar M, et al. FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer. *N Eng J Med* 2018; 379: 2395-406.
- Thota R, Pauff JM, Berlin JD. Treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: A review. *Oncology (Williston Park)* 2014; 28: 70-4.
- Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, et al. 2013. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and

- characterization. *FASEB J.* 27(1):13–24
11. Quiñonero F et al. The challenge of drug resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma: a current overview. *Cancer Biol Med.* 2019 Nov;16(4):688-699 .
12. Martín-guerrero SM, León J, Quiles-perez R, Belmonte L, Martín-Oliva D, et al. 2017. Expression and single nucleotide polymorphism of poly (adp-ribose) polymerase-1 in gastrointestinal tumours: clinical involvement. *Curr. Med. Chem.* 24:1–18
13. Jiang B, Chen W, Li H, Chien Y, Chang W, et al. 2015. Chd1l regulated parp1-driven pluripotency and chromatin remodeling during the early-stage cell reprogramming. *Stem Cells.* 33:2961–72
14. Malyuchenko N V, Kotova EY, Kulaeva OI, Kirpichnikov MP, Studitskiy VM. 2015. Parp1 inhibitors : antitumor drug design. *Acta Naturae.* 7(26):27–37
15. Li Y, Liu C, Rao G. A Review on Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors and Synthetic Methodologies. *Curr Med Chem.* 2020 Mar 12. doi: 10.2174/0929867327666200312113011. [Epub ahead of print]
16. Fiori ME, Villanova L, De Maria R. 2017. Cancer stem cells: at the forefront of personalized medicine and immunotherapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 35:1–11
17. Zeuner A, Todaro M, Stassi G, De Maria R. 2014. Colorectal cancer stem cells: from the crypt to the clinic. *Cell Stem Cell.* 15(6):692–705
18. Raha D, Wilson TR, Peng J, Peterson D, Yue P, et al. 2014. The cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase is required to maintain a drug-tolerant tumor cell subpopulation. *Cancer Res.* 74(13):3579–90
19. Manhas J, Bhattacharya A, Agrawal SK, Gupta B. 2016. Characterization of cancer stem cells from different grades of human colorectal cancer. *Tumor Biol.* 37:14069–81
20. Pozza ED, Dando I, Biondani G, Brandi J, Costanzo C, et al. 2015. Pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines display a plastic ability to bi - directionally convert into cancer stem cells. *Int. J. Oncol.* 46:1099–1108
21. Kaiyu Yuan, Yong Sun, Tong Zhou, Jay McDonald, Yabing Chen. PARP-1 regulates resistance of pancreatic cancer to TRAIL therapy. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(17): 4750–4759. Published online 2013 Jul 5.
22. Zhenyu Hou, Yunfeng Cui, Huizhi Xing, Xiaoyan Mu. Down-expression of poly(ADP-ribose) polymerase in p53-regulated pancreatic cancer cells. *Oncol Lett.* 2018, 15(2): 1943–1948.