



Universidad Autónoma  
de Madrid

Programa de Doctorado en Medicina y Cirugía

**Apoptosis en el cáncer de páncreas:  
¿El beso de Judas?**

**Autor: Gabriele Antonio D'Errico**

Madrid, 2022

**Departamento de Bioquímica**  
**Facultad de Medicina**  
**Universidad Autónoma de Madrid**

# **Apoptosis en el cáncer de páncreas: ¿El beso de Judas?**

Tesis doctoral presentada por **Gabriele Antonio D'Errico**,  
Licenciado en Medicina

Trabajo dirigido por el Dr. Bruno Sainz Anding y la Dr.<sup>a</sup> Sonia Alcalá Sánchez  
y llevada a cabo en el laboratorio de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

El doctor Bruno Sainz Arding, como director de la presente tesis, y la doctora Sonia Alcalá Sánchez, como codirectora de la misma,

CERTIFICAN:

Que don Gabriele Antonio D'Errico, licenciado en Medicina por la Universidad Federico II de Nápoles (Italia) y especialista en Oncología Médica por el Hospital de La Paz de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado:

*Apoptosis en el cáncer de páncreas: ¿El beso de Judas?*

Una vez supervisado el trabajo, avalamos los resultados obtenidos y declaramos mediante la presente que el doctorando reúne los requisitos al respecto de originalidad y calidad para que se presente como tesis doctoral con el objeto de optar al título de Doctor en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid.

En Madrid, a XX de enero de 2022

Director:

Codirectora

Dr. Bruno Sainz Arding

Dr.<sup>a</sup> Sonia Alcalá Sánchez

## Agradecimientos

Los agradecimientos de estas tesis van dirigidos, por razones obvias, también a personas de madre lengua italiana; por lo tanto, se utilizará más adelante el idioma de Dante para mostrarles mi agradecimiento, dejando para los demás el idioma de Cervantes.

Esta tesis es fruto de una obsesión que tenía desde «pequeño» y gracias a mi entorno dicho sueño se ha transformado en algo tan bueno (la palabra ‘positivo’ quizá es mejor no utilizarla en estos tiempos) como lo es la presente tesis doctoral.

En primer lugar deseo trasladar mi enorme agradecimiento a Susana, mi mujer. Ella probablemente ni lo sabe, pero gracias a ella, a su cariño y a su forma de ser esta obsesión ha dejado de «pesarme». Además ha sabido, «a las buenas y a “las menos buenas”», convencerme para continuar en este camino del doctorado, que no siempre ha resultado sencillo.

Mi agradecimiento se extiende también a mis hijos, Manuel y Martina, que hacen que cuando vuelvo a casa y estoy con ellos se me pasen todas las tristezas que conlleva el trabajo de oncólogo.

*Ovviamente ringrazio i miei genitori, hanno saputo aiutarmi a gestire le emozioni di odio e amore che l'oncologia mi produce, facendone sempre una ragione per migliorare come uomo e come medico. Il ringraziamento vale anche per mia sorella Sissi, le mie zie e i cugini.*

*Un saluto speciale a Mimmo, cognato, ma prima di tutto amico, e compagno di tante avventure.*

*Ringrazio inoltre i miei amici, specialmente Angelo, che anche nella distanza riesce a essere sempre un appiglio; Pasquale, che oltre che amico ha anche condiviso con me il duro ma stupendo percorso verso la laurea, e che non finirá mai di ringraziare e rimproverare allo stesso tempo per avermi aiutato fin troppo soprattutto nei garbugli burocratici che mi avrebbero lasciato, come ama dire lui, all'impasse. Ovviamente un ringraziamento anche a Carmine, Marcello, Valerio e Manuela i mitici e gli altri che hanno condiviso questi anni. Rimanendo nella Federico II, un ringraziamento speciale va a Pietro Formisano, che mi accolse nel suo laboratorio quando ero ancora uno studente con la cartella sulle spalle e mi insegnó, insieme a Vittoria, Francesco, Salvatore, Ginevra, Yolanda, Giuseppe e gli altri, praticamente tutto quello che so della ricerca di base (e con cui abbiamo condiviso anni davvero indimenticabili).*

Debería utilizar el *itañol* para mostrar mi agradecimiento a Michele, no solo por su ayuda fundamental en corregir esta tesis, sino por el apoyo constante en este viaje que, *dopo mille peripezie*, nos ha llevado hasta Madrid.

Le estoy también muy agradecido a la Dr.<sup>a</sup> Ana Kerguelen, que hizo que pudiera dar los primeros pasos en esta investigación al presentarme a otra persona fundamental en los inicios de este trabajo: el Dr. Luis Lombardóa. Luis me abrió las puertas de su laboratorio, me enseñó las reglas de la investigación en el CNIO y me defendió en muchas ocasiones; además, me invitó a una rica pizza para celebrar la publicación del artículo.

*Un ringraziamento anche a Maria Chiara Monti, che mi permise di uscire da un blocco nella ricerca grazie alla proteomica.*

Pese a que no son parte directa de esta tesis, me gustaría agradecer su involucración a todos los compañeros del Hospital Quirón, al Dr. Javier Hornedo, un «manual de cómo ser Jefe» hecho persona; a Lucía, a Belén, a Elena, a Gabi, a Rocío y a Pablo, que siempre me apoyan y ayudan en el trabajo, y con los que comparto muchos momentos, duros pero especiales.

No me olvido del Dr. Jesús Miranda, el «pinche» con el cual desde los momentos complicados en La Paz siempre ha resultado ser un colega y amigo especial con el que compartir momentos y ayudarse recíprocamente.

Deseo trasladar un agradecimiento especial al Dr. Jaime Feliú, mi tutor de tesis. Hace unos años, ni él ni yo hace hubiéramos imaginado trabajar juntos en este trabajo. Si hoy en día la investigación ha resultado posible, ello se debe a su lado humano verdaderamente especial. Además ha sido quien me ha enseñado todo lo que sé sobre el tratamiento de esta patología tan desagradecida como es el cáncer de páncreas.

Traslado asimismo mi agradecimiento a los otros adjuntos de La Paz que me han formado como médico: Beatriz, Pilar, Enrique, Javier, Álvaro, Pati, Oliver, y aunque hemos coincidido poco, a mis «R mayores», Nadia, Elsa y Ángela (nunca olvidaré la guardia del 6 de enero).

Mi más sincero agradecimiento también al Dr. Alfredo Carrato, un médico ejemplar y una persona que enseña enormemente sobre nuestra profesión.

Por último, obviamente no podía terminar este apartado sin dedicar una mención especial a mi director de tesis, el Dr. Bruno Sainz, y a mi codirectora, la Dr.<sup>a</sup> Sonia Alcalá. Bruno ha hecho posible que esta idea, que me costaba expresar y aún más demostrar científicamente, se haya transformado en un artículo publicado en una revista internacional y en la culminación de una tesis doctoral. Por ello, nunca dejare de agradecerse. Además, junto a Sonia y con mucha paciencia por parte de ambos, han conseguido que pudiera realizar los experimentos necesarios para seguir adelante con este trabajo y me han ayudado a «traducir» la tesis de mi idioma nativo a uno que comprensible para la comunidad científica. Gracias de todo corazón.

## Resumen

El cáncer de páncreas (PDAC) conforma una patología de difícil diagnóstico, sobre todo sus metástasis, y con un tratamiento poco eficaz dada la resistencia intrínseca a los tratamientos quimioterápicos.

Los macrófagos, especialmente los TAM (*tumor associated macrophage*), son muy abundantes en este cáncer.

En esta tesis hemos hipotetizado que son responsables tanto de la producción de metástasis «escondidas» como de la quimiorresistencia. En el primer caso, hemos hipotetizado que los macrófagos «acompañan» en la circulación sanguínea a las células tumorales hasta los nichos metastásicos. En el segundo, tras observar que los macrófagos son los responsables de la eliminación de células apoptóticas, cuya producción aumenta exponencialmente tras la quimioterapia, hemos hipotetizado un mecanismo de retroalimentación negativa: tras la ingesta de células apoptóticas, los macrófagos secretan sustancias que reducen la sensibilidad a sucesivas apoptosis en el tejido tumoral.

Para demostrar que los macrófagos se unen a células tumorales y las acompañan en la circulación sanguínea, hemos puesto a punto un sistema para detectar en biopsias líquidas y mediante citometría de flujo las macrocélulas formadas por macrófagos y las células tumorales. Así, hemos comparado el porcentaje de estas células en personas sanas y en otras con cáncer de páncreas, tanto en estadios precoces como en metastásicos. Los resultados demuestran que estas células solo se encuentran presentes en pacientes con cáncer metastásico.

En el segundo caso, hemos incubado las células de cáncer de páncreas (PDAC) con medios condicionados de macrófagos que habían ingerido células apoptóticas ( $M\emptyset^{Apop}$  CM) y macrófagos sin el estímulo de células apoptóticas ( $M\emptyset$ CM).

A continuación, se ha añadido un quimioterápico (gemcitabina o abraxane) a los dos medios condicionados, demostrando así que el  $M\emptyset^{Apop}$  CM confiere protección contra la quimioterapia.

Se ha realizado posteriormente una proteómica que ha identificado la proteína YWHAZ/14-3-3 zeta/delta como potencial mediador del efecto del  $M\emptyset^{Apop}$  CM.

Se han realizado experimentos utilizando la proteína 14-3-3 $\zeta$  recombinante, que han demostrado que parte del efecto esta mediado esta.

Asimismo, se ha demostrado que, *in vivo*, la eliminación de macrófagos de ratones con cáncer de páncreas mejora la respuesta al tratamiento quimioterápico.

Por último, se ha demostrado que el mecanismo molecular por el cual la proteína 14-3-3 $\zeta$  ejerce este efecto es mediante la integración con el receptor AXL.

## **Abstract**

*Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is an inherently chemo resistant tumor. Chemotherapy leads to apoptosis of cancer cells, and in previous studies we have shown that tumor-associated macrophage (TAM) infiltration increases following chemotherapy in PDAC.*

*Since one of the main functions of macrophages is to eliminate apoptotic cells, we hypothesized that TAMs phagocytose chemotherapy-induced apoptotic cells and secrete factors, which favor PDAC chemoresistance.*

*To test this hypothesis, primary human PDAC cultures were treated with conditioned media (CM) from monocyte-derived macrophage cultures incubated with apoptotic PDAC cells (MØ<sub>Apop</sub> CM). MØ<sub>Apop</sub> CM pretreatment rendered naïve PDAC cells resistant to Gemcitabine- or Abraxane-induced apoptosis. Proteomic analysis of MØ<sub>Apop</sub> CM identified YWHAZ/14-3-3 protein zeta/delta (14-3-3ζ), a major regulator of apoptotic cellular pathways, as a potential mediator of chemoresistance, which was subsequently validated in patient transcriptional datasets, serum samples from PDAC patients and using recombinant 14-3-3ζ and inhibitors thereof.*

*Moreover, in mice bearing orthotopic PDAC tumors, the antitumor potential of Gemcitabine was significantly enhanced by elimination of TAMs using clodronate liposomes or by pharmacological inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase, a 14-3-3ζ interacting partner.*

*These data highlight a unique regulatory mechanism by which chemotherapy-induced apoptosis acts as a switch to initiate a protumor/antiapoptotic mechanism in PDAC via 14-3-3ζ/Axl signaling, leading to phosphorylation of Akt and activation of cellular prosurvival mechanisms.*

*The data presented therefore challenge the idea that apoptosis of tumor cells is therapeutically beneficial, at least when immune sensor cells, such as macrophages, are present*

# TABLA DE CONTENIDOS

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. El cáncer de páncreas: el emperador de los «villanos»	1
1.1.1. Factores de riesgo	1
1.2. Diagnóstico y tratamiento	4
1.3. El estroma en el cáncer de páncreas: ¿El hábito sí hace al monje?	8
1.4. Células de cáncer pancreático, (PDAC, <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i> )	8
1.5. Células troncales del cáncer ( <i>CSC, cancer stem cells</i> )	9
1.6. Los CAF ( <i>cancer-associated fibroblasts</i> )	10
1.7. Los TAM ( <i>tumor-associated macrophage</i> )	11
1.8. Los macrófagos, los policías corruptos	14
1.8.1. Carcinogénesis	14
1.8.2. Regulación de la respuesta inmune	15
1.9. La apoptosis: ¿El beso de Judas de la oncología?	18
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
3.1. Muestras de pacientes y macrófagos	23
3.2. Tamaño del estudio y determinación del tamaño de la muestra	28
3.3. Recogida y envío de muestras	28
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
4.1. Macrocélulas en el proceso metastásico	30
4.1.1. Detección de células tumorales circulantes por citometría de flujo	30
4.1.2. Detección de células tumorales circulantes por citometría de flujo - No Wash/No Lyse	33
4.1.3. Detección de células tumorales circulantes por citometría de flujo - límite de detección	35
4.1.4. Detección de células tumorales circulantes por citometría de flujo – estudio prospectivo	35
4.2. Mecanismos de resistencia a la apoptosis producidos por los TAM en respuesta a la quimioterapia	36
4.2.1. Polarización de los macrófagos promovida por las células apoptóticas	36



4.2.2. Promoción de los factores de quimiorresistencia por los macrófagos que fagocitan células apoptóticas	38
4.2.3. Aumento de la sensibilidad a la gemcitabina in vivo por la eliminación de los macrófagos	39
4.2.4. Promoción de la quimiorresistencia en las PDAC por YWHAZ/14-3-3 $\zeta$	42
4.2.5. Inducción de quimiorresistencia por la proteína 14-3-3 $\zeta$ mediante la vía de señalización de AXL	44
4.2.6. Potenciación de la eficacia de la gemcitabina in vivo mediante la inhibición de AXL	45
4.3. Los macrófagos en la resistencia al tratamiento con inmunoterapia	46
4.4. Estudio INFLAMED	46
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>I</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Carga mundial, factores de riesgo y tendencias del cáncer de páncreas (Huang et al., 2021).</i>	1
<i>Figura 2. Factores de riesgo del cáncer de páncreas (elaboración propia).</i>	2
<i>Figura 3. Mitosis asimétrica (Sainz et al., 2016).</i>	9
<i>Figura 4. Homestasis de los macrófagos (Watanabe et al., 2019).</i>	12
<i>Figura 5. Factores producidos por los macrófagos M2 (Sainz et al., 2016).</i>	13
<i>Figura 6. La doble cara de las células inmunitarias (D'Errico et al., 2017).</i>	16
<i>Figura 7. Símil entre la apoptosis y el beso de Judas.</i>	18
<i>Figura 8. Detección de CSC en la población de macrófagos M2 (elaboración propia).</i>	31
<i>Figura 9. Enfoque acústico del citómetro Attune NxT (Thermo Fisher Scientific, s.f.).</i>	32
<i>Figura 10. Estudio de macrocélulas en biopsia líquida (elaboración propia).</i>	33
<i>Figura 11. Selección del método óptimo para el procesamiento de muestras (elaboración propia).</i>	34
<i>Figura 12. Experimento preliminar para determinar el límite de detección de células epiteliales en sangre (elaboración propia).</i>	35
<i>Figura 13. Resultados del estudio de macrocélulas (elaboración propia).</i>	36
<i>Figura 14. Análisis mediante técnica TUNEL (elaboración propia).</i>	36
<i>Figura 15. Dosis de gemcitabina o abraxane para inducir la apoptosis óptima (elaboración propia).</i>	37
<i>Figura 16. Inducción de resistencia a la quimioterapia en células PDAC tras incubación en medio condicionado de macrófagos que fagocitan células apoptóticas (D'Errico et al., 2019).</i>	39
<i>Figura 17. Aumento de sensibilidad a la gemcitabina in vivo tras eliminación de los macrófagos (D'Errico et al., 2019).</i>	40
<i>Figura 18. Proteína 14-3-3ζ: (A) proteómica, (B) diferentes expresiones en tejidos normales y tumorales, (C) diferencia en el pronóstico del cáncer, (D) diferencia pre y posquimioterapia, € diferencia en SLP y (E) diferencia en SG (D'Errico et al., 2019).</i>	41
<i>Figura 19. Inducción de quimiorresistencia promovida por 14-3-3ζ (D'Errico et al., 2019).</i>	43
<i>Figura 20. Resistencia a la apoptosis mediada por la proteína 14-3-3ζ recombinante (D'Errico et al., 2019).</i>	45
<i>Figura 21. Cronograma del estudio INFLAMED (elaboración propia).</i>	47
<i>Figura 22. Regulación de la polarización de macrófagos por parte de las células apoptóticas (D'Errico et al., 2019).</i>	52
<i>Figura 23. Mecanismo de acción de la proteína 14.3.3ζ (D'Errico et al., 2016).</i>	54

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios (elaboración propia)	23
Tabla 2. Anticuerpos secundarios (elaboración propia)	23

## CLAVE DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Forma desarrollada</b>
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALT	alanina-transaminasa
APC	células presentadoras de antígeno
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ASCO	American Society of Clinical Oncology
AST	aspartato-transaminasa
C	carbamidometilo
CAF	fibroblastos asociados al tumor
CIOMS	Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CPAP	cambio porcentual anual promedio
CSC	células troncales del cáncer
CSC	células autofluorescentes
CTC	células madre o troncales de cáncer
EMT	transición epitelio-mesénquima
FAMMM	síndrome de melanoma múltiple atípico familiar
FAP	proteína de activación de fibroblastos
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
GGT	$\gamma$ -glutamyltransferasa
HGF	factor de crecimiento de hepatocitos
HIF	factor inducible por hipoxia
HP	pancreatitis hereditaria
HR	razón de riesgos
IDH	índice de desarrollo humano
IFN- $\gamma$	interferón gama
IGF-1	factor de crecimiento insulínico tipo 1

IL-6	interleuquina 6
IR	<i>informed ratio</i>
LCT	linfocitos T CD8+ o citotóxicos
LPS	lipopolisacárido
M	oxidación
MC	medio control
MCP-1	proteína quimiotáctica de monocitos 1
MMP	metaloproteinasas de la matriz extracelular
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NGS	secuenciación genómica masiva
NK	células <i>natural killer</i>
PAI-1	inhibidor del activador del plasminógeno-1
PD-1	muerte celular programada 1
PDAC	células de cáncer pancreático
PDGFR $\alpha$	receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas alfa
PDX-PDAC	xenográficos derivados de pacientes con PDAC
PGE2	prostaglandina E2
PJS	síndrome Peutz-Jeghers
RNM	resonancia magnética nuclear
SAA1	suero amiloide A1
SG	supervivencia global
SLP	supervivencia libre de progresión
ST	fosforilación
TAM	macrófagos asociados al tumor
TC	tomografía computerizada
TGF-B	factor de crecimiento transformante beta
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	factor de crecimiento endotelial
WB	Western Blot
$\alpha$ SMA	alfa actina de músculo liso

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El cáncer de páncreas: el emperador de los «villanos»

El cáncer de páncreas representa un grave problema de salud a nivel mundial. A pesar de que su incidencia no es excesivamente elevada, comprende alrededor del 2 % de todas las neoplasias en Estados Unidos y presenta una elevada mortalidad, ya que resulta el responsable de aproximadamente el 5-7 % de todos los fallecimientos por cáncer (Coral, 2015). En 2021 en Estados Unidos la incidencia estimada calculada fue de 60.400 personas (el 11º cáncer por incidencia a nivel mundial), con una mortalidad estimada de 48.000 personas (Antony Hopkins Institute) (Mattiuzi & Lippi, 2019) (Figura 1).

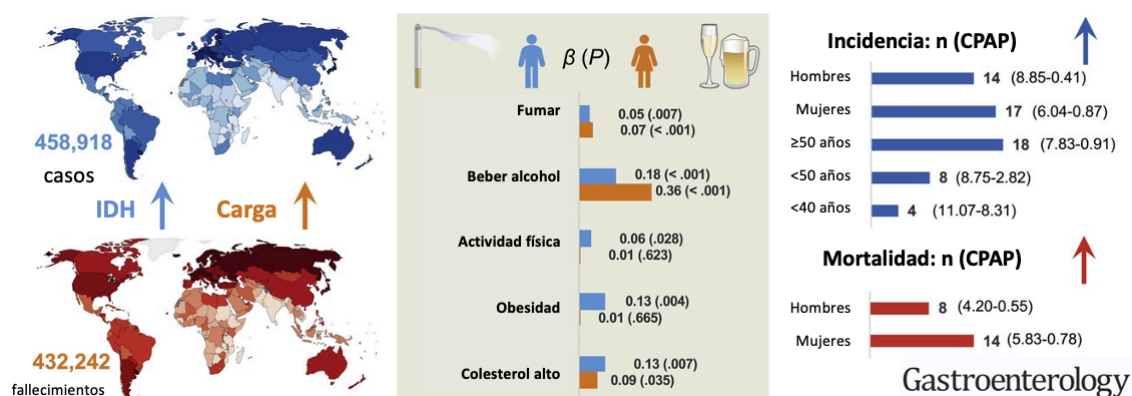


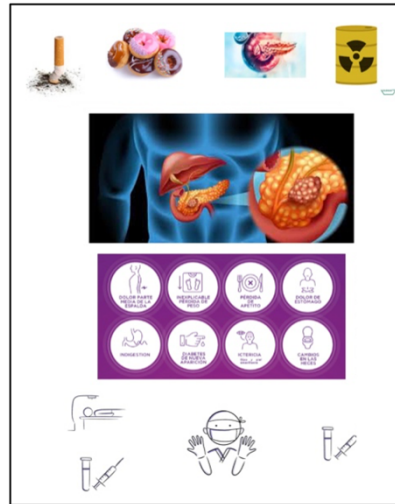
Figura 1. Carga mundial, factores de riesgo y tendencias del cáncer de páncreas (Huang *et al.*, 2021). Traducción propia.

La histología más frecuente es la de adenocarcinoma, que representa aproximadamente el 90 % de los diagnósticos. Le sigue el tumor neuroendocrino, con aproximadamente el 6-7 % de incidencia y un pronóstico más favorable (Perri *et al.*, 2019). Por último, se ha identificado una serie de histologías minoritarias como la escamosa o mucinosa con un pronóstico peor que el del adenocarcinoma (Raman *et al.*, 2018).

Todo lo anterior se discutirá más detalladamente en el apartado «El estroma y cáncer de páncreas».

#### 1.1.1. Factores de riesgo

Los factores de riesgo del cáncer de páncreas son múltiples, muchos de ellos compartidos con otros tipos de neoplasias y que se pueden diferenciar en factores modificables y no modificables (Figura 2 más abajo).



**Figura 2. Factores de riesgo del cáncer de páncreas (elaboración propia).**

Los principales factores de riesgo en el cáncer de páncreas son fumar, la obesidad, la pancreatitis y sustancias tóxicas. Los síntomas principales son la pérdida de peso, el dolor en el cinturón abdominal, la ictericia y la diabetes. El tratamiento se basa en radioterapia, quimioterapia y cirugía, que según el estadio se administra en forma única, combinada o secuencial.

Entre los primeros factores de riesgo destaca el tabaquismo, pues se trata de uno de los más importantes para el cáncer de páncreas (Iodice *et al.*, 2008) y para otras patologías neoplásicas, tales como el cáncer de cabeza y cuello (Shan *et al.*, 2010), pulmón, vejiga (Ferreccio *et al.*, 2013), así como para patologías no neoplásicas, tales como broncopatías crónicas y cardiopatías (Conklin *et al.*, 2019). El riesgo de padecer cáncer de páncreas se duplica en personas fumadoras; no obstante, al abandonar el hábito tabáquico, el riesgo asociado de padecer cáncer de páncreas disminuye (Blackford *et al.*, 2009).

El sobrepeso es otro factor de riesgo importante. Las personas obesas poseen aproximadamente un 20 % más de probabilidades de padecer cáncer de páncreas (Avgerinos *et al.*, 2019). El tipo de sobrepeso mayormente relacionado con esta patología es el acúmulo de grasa visceral, en especial si dicha acumulación se observa alrededor del páncreas (Sreedhar *et al.*, 2020). La secreción de sustancias protumorales por parte de las células adiposas es el mecanismo molecular que justifica este aumento de riesgo (Takehara *et al.*, 2020). La alimentación y la inactividad física, causas principales de la obesidad, también poseen una función directa en el aumento de riesgo de cáncer en general, aunque en el de páncreas esta relación todavía no se ha demostrado con suficiente poder estadístico (Vainio *et al.*, 2002). Las dietas ricas en carnes rojas y procesadas, grasas saturadas y bebidas azucaradas incrementan el riesgo de cáncer de páncreas tanto directa como indirectamente por la existencia de un mayor número de células adiposas (Chang *et al.*, 2017). Otros estudios demuestran cómo los factores producidos por los adipocitos favorecen el crecimiento tumoral; por ejemplo, Mendonsa *et al.* (2015) demostraron que la leptina producida por las células tumorales favorece el crecimiento del cáncer en modelos de ratón (White *et al.*, 2010). Los adipocitos pueden secretar factores de crecimiento tipo IGF-1 (D'Esposito *et al.*, 2012), citoquinas inflamatorias como *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), *interleuquina 6* (IL-6), *monocyte chemoattractive protein-1* (MCP-1), y *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) (Chang & Eibl, 2019), o activar genes de proliferación celular como *NFK-b* (Corrêa *et al.*, 2017). Pueden también asociarse a células del cáncer de páncreas y secretar proteínas como la SAA1

(*serum amyloid A1*), que aumentan la quimiorresistencia y la capacidad de migración y metástasis de las mismas células (Takehara *et al.*, 2020).

En contraposición a lo indicado anteriormente, la restricción calórica reduce la probabilidad de padecer esta patología y mejora su pronóstico, tanto en modelos animales como en humanos. El efecto está en parte determinado por la diferencia en la secreción de factores de crecimiento (Harvey *et al.*, 2014), aunque esta no justifica la magnitud del efecto, por lo que se supone que otras vías de señalización están implicadas. En la actualidad, se están estudiando distintos principios activos para obtener los mismos resultados de la restricción calórica, evitando los problemas y las dificultades prácticas que implican implementarla (Lashinger *et al.*, 2011).

Durante muchos años la ingesta de café se relacionó con un aumento en la incidencia del cáncer de páncreas, aunque un estudio sucesivo confirmó que este riesgo se debía a compuestos químicos que antiguamente se utilizaban para tratar los granos de café (Guertin *et al.*, 2015), como el cloruro de metileno, que actualmente se encuentra identificado como cancerígeno (2b).

La diabetes tipo 2 comprende otro factor de riesgo: las células resistentes a la insulina, características de esta enfermedad, secretan factores protumorales (Pizzato *et al.*, 2019) y, además, el paciente diabético comparte factores de riesgo previamente mencionados (dieta elevada en grasa, azúcares y calorías). El tratamiento precoz de esta condición, así como algunos fármacos –como la metformina–, utilizados en el tratamiento de la diabetes, pueden reducir el riesgo de padecer neoplasias pancreáticas (Yu *et al.*, 2019) e incluso aumentar la supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas (Xin *et al.*, 2018). La aparición de diabetes *mellitus* o el cambio en el control glucémico en paciente mayores de 50 años puede representar también un síntoma inicial de cáncer de páncreas (Pannala *et al.*, 2009).

La pancreatitis crónica supone también un factor de riesgo específico y es independiente de la etiología (alcoholismo, dieta rica en grasa o enfermedades genéticas) (Kirkegård *et al.*, 2017). Queda pendiente entender si la pancreatitis produce un aumento del riesgo de cáncer por la inflamación producida en el entorno u otros factores están implicados.

Entre los factores de riesgo no modificables destacan la edad y el sexo. La incidencia aumenta con el envejecimiento. La mayoría de los enfermos presentan más de 45 años y la edad promedio al momento de realizarse el diagnóstico es de 70 años (Rawla *et al.*, 2019). Los hombres son ligeramente más propensos a padecer cáncer de páncreas que las mujeres, aunque es probable que esto se deba a que los primeros consumen más alcohol y grasas y tienen más probabilidades de padecer diabetes. Las personas de raza negra (frente a la caucásica y a la asiática) tienen un riesgo mayor de padecer la patología. Entre los factores no modificables también se encuentran los antecedentes familiares, para los que se pueden diferenciar los casos en los que el aumento de riesgo se debe a una condición genética y aquellos en los que el aumento del riesgo se debe a un determinado estilo de vida, que también se puede «heredar».

Se estima que hasta el 10 % de los cánceres de páncreas guardan relación con síndromes genéticos hereditarios, principalmente los que implican mutaciones en genes relacionados con la estabilidad genómica. Los siguientes son ejemplos de síndromes genéticos que pueden causar cáncer de páncreas:

- Síndrome hereditario de cáncer de seno y ovario causado por mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2, en el que el riesgo de padecer cáncer de páncreas aumenta entre 2 y 4 veces en los portadores (Pilarski, 2019).

- Mutaciones en el gen PALB2 (Díaz *et al.*, 1990), que suponen un aumento del riesgo de aproximadamente el 1 %.
- Mutaciones en los genes *CDKN2A/p16*, el síndrome *Peutz-Jeghers* (PJS), pancreatitis hereditaria (HP) y *familiar atypical multiple mole melanoma* (FAMMM) (Llach *et al.*, 2020), aunque dada la baja incidencia de estas condiciones genéticas, en la actualidad no se conoce el aumento de riesgo que suponen.

## 1.2. Diagnóstico y tratamiento

La elevada tasa de mortalidad de esta neoplasia depende en parte de la dificultad en diagnosticarla en fases precoces, ya que solo el 20 % de pacientes se diagnostica en esta fase. Desafortunadamente, incluso en esta etapa la mortalidad es elevada, con una supervivencia a 5 años del 20-30 % según las estadísticas del Johns Hopkins Medicine (Blackford *et al.*, 2020). Si se considera la fase avanzada, el estadio IV, la tasa de supervivencia a 5 años disminuye al 1 %.

Las razones que determinan la elevada letalidad son múltiples y se pueden resumir en:

- I. Una elevada tasa de quimiorresistencia.
- II. Una elevada tasa de recaídas de la enfermedad incluso en etapas precoces pese a tratamientos quirúrgicos muy agresivos.
- III. La dificultad intrínseca en el diagnóstico tanto precoz como de las recaídas, debido a la dificultad a la hora de interpretar las pruebas de imagen de un órgano en situación retroperitoneal y la falta de un marcador con elevada sensibilidad, dado que actualmente el CA19.9 carece de ella.

El diagnóstico es clínico, analítico y radiológico (véase la Figura 2 más arriba). Precisa también de una biopsia para la confirmación histológica y la definición del tipo de células implicadas, ya que el tratamiento y el pronóstico de un adenocarcinoma son diferentes a los de otras histologías, como la neuroendocrina o escamosa.

Los síntomas más frecuentes son la ictericia, la pérdida de peso, el dolor abdominal «en cinturón» irradiado a espalda y la existencia de náuseas y vómitos. También es frecuente que debute con diabetes tipo 2 o con formación de trombos tanto venosos como arteriales (Vincent *et al.*, 2011). Aunque hasta la fecha no se conoce la etiopatología, la depresión es un síntoma relativamente común y numerosos pacientes presentan esta patología antes del diagnóstico. Por lo tanto, en pacientes con depresión de causa desconocida, en franjas de edad no típicas y sobre todo, si presentan síntomas digestivos asociados, se debería plantear la posibilidad de realizar pruebas diagnósticas para descartar esta patología (Kenner, 2018). En pacientes con sospecha clínica moderada o elevada las pruebas que se deben realizar son las siguientes:

- **Analítica de sangre**, en la que se puede evidenciar un descenso de la hemoglobina, un aumento de las plaquetas, una alteración de las enzimas pancreáticas (amilasa), de las enzimas hepáticas (AST, ALT, GGT), de la bilirrubina y de los marcadores tumorales CEA y CA 19.9. Este último tiene una sensibilidad suficientemente elevada en el adenocarcinoma pancreático, con un porcentaje del 81 % en pacientes sintomáticos,



frente al 14 % en pacientes con patologías benignas, el 28 % en pancreatitis, y aproximadamente entre un 32 y un 38 % en cáncer digestivo de otra localización (Safi *et al.*, 1987). La especificidad alcanza el 90 % en pacientes sintomáticos, evitando por lo tanto falsos positivos que en una patología como el cáncer de páncreas pueden ser problemáticos dadas las implicaciones psicológicas. El CA19.9 es también un parámetro útil en la decisión terapéutica sobre la resecabilidad del cáncer de páncreas, un concepto que se explicará más adelante (Hartwig *et al.*, 2013).

- **Las pruebas de imagen** que se deben realizar son:
  - **TC** (tomografía computerizada) de abdomen con protocolo páncreas, informada por los radiólogos según los estándares en esta patología (Al-Hawary *et al.*, 2014). Es la prueba más utilizada tanto para el diagnóstico como para la valoración de la resecabilidad. La TC presenta algunas limitaciones por las cuales será necesario utilizar la RMN (resonancia magnética nuclear): tumores inferiores a 2 cm (sensibilidad inferior al 65 %); metástasis hepáticas de pequeño tamaño; carcinomatosis peritoneal; algunas alteraciones vasculares; en el diagnóstico diferencial con la pancreatitis focal (Schima *et al.*, 2007).
  - **TC de tórax**, que se utiliza cuando hay sospecha de metástasis a distancia.

Otras pruebas importantes en el diagnóstico son:

- **Biopsia con aguja gruesa o punción-aspiración con aguja fina:** técnicas utilizadas para confirmar histológicamente la sospecha diagnóstica. Son fundamentales sobre todo en caso de no resecabilidad, al ser necesario utilizar tratamientos quimioterápicos tanto con intención neoadyuvante como paliativa (Hartwig *et al.*, 2009). También poseen utilidad en caso de duda diagnóstica con patologías benignas (Clarke *et al.*, 2004).
- **Laparoscopia exploradora:** se utiliza en caso de sospecha de carcinomatosis peritoneal (Saito *et al.*, 2021).

El tratamiento se basa en tres pilares: cirugía, radioterapia y quimioterapia. Pueden utilizarse de forma combinada o aislada según el estadio tumoral y la situación del paciente (edad, comorbilidades, expectativa de vida). El sistema de estadificación que se emplea con mayor frecuencia para el cáncer de páncreas es el sistema TNM del American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Bilimoria *et al.*, 2007) que se basa en criterios radiológicos: la T, que depende del tamaño del tumor; la N, que se relaciona con la propagación a los ganglios linfáticos; y la M, que define la presencia o menos de metástasis.

Pese a ser el sistema más utilizado, para simplificar las decisiones clínicas, el cáncer de páncreas se diferencia según la afectación, arterial (tronco celíaco, arteria mesentérica superior, arteria hepática común) y venosa, (vena mesentérica superior y vena porta) en los siguientes:

- **Cáncer resecable:** aquel que no presenta afectación vascular de grandes vasos que limitarían su resección.

- **Cáncer *border-line* resecable:** cuando existe afectación vascular ( $>180^\circ$  vena mesentérica superior, contacto  $<180^\circ$  vena cava, arteria hepática común, arteria mesentérica superior o tronco celiaco), aunque esta puede ser potencialmente revertida gracias a tratamientos quimioterápicos, radioterápicos, o los dos en conjunto.
- **Cáncer no resecable o metastásico:** un tumor que no tiene indicación quirúrgica, ya sea por afectación irreversible de los grandes vasos (mas de 50 % de la circunferencia) o por presencia de metástasis a distancia.

La anterior clasificación implica tener en cuenta muchos factores, ya que la resecabilidad conforma un valor continuo más que dicotómico. Tiene en consideración diferentes hallazgos, desde la ausencia de contacto con otras estructuras (resecabilidad completa), hasta las metástasis a distancia (irresecable), pasando por muchas otras situaciones, tales como el contacto parcial o total con el sistema venoso o arterial.

- **Cáncer resecable:** si el paciente cumple los criterios de operabilidad, el tratamiento de elección es la cirugía radical seguido de un tratamiento con quimioterapia adyuvante. La técnica quirúrgica más utilizada es la pancreatoduodenectomía de Whipple, aunque la pancreatoduodenectomía con piloro-conservación puede ser útil al presentar menor morbilidad. Ambas cirugías se acompañan de linfadenectomía *D1-D2* y de la extirpación de las estructuras que contactan con el tumor (Hüttner *et al.*, 2016). La adyuvancia se administra posteriormente a la cirugía para reducir el riesgo de recaída, extremadamente elevado en este cáncer, que puede ocurrir en mas del 60 % de los pacientes sometidos a cirugía, incluso R0. El ensayo clínico CONKO 001 demostró un aumento de la supervivencia libre de progresión (SLP) de 13,4 en comparación a 6,7 meses, doblando la tasa de supervivencia global (SG) a 5 años (20 % vs. 10 %) con el uso de gemcitabina a 1000 mg/m<sup>2</sup> en los días 1, 8, 15 cada 28 días pautándose durante 6 meses después de la cirugía (Oettle *et al.*, 2013). El ESPAC 4 demostró que añadiendo capecitabina (1660 mg/m<sup>2</sup> día 1 a 21 cada 4 semanas) al esquema CONKO 001, se aumentaba la SG a 28 meses vs. a los 25,5 de gemcitabina sola con un HR de 0,82 y p : 0,32 (Neoptolemos *et al.*, 2017). Finalmente, el FOLFIRINOX, como ocurre con la enfermedad metastásica, demostró un aumento de supervivencia del 38 % solo en caso de seleccionar bien al paciente, dado que la toxicidad es estadísticamente más elevada, incluyendo toxicidades de grado III y IV (Conroy *et al.*, 2018).

Aunque la adyuvancia se administra en pacientes operados que no han recibido neoadyuvancia previa, en algunas situaciones, tales como enfermedad muy voluminosa, resección no completa o con buen estado del paciente, existe la opción de administrar adyuvancia en pacientes que previamente han recibido tratamiento neoadyuvante. Después de la revisión de los ensayos clínicos previos, se concluye que la adyuvancia es necesaria pero no suficiente para reducir el riesgo de recaída. La elección del esquema más apropiado subyace en la capacidad del oncólogo para personalizar el tratamiento de cada paciente.

- **Cáncer *border-line* resecable con afectación vascular:** el tratamiento consta de una fase de neoadyuvancia con quimioterapia o quimiorradioterapia previa a la cirugía. Los ensayos clínicos PREOPANC y Korean Study demostraron una resección completa doble en los pacientes tratados con quimioterapia más radioterapia, beneficio que se refleja en un aumento de la supervivencia global del 40 % en comparación con el 26 %

en el Korean Study y una resección completa del 63 % frente al 31 % con una supervivencia global de 17 en comparación a los 14 meses en el PREOPANC (Janssen *et al.*, 2020).

- **Cancer metastásico:** la única opción es la quimioterapia, FOLFIRINOX en caso de pacientes con buen estado general o gemcitabina-abraxane en pacientes frágiles, relegando a tratamientos paliativos la cirugía o la radioterapia para mejorar el control del dolor o síntomas como la ictericia (Conroy *et al.*, 2018).

El tratamiento quimioterápico de elección en el cáncer de páncreas sigue siendo objeto de debate entre los oncólogos. En 2011, gracias al ensayo de fase III PRODIGE, se aprobó en primera línea el esquema FOLFIRINOX (5FU-Oxaliplatino-irinotecan) que demostró un aumento de la SG (11,1 meses vs. 6,8) y una mejor tasa de respuestas (29 % vs. 20 %), entre otros parámetros positivos. Las mayores críticas a este esquema son los estrictos criterios de inclusión y su toxicidad; ambos factores limitan la posibilidad de utilizarlo en la práctica clínica habitual, obligando a los facultativos a realizar una selección de los pacientes que realmente se puedan beneficiar de dicho esquema (Conroy *et al.*, 2011). Los oncólogos poseen también la opción de utilizar el esquema gemcitabina-abraxane, estudiado en el ensayo clínico de fase III MPACT, que obtuvo una SG de 8,5 meses vs. a 6,7 meses y una tasa de respuestas de 23 % vs. al 7 %. En este ensayo clínico los criterios de inclusión eran más laxos y las toxicidades menores (Von Hoff *et al.*, 2013), lo que permite utilizarlo con mayor facilidad en la práctica clínica habitual.

Ambos esquemas se han comparado con gemcitabina; sin embargo, no existe una comparación estadística entre los dos y, al ser tan diferente la población incluida en ambos ensayos clínicos, es difícil valorar qué esquema ofrece mejores resultados. Actualmente, la decisión se toma según las características del paciente, ofreciendo a aquellos con buen estado general y pocas o nulas comorbilidades el esquema FOLFIRINOX y dejando el esquema gemcitabina-abraxane para los pacientes con mal estado general y/o muchas comorbilidades.

Una metodología de recién incorporación podría ayudar los oncólogos a elegir el mejor tratamiento quimioterápico individual: la secuenciación genómica masiva (*next generation sequencing*, NGS, por sus siglas en inglés). Con esta técnica, la biopsia tumoral del paciente se somete a una secuenciación de los genes que actualmente sabemos que están implicados en la resistencia o en la sensibilidad a los varios fármacos quimioterápicos. Con ello se consigue conocer *a priori* la posibilidad de que el cáncer responda o no al tratamiento, personalizando el tratamiento a cada paciente, aumentando la eficacia y evitando un sobretratamiento con los efectos no deseados que conllevan. En España y en Europa esta técnica todavía no está disponible en la seguridad social ni está reembolsada por los seguros privados, aunque dado que las guías americanas más importantes (NCCN, ASCO) aconsejan realizar la NGS, es muy probable que en un futuro cercano los profesionales puedan utilizar esta técnica de forma gratuita.

Los resultados de los tratamientos quimioterápicos en el cáncer de páncreas, especialmente si se comparan con los que se cuentan en otros tumores como pulmón, mama o colón, dejan claro que, en la actualidad, las herramientas contra esta patología son limitadas. Se necesita una investigación tanto clínica como preclínica que permita entender las razones de la ineficacia de estos tratamientos y fomentar la búsqueda de alternativas terapéuticas válidas.

Las razones más aceptadas por la comunidad científica se pueden resumir en:

- La elevada presencia de estroma (especialmente macrófagos y fibroblastos), que limita la penetración de los tratamientos habituales además de favorecer el crecimiento de las células neoplásicas.
- El rápido cambio con respecto a otros cánceres de células quimiosensibles a células resistentes, incluyendo también resistencia a la inmunoterapia, que impide una eficacia a largo plazo de los tratamientos y presenta una mediana de SG inferior a 12 meses.

En el proyecto presentado en esta tesis, hemos intentado buscar un factor que pueda justificar al menos en parte estas características. Para ello, hemos decidido analizar tanto los factores que producen el cáncer como las células estromales que están altamente relacionadas con las tumorales. El estudio de estos factores nos ha permitido una visión diferente de la fisiología de este cáncer y de las características que determinan la ineficacia de los tratamientos convencionales, que se explicará a continuación dado que es el fundamento de esta tesis doctoral.

### **1.3. El estroma en el cáncer de páncreas: ¿El hábito sí hace al monje?**

En los últimos años se ha reconocido la capacidad del estroma de favorecer la transformación tumoral, el escape inmune y las metástasis. Diversos estudios han demostrado su importancia fundamental en la patología neoplásica. En el cáncer de páncreas, el estroma representa hasta el 85 % de la masa tumoral, por lo que destaca la importancia de conocer su papel en el desarrollo de esta patología (Lafaro & Melstrom, 2019).

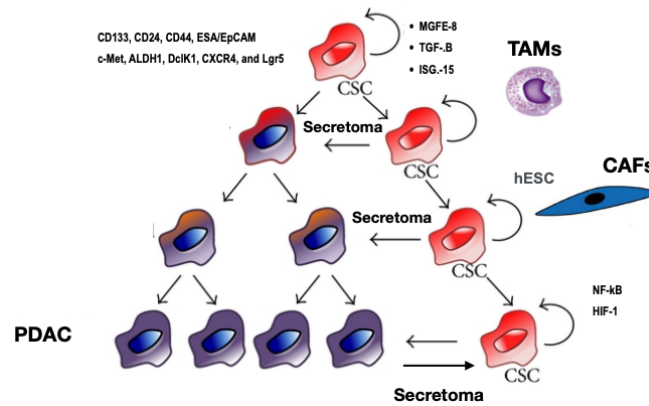
A nivel histológico, en los adenocarcinomas, además de las células tumorales, podemos encontrar diferentes tipos celulares que conforman la masa tumoral, como son los fibroblastos asociados al tumor (CAF: *cancer associated fibroblast*) o los macrófagos asociados al tumor (TAM: *tumor associated macrophage*). Todas estas células están rodeadas por la matriz extracelular y los vasos sanguíneos. En el siguiente apartado, se resumen las características más importantes de estas células del estroma tumoral y se describen sus características histológicas, los receptores de superficie que permiten identificarlas, los factores secretados por las mismas y su función, así como las características más importantes de la interacción (*cross-talk*) entre ellas.

### **1.4. Células de cáncer pancreático, (PDAC, *pancreatic ductal adenocarcinoma*)**

Utilizando un microscopio óptico para visualizar una sección de un adenocarcinoma de páncreas, nos encontraremos un conjunto de células glandulares irregulares, de tamaño medio, sumergidas en una densa matriz extracelular asociada a una vascularización intensa e irregular. Las células de cáncer pancreático (PDAC) originan células ductales más frecuentemente o acinares. El componente celular en el cancer de páncreas suele representar solo una pequeña parte de la masa tumoral; la mayor del tumor consiste de estroma fibroso y acelular que se describe a continuación (Stopa *et al.*, 2020).

### 1.5. Células troncales del cáncer (CSC, cancer stem cells)

Las células iniciadoras o troncales del cáncer (CSC) comprenden el homólogo neoplásico de las células madre. Comparten con ellas principalmente la mitosis asimétrica (Figura 3), es decir, en el proceso de división celular se forman dos células distintas, una célula exactamente igual a la célula progenitora y otra con un mayor estado de diferenciación. (Aponte & Caicedo, 2017).



**Figura 3. Mitosis asimétrica (Sainz *et al.*, 2016).**

Las CSC son capaces de realizar mitosis asimétrica, permitiendo su propia autorrenovación y generar células terminales. Además presenta un *cross-talk* con: TAM que secretan MGF-8 e IL-6, TGF-β; CAF que secretan *embryonic morphogens nodal/activin*; PDAC con un secretoma todavía en parte desconocido; las propias CSC por medio de factores como NF-κB e HIF-1.

Descubiertas por primera vez en 2007, las CSC representan solo el 1 % de las todas las células presentes en el tumor, pero se cree que son las responsables de iniciar el proceso de formación tumoral, la resistencia a los tratamientos y los procesos de metástasis. Actualmente, su origen es controvertido: la primera teoría explica que pueden proceder de la médula ósea y posteriormente migrar al páncreas; otra distinta es que proceden de células residentes en el páncreas que sufren un proceso de dediferenciación a células de cáncer pluripotentes. Algunos marcadores específicos utilizados habitualmente para su detección son CD133, CD24, CD44, SOX2 (Kaseb *et al.*, 2016), ESA/EpCAM (*epithelial-specific antigen*), c-Met, ALDH1, DclK1, CXCR4 y LGR5 (Rao & Mohammed, 2015; Santamaría *et al.*, 2017).

Además, estas células presentan niveles elevados de activación de las vías de señalización mediadas por NF-κB y el factor inducible por hipoxia (HIF) (Liu *et al.*, 2014), así como las siguientes características esenciales para el proceso neoplásico:

- Elevada plasticidad metabólica, siendo capaces de pasar del metabolismo oxidativo a la glicólisis y viceversa según las restricciones nutricionales del tumor (Di Carlo *et al.*, 2018).
- Elevada capacidad de realizar autofagia, imprescindible para la supervivencia en un microambiente con hipoxia y falta de nutrientes como puede ser el ambiente tumoral (Lei *et al.*, 2017).
- Altos niveles de activación de vías de señalización celular, como pueden ser la vía de Wnt/β, Sonic Hedgehog (SHH) o la diana de rapamicina en células de mamífero

(MTOR), implicadas tanto en la transición epitelio-mesenquima como en proliferación celular y en metabolismo celular (Lei *et al.*, 2017).

- Elevada quimiorresistencia debido a la alta expresión de genes antiapoptóticos y genes de multirresistencia a los fármacos (Dawood *et al.*, 2014).

Las CSC interactúan tanto con CAF y TAM como con el resto de células tumorales más diferenciadas. Estas interacciones se producen en todos los sentidos y permiten a las células adaptarse a los requerimientos metabólicos del tumor y mantener siempre el reservorio de CSC. A continuación se resumen algunas interacciones (*cross-talk*) descritas en estas células:

- Algunos factores secretados por las CSC pueden inhibir el crecimiento de las células tumorales más diferenciadas y fomentar el crecimiento de las propias CSC, mientras que el secretoma de las células PDAC más diferenciadas puede inhibir tanto el crecimiento de las CSC como el suyo propio. Aunque parezca que esta inhibición sea perjudicial para el crecimiento tumoral, este sistema permite reducir la muerte celular en un microambiente hostil como el que se produce bajo el tratamiento los fármacos antineoplásicos, tales como gemcitabina o 5FU, que actúan sobre células en fase de mitosis/crecimiento. Por tanto, las células que no proliferan consiguen esquivar esta apoptosis inducida. (Sainz *et al.*, 2016).
- Los CAF secretan morfógenos embrionarios como los *nodal/activin*, que promueven la invasividad de las CSC (Lee *et al.*, 2011).
- Las CSC atraen y «educan» a los TAM, que a su vez activan la vía de señalización STAT3 gracias a la secreción de *milk fat globulin epidermal growth factor-8 (MGFE-8)* e IL-6, favoreciendo el mantenimiento de las CSC. Otros factores secretados por los TAM y que son fundamentales para mantener las características de mitosis asimétrica y la capacidad oncogénica de las CSC son TGF- $\beta$  e ISG15 (Sainz *et al.*, 2016).
- Entre los TAM y las CSC existe un mecanismo de *feedback* positivo que mantiene la activación de NF $\kappa$ B (Nomura *et al.*, 2018), uno de los genes más importantes implicados en los procesos de carcinogénesis.

### 1.6. Los CAF (*cancer-associated fibroblasts*)

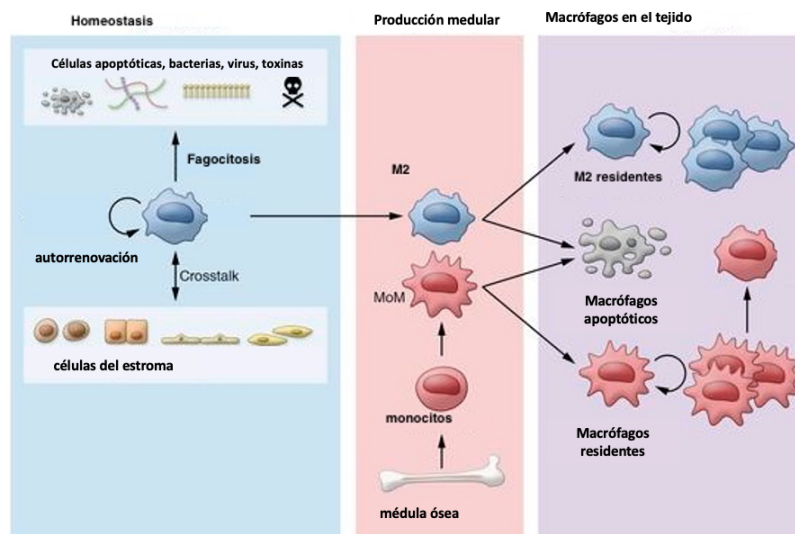
Los CAF (*cancer-associated fibroblasts*) representan entre el 15-85 % de las células que conforman el estroma tumoral. Se localizan alrededor de las células tumorales formando un anillo incompleto o semicírculo y secretan proteínas que forman una abundante y densa matriz extracelular capaz de facilitar el acceso a nutrientes e incluso incrementando la resistencia a los fármacos. Los CAF carecen de un marcador de superficie específico, aunque se pueden identificar histológicamente por su morfología, por su localización característica y por la ausencia de marcaje de marcadores de superficie específicos para el resto de las células del tumor, tales como células endoteliales, epiteliales o linfocitos (Norton *et al.*, 2020). Otros factores que ayudan a la identificación de estas células son la expresión descrita en estas de vimentina y *platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$*  (PDGFR $\alpha$ ), así como  *$\alpha$ -smooth muscle actin* ( $\alpha$ SMA) y *fibroblast activation protein* (FAP) (Nurmik *et al.*, 2020).

Los CAF secretan varios factores con conocidas actividades protumorales como, por ejemplo:

- Componentes de la matriz extracelular y sus proteínas, tales como ácido hialurónico y colágeno, que producen fibrosis en el microambiente tumoral. Esta matriz tan densa afecta a nivel pronóstico dado que puede dificultar la extirpación quirúrgica (Drifka *et al.*, 2016), así como la llegada de los fármacos quimioterápicos a las células tumorales (Norton *et al.*, 2020).
- Metaloproteinasas, tales como *heparan sulfate proteoglycans* *glypican-1* y *syndecan-1*, que degradan la matriz extracelular favoreciendo la metástasis (Korc, 2007).
- Factores de crecimiento, especialmente *fibroblast activated protein* (FAP) (Kawase *et al.*, 2015) y *transforming growth factor- beta* (TGF-B), que desarrollan un importante papel en la angiogénesis, el ciclo celular y la motilidad, favoreciendo el crecimiento tumoral y la metástasis (Calon *et al.*, 2014).
- Quimiocinas y sus ligandos, tales como CCL2, CCL5 y CXCL12 (Bonavita *et al.*, 2015) que atraen a los monocitos que, inducidos a su vez por los factores secretados por los CAF, además de factores secretados por las células PDAC, se convierten en TAM. Entre estos factores destacan interleuquinas, tales como IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 (Gordon & Martínez, 2010) y *thymic stromal lymphopietin* (TSLP).
- PDGF, *hepatocyte growth factor* (HGF) y *fibroblast growth factor* (FGF) que mantienen el fenotipo de los CAF, acción que también llevan a cabo otros factores secretados por células PDAC y TAM (Kaps & Schuppan, 2020).

### 1.7. Los TAM (*tumor-associated macrophage*)

Los TAM (*tumor-associated macrophage*) son otras células fundamentales que forman parte del estroma tumoral. Al ser el pilar de esta tesis doctoral, se resumirán en este apartado sus características más importantes para luego poder profundizar en el papel que desempeñan en esta patología.



**Figura 4. Homeostasis de los macrófagos (Watanabe *et al.*, 2019).**

La médula ósea produce los monocitos (figura central), que entran en la circulación sanguínea. En el tejido (figura de la izquierda) responden a los insultos (células apoptóticas o bacterias) y, en función de la respuesta, asumen una conformación diferente que les permite una respuesta adecuada al insulto que se produce. Los macrófagos en el tejido (figura de la derecha) pueden sobrevivir mucho tiempo y cambiar su conformación según los estímulos recibidos. Asimismo, en algunas ocasiones puede producirse la apoptosis de estos. Los macrófagos residentes adquieren un nombre específico; a modo de ejemplo, en el hígado se conocen como «células de Kupfer». Los macrófagos residentes son responsables en gran parte de los cambios crónicos que se pueden observar en el tejido. Traducción propia.

Los macrófagos conforman una población heterogénea dentro del arsenal que compone la inmunidad innata. Proviene del linaje de células mieloides y se originan a partir de los monocitos de la sangre periférica, diferenciándose posteriormente a macrófagos en los tejidos y, en menor medida, en la sangre periférica (Steinman & Idoyaga, 2010). Su nombre procede del griego *makros* ('grande') y *phagein* ('comer') (Weigert *et al.*, 2019), que explica sus características morfológicas y funcionales. Como su propio nombre indica, son células grandes, con núcleo redondo y abundante citoplasma. Destacan por su habilidad fagocítica y son capaces de fagocitar bacterias, protozoos y hasta células dañadas del propio organismo, tales como células apoptóticas o necróticas, procesándolas y secretando diferentes factores en función del tipo de respuesta requerida (Figura 4). A modo de ejemplo, en caso de fagocitar una bacteria, se induce la activación del sistema inmune para que elimine el patógeno, mientras que en el caso de fagocitar células epiteliales dañadas, favorece la reparación del tejido. Los macrófagos colonizan diferentes tejidos adquiriendo diferentes nombres en función de este y de la función desarrollada, como las células de Kupfer en el hígado. En general, presentan una supervivencia muy prolongada y suelen ser los responsables de los cambios crónicos que ocurren a este nivel, por ejemplo, la conformación de la microglía cerebral o del peritoneo (Gosselin *et al.*, 2014). Poseen una elevada plasticidad, asumiendo múltiples fenotipos según lo requiera el ambiente en que se encuentran, como puede ser en una infección, en reparación de heridas o en cáncer (véase la Figura 4 más arriba).

Un método de clasificación muy utilizado, aunque probablemente sea excesivamente simplista, consiste en el siguiente:

- **M1 o clásicamente activados.** Estos macrófagos poseen una respuesta típicamente denominada Th1 que se activa por IFN- $\gamma$  (interferón gama) y receptores tipo Toll. Esta respuesta es la que habitualmente se da en las infecciones bacterianas, en las que los macrófagos M1 fagocitan a las bacterias o algunos de sus componentes y secretan citoquinas inflamatorias, tales como IL-1, IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ , así como sustancias con capacidad bactericida, como el peróxido de hidrógeno (Sica & Mantovani, 2012).
- **M2.** La diferenciación de los monocitos a este tipo de macrófagos está inducida por la fagocitosis de células dañadas del propio organismo y la presencia sobre todo de las citoquinas antiinflamatorias IL-4, IL-10 y IL-13. En este contexto, se produce una respuesta de reparación celular, fundamental en la cicatrización de heridas y en la remodelación de los tejidos. Esta respuesta, típicamente denominada Th2, implica la secreción de moléculas denominadas «scavengers», receptores de manosa y galactosa, la activación de la vía de la arginasa y sobre todo la secreción de IL-10, *vascular endothelial growth factor* (VEGF) y metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) (Gordon & Martínez, 2010). Los M2, en el ámbito oncológico, son células de gran interés dado que se encuentran en el microambiente de casi todos los cánceres y desarrollan funciones protumorales, contrariamente a lo que se creía desde hacía

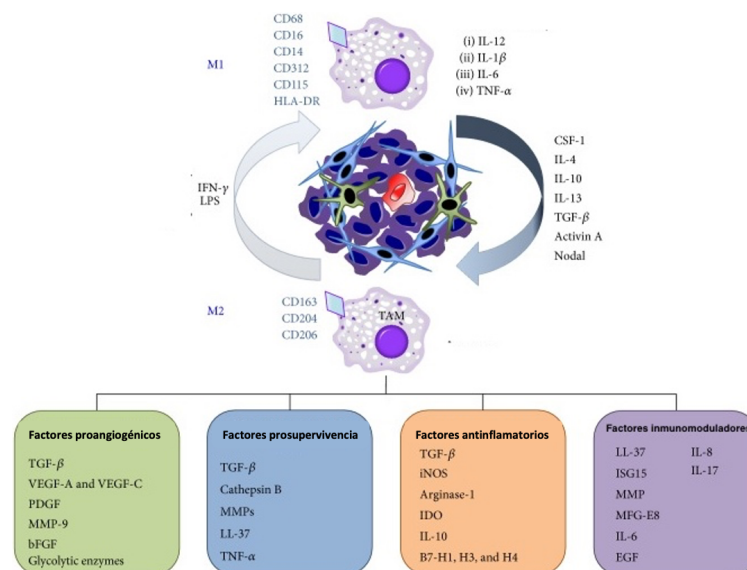


décadas. Estos macrófagos se han denominado «TAM». Actualmente, existe un debate entre si se debe considerar a los TAM como un subgrupo de macrófagos M2 o si conforman una categoría de macrófagos diferente en sí misma (Sainz *et al.*, 2016). Consideramos más apropiado utilizar el término ‘TAM’ como un tipo de macrófago diferente en lugar de una subcategoría de M2 ya que, pese a que los TAM presentan numerosas características y marcadores en común con los macrófagos M2, existe también una población de TAM que comparte características más propias de los M1 (Mosser & Edwards, 2008).

Los TAM presentan un fenotipo específico negativo para el marcador CD11, alta expresión de CD206, además de ser positivos para CD163, CD36, ARG1, IL10 y IL4R $\alpha$ ; por lo tanto pueden identificarse utilizando todos estos marcadores por citometría de flujo, lo cual no se puede conseguir en el caso de los CAF, como ya se ha mencionado (Gabrilovich *et al.*, 2012).

Los principales factores secretados por los TAM son (Figura 5 más abajo):

- factor de crecimiento endotelial (VEGF), que favorece la angiogénesis peritumoral,
- hCAP/LL-37, pequeño péptido que favorece la proliferación e invasividad de las PDAC (Sainz *et al.*, 2015),
- deoxicitidina y otros factores que reducen la sensibilidad a la gemcitabina, quimioterapia de amplio uso en esta patología (Halbrook *et al.*, 2019),
- metaloproteinasas (MMP) necesarias para iniciar el proceso metastásico,
- factores como IL-6, PGE, CCL2, y RIP1-K (Wang *et al.*, 2018), entre otros, que inhiben el sistema inmune reduciendo la actividad de la inmunoterapia, y
- TGF-b, que presenta una actividad pleiotrópica que fomenta todas las funciones previamente descritas en los anteriores puntos (Miyazono *et al.*, 2018).



**Figura 5. Factores producidos por los macrófagos M2 (Sainz *et al.*, 2016).**

Según los estímulos que reciben en los tejidos, los macrófagos pueden asumir dos conformaciones diferentes: M1 (parte superior de la figura) o M2 (parte inferior de la figura). Los estímulos más importantes para la transformación M1 son IFN-Y y LPS, mientras que para M2 son IL-10 y TGF-B. Los marcadores de superficie más relevantes de los M1 son

CD16 y CD48, entre otros, mientras que de los M2 comprenden CD163 y CD204. En nuestros experimentos para valorar los M2 se ha utilizado el marcador CD163. Los M2 producen sustancias proangiogénicas (en verde), prosupervivencia (en azul), antiinflamatorias (en naranja) y factores que reducen la respuesta inmune (en morado).

Los TAM presentan además un importante *cross-talk* con los CAF. Estos últimos producen factores como IL-1, IL-10 y IL-33 (Andersson *et al.*, 2018), que son necesarios para el mantenimiento del fenotipo TAM (Norton *et al.*, 2020); estos últimos a su vez producen factores fundamentales para las funciones de los CAF, como el soporte estructural e incluso favorecer la proliferación celular de las células tumorales PDAC (Iwamoto *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2017).

A continuación se detallará la función de los TAM y su implicación en el crecimiento tumoral, la metástasis, el escape inmune y la resistencia a la quimioterapia.

### **1.8. Los macrófagos, los policías corruptos**

#### **1.8.1. Carcinogénesis**

Hace décadas, la infiltración por macrófagos dentro del tumor se consideraba una respuesta del organismo para combatir dicho tumor. Se observó que una mayor infiltración de macrófagos correlacionaba con un peor pronóstico del paciente; sin embargo, este hecho se atribuía a la incapacidad de dichas células de luchar contra el tumor. Recientemente, Bonavita *et al.* (2015) cambiaron el paradigma, demostrando cómo los TAM eran capaces de promover la proliferación celular y estimular la angiogénesis y ayudando a las células tumorales en los procesos iniciales de la formación del tumor. Además, los TAM favorecen la ruptura de la matriz extracelular que, junto con otras funciones que comentaremos a continuación, favorece los procesos de metástasis (Bonavita *et al.*, 2015).

La capacidad de los TAM de promover el crecimiento tumoral se ha demostrado al comprobar que son mucho más abundantes en el tejido tumoral en comparación con el sano o incluso con el de lesiones pretumorales (Hu *et al.*, 2016). Los tumores pancreáticos presentan una relación lineal inversa entre la supervivencia global y la infiltración por macrófagos; además, los niveles de infiltración de TAM presentan una relación lineal directa con las metástasis linfonodales y la resistencia a la quimioterapia (Kurahara *et al.*, 2011).

Para que una célula pueda iniciar la transformación neoplásica se necesita un conjunto de factores muy complejos, algunos de los cuales todavía se desconocen o al menos no están definidos con exactitud:

- El microambiente tumoral necesita mucha vascularización (angiogénesis) para permitir el aporte de nutrientes a células que, por lo general, presentan un alto requerimiento metabólico. Al mismo tiempo, la elevada vascularización facilita la eliminación de productos tóxicos generados por dicho metabolismo.
- Las células con mutaciones potencialmente dañinas suelen eliminarse por procesos de apoptosis; por lo tanto, se requieren factores que inhiban estos procesos para que la transformación tumoral tenga éxito.
- Las células tumorales, especialmente las CSC, necesitan un conjunto de factores de crecimiento y citoquinas (algunos parcial o totalmente desconocidos) para mantener

sus peculiares características de autorrenovación, metabolismo flexible y capacidad de crecimiento independiente de los factores de crecimiento.

Los TAM, como un director de orquesta, son capaces de dirigir estos procesos desde el crecimiento inicial de PDAC, el mantenimiento de las CSC, hasta la angiogénesis, pasando por la producción de citoquinas que inhiben la respuesta inmune y factores que reducen o incluso inhiben la respuesta a la quimioterapia.

### 1.8.2. Regulación de la respuesta inmune

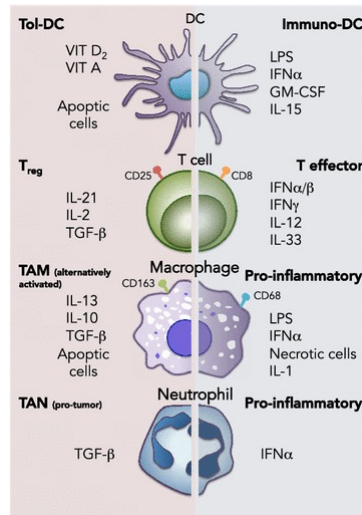
La respuesta inmune empieza con el reconocimiento de un elemento perjudicial o de patógenos, tales como bacterias o virus, y células potencialmente dañinas, como las tumorales. Este reconocimiento se encuentra mediado por las células presentadoras de antígeno (APC), especialmente dendríticas y macrófagos, que inician un proceso de activación de otras células, llamadas efectoras, como los linfocitos (NK y linfocitos T CD8+) o los neutrófilos, que aprenden a reconocer al patógeno y a destruirlo (Duncan & Swain, 1994).

Este último mecanismo se puede bloquear con la expresión en el patógeno de factores que inhiben esta respuesta; el más conocido es el PDL-1, ligando de la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) que se encuentra en la superficie las células T. La unión del ligando a su receptor transmite una señal inhibitoria a los linfocitos T CD8+ o citotóxicos (LCT), que reduce su proliferación y puede causar su apoptosis, lo que reduce así su función y citotoxicidad (Han *et al.*, 2020). Las células cancerígenas pueden sintetizar y expresar PDL-1 y, por lo tanto, inhibir la respuesta inmune mediante esta vía de señalización. Actualmente los fármacos inmunoterápicos más utilizados (Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab, Avelumab) actúan sobre el eje PD1/PDL-1, inhibiendo la unión del receptor con su ligando y restaurando la respuesta inmune bloqueada (Kwok *et al.*, 2016).

Como es lógico esperar, estos fármacos funcionan solo si la inmunidad se activa gracias a los mecanismos de reconocimiento del patógeno que inicia la activación de la cascada inmune, y el único bloqueo es el mediado por el eje PD-1/PDL-1. Por lo tanto, se necesita comprender los mecanismos iniciales de la respuesta inmune y los factores que la activan y la inhiben para poder desarrollar inmunoterapias eficaces.

Las APC reconocen a diario un número muy elevado de antígenos; la mayor parte de ellos no son potencialmente dañinos, así que no se inicia ninguna respuesta celular. El reconocimiento de un antígeno potencialmente dañino deriva en una respuesta que se puede diferenciar en dos tipos según el tipo de daño que estas células pueden producir; la respuesta más frecuente y conocida es la anteriormente mencionada Th-1, en la que se produce una lucha contra el patógeno, proporcionada por la secreción de citoquinas proinflamatorias y vías de señalización que activan células efectoras citotóxicas. A esta se le contraponen una de tipo Th-2, que tiene un efecto reparador y de «freno» frente a la respuesta Th-1: es un elemento fundamental para controlar la respuesta inmune y reparar el daño ocasionado tanto por la respuesta Th1, como por otros insultos (Herring *et al.*, 2004). La polarización hacia un tipo de respuesta u otra depende en gran parte del tipo de antígeno englobado por las APC y la inflamación local (Heshmati, 2014).

La forma en la que ha evolucionado nuestro sistema inmune para poner en marcha esta respuesta dual es la conformación de sus células en dos estados de polarización, uno proinflamatorio y otro antiinflamatorio. Esta diferencia es fundamental para que el sistema inmune se encuentre en equilibrio entre un efecto de «lucha» y destrucción del patógeno o, por el contrario, de reparación del daño ocasionado. Además, dicho equilibrio procura evitar una respuesta excesiva que pueda desencadenar autoinmunidad.



**Figura 6. La doble cara de las células inmunitarias (D'Errico *et al.*, 2017).**

Como se puede observar en la figura anterior, cada una de las células más importantes del sistema inmune puede tener al menos dos conformaciones:

- Los macrófagos que, como ya comentamos, pueden existir en la conformación M1 (proinflamatoria) o M2 (antiinflamatoria);
- Las células dendríticas, que pueden presentar una polarización inmunogénica DCSt o tolerogénica DCSt;
- Los linfocitos que, aparte de sus numerosas subdiferenciaciones (B, T, NK), dentro de los T, pueden existir en una conformación proinflamatoria (linfocitos T citotóxicos o CD8+) o antiinflamatoria (linfocitos reguladores o supresores, Treg) (D'Errico *et al.*, 2017).

La diferente polarización se induce por el microambiente en el que se encuentran dichas células (citoquinas, hormonas, mediadores lipídicos) que, a su vez, depende de los estímulos recibidos (componentes de la pared bacteriana y células apoptóticas, entre otras).

Tanto el INF-a como la endotoxina LPS (lipopolisacárido, presente en la membrana de las bacterias gramnegativas) o las interleuquinas inflamatorias, tales como IL-1, estimulan una respuesta proinflamatoria, mientras que factores como TGF-B, IL-4, IL-10 o IL-13 inducen una respuesta antiinflamatoria.

Si las APC reconocen a las células tumorales en un contexto proinflamatorio, como pueden ser los tumores con elevada carga mutacional (McFarland *et al.*, 2020) y/o la necrosis celular (no se debe confundir con la apoptosis), estas secretan citoquinas como INF-a o IL-1, activando una respuesta típicamente TH-1 (Iyer *et al.*, 2009) con aumento de linfocitos CD4+,

CD8+ y NK que presentan una elevada capacidad tumoricida (Berger, 2000). En este caso, los niveles de PDL-1 son elevados, ya que es estimulado por INF-a e IL-1 (Bazhin *et al.*, 2018).

Si las APC reconocen a las células tumorales en un ambiente antiinflamatorio, sobre todo potenciado por la presencia de numerosas células apoptóticas (Kleinclauss *et al.*, 2006), la respuesta es típicamente TH2 (reparadora) con aumento de TAM, linfocitos Treg y una reducción de la capacidad del sistema inmune de hacer frente al tumor (Ohue & Nishikawa, 2019). En este caso, dada la escasa secreción de INF-a, los niveles de PDL-1 son bajos.

Por todo lo anterior, se pueden identificar los dos siguientes tipos de tumores:

- Tumores «calientes», que poseen una elevada infiltración inmune por células proinflamatorias, elevados niveles de PDL-1 y, por tanto, buena respuesta al tratamiento inmunoterápico, como por ejemplo, inhibidores de PD-1 o PDL-1;
- Tumores «fríos», que poseen escasa o nula infiltración por células proinflamatorias, elevado número de células antiinflamatorias y bajos niveles de PDL-1. Estos tumores tienen potencialmente muy baja respuesta a la inmunoterapia (Galon & Bruni, 2019).

Los TAM, activados por IL-3, IL-10 y TGF-b, suelen generar una respuesta TH2 con elevada expresión en sus membranas de receptores de manosa (CD206) y *scavengers* celulares (CD163). Aumentan además las vías de señalización de la arginasa y secretan quimioquinas como CCL2, CCL17 y CCL 22, que promueven el reclutamiento de linfocitos Treg (Mantovani *et al.*, 2013). Los TAM suelen inhibir la formación, el reclutamiento y el funcionamiento de los linfocitos T CD8+ gracias a varios mecanismos celulares aquí resumidos (Figura 6):

- Reducen la producción de metabolitos fundamentales para la supervivencia de las células T, especialmente de los linfocitos T CD8+; el mecanismo más conocido es la vía de señalización de indoleamina 2,3-dioxygenasa que produce ayuno o *starvation* en los CD8+ (Quaranta & Schmid, 2019);
- Inhiben su función gracias a la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10, TGF-β y prostaglandina E2 (PGE2);
- Inhiben su proliferación gracias a mecanismos inhibitorios sobre los *checkpoint* celulares (Loke & Allison, 2003);
- Activan la vía de la arginasa-1 y dioxigenasas e inhiben la expresión del receptor CD3, inhabilitando la capacidad de responder a antígenos tumorales y por, lo tanto, impidiendo la activación de dichas células;
- Aunque con menor evidencia científica, los TAM, gracias a la IL-10, inhiben la toxicidad de las células *natural killer* (NK), fundamentales en la eliminación de células tumorales. (Petty & Yang, 2017),

Como se puede observar, los TAM reducen la capacidad de las células efectoras de eliminar a las células neoplásicas.

Los factores que determinan esta respuesta TAM/TH2 en el microambiente tumoral son varios y, de momento, no del todo claros; en la presente tesis se describe la capacidad de las células apoptóticas de mediar una disminución de la respuesta inmune.

Entender este mecanismo es fundamental, sobre todo porque actualmente los tratamientos más utilizados contra el cáncer producen una apoptosis masiva; por lo tanto, si esta, de forma directa y/o indirecta, reduce la capacidad de nuestro sistema inmune, es necesario valorar cómo hacer frente a este fenómeno para potenciar los efectos positivos de la inmunoterapia.

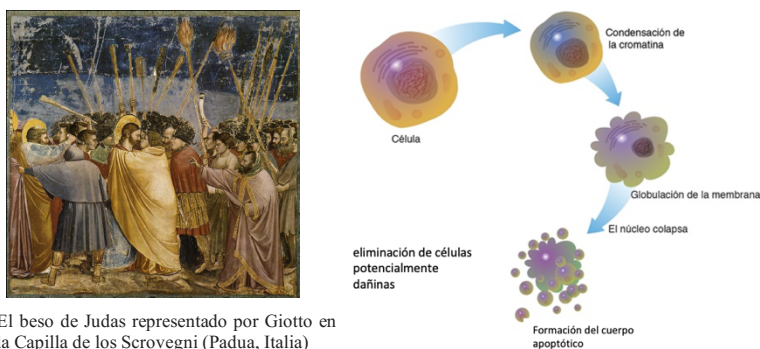
Como hemos visto en apartados previos, las células apoptóticas son capaces de polarizar a los macrófagos hacia una conformación TAM/M2 (Weigert *et al.*, 2007) y las células dendríticas hacia un fenotipo tolerogénico (Williams *et al.*, 2008). Tras esta polarización, ambas células son capaces de inducir una supresión de la respuesta inmune TH-1, favoreciendo la respuesta TH-2 por medio de varias vías de señalización celular.

Ya en 2006, Kleinclaus *et al.* demostraron que las células apoptóticas inducían una diferenciación hacia los linfocitos Treg, proceso mediado por TGF- $\beta$ . Si nos ceñimos al cáncer de páncreas, Wu *et al.* (2013) mostraron cómo esplenocitos apoptóticos inducían la proliferación de linfocitos Treg. Resumiendo, con los datos que la literatura nos ofrece podemos constatar que la respuesta inmune se inhibe tras la fagocitosis de antígenos producidos por las células apoptóticas, ya que se obtiene una diferenciación hacia células antiinflamatorias que favorecen el reparo celular e inhiben la respuesta inmune tanto en las APC como en las células efectoras; en este último caso, el efecto es tanto directo como indirecto, mediado por los factores secretados por los macrófagos y las células dendríticas.

Los tratamientos actuales, al producir una elevada tasa de apoptosis, aportan un beneficio a corto plazo en la patología neoplásica; no obstante, conociendo en profundidad los mecanismos fisiológicos que regulan la respuesta a la apoptosis en todos sus aspectos, podemos valorar que, a largo plazo, podría representar una causa de la resistencia a los tratamientos que se observa tras el inicio de la terapia, especialmente en el cáncer de páncreas.

### 1.9. La apoptosis: ¿El beso de Judas de la oncología?

Mediante el matiz poético del título de este apartado, se procede a exponer la hipótesis que explica la idea principal de la presente tesis con la siguiente comparación artística (Figura 7).



El beso de Judas representado por Giotto en la Capilla de los Scrovegni (Padua, Italia)

#### Figura 7. Símil entre la apoptosis y el beso de Judas.

Se ha comparado el beso de Judas (fotografía del cuadro con la escena representado por Giotto en la Capilla de los Crovegni, Padua, Italia), un gesto «noble» que esconde una traición a la apoptosis. Según nuestra hipótesis, la apoptosis que actualmente se entiende como el noble gesto con el que una célula se «sacrifica» para proteger el organismo, revela una traición. Se pretende demostrar con este montaje y símil que existe una regulación por retroalimentación que estimula las células del tejido para resistir a futuras apoptosis, así como que este proceso conforma la base de la transformación tumoral y de la resistencia al tratamiento quimioterapéutico.

Hasta la fecha, la apoptosis se considera un «gesto noble» (como un beso) por parte de una célula dañada, que muere por el bien del organismo. Incluso parece el único camino posible para que un enfermo de cáncer pueda encontrar la curación. Actualmente, el proceso de transformación neoplásica conforma algo estocástico, casual, no controlado por retroalimentación y prerrogativa de la célula, es decir, de forma individual. Resulta sorprendente que en un organismo en el que casi todo, incluso algo tan trivial como la regulación del apetito, se regule de forma no estocástica, controlada por retroalimentación y de manera global (no prerrogativa de una célula), y que justo la regulación de la apoptosis, tan importante, lo haga de una forma tan diferente y «arriesgada».

La respuesta celular al daño al ADN se produce de la siguiente manera:

- a) En un tejido expuesto a un evento dañino, como por ejemplo los rayos X, se puede producir un daño en el ADN. De todas las células del tejido, unas recibirán un daño mayor que otras.
- b) Las células, en función de la cantidad de daño producido en el ADN, podrán iniciar un proceso de reparo del ADN o, por el contrario, si es muy elevado o irreparable, iniciarán el proceso de muerte celular. En algunos casos, la célula, pese a tener el ADN dañado, puede continuar viva y mantener esas mutaciones en su ADN. Los tres escenarios serían:
  1. La célula decide que su destino es la apoptosis: se eliminaría y no se iniciaría el proceso de transformación tumoral.
  2. Si la célula finalmente decide reparar el ADN y esta se da de forma satisfactoria, no se produce apoptosis, pero tampoco se acumulan mutaciones en el ADN.
- c) La célula no entre en apoptosis, pero el ADN está tan dañado que no puede repararlo completamente; se irán acumulando mutaciones que finalmente podrán convertir a esta célula en una maligna o tumoral.

Pese a que los tres procesos en sí están finamente regulados y se conocen sus respectivas vías moleculares, el *celular fate*, i.e. el destino que elige la célula, parece responder a un fenómeno estocástico y, sobre todo, no regulado por retroalimentación. En principio, hasta la fecha, se supone que lo que ocurre en el tejido de otras células no influye el destino de las otras.

Si, por ejemplo, lo comparamos con la regulación del gasto energético en nuestro organismo, observamos cómo se produce una autorregulación muy fina; no es casual o estocástica e implica a muchas células y tejidos diferentes. Esta regulación se produce de la siguiente manera:

El organismo ingiere muchas calorías y las reservas de grasa aumentan. Esta grasa secreta leptina, que actúa sobre el hipotálamo disminuyendo la sensación de hambre. El hipotálamo, a su vez, activado por la leptina, produce más hormonas que incrementan el gasto energético (como por ejemplo T3). Cuando las reservas de grasa disminuyen, se reduce la cantidad de leptina, aumentando la sensación de hambre y disminuyendo el gasto calórico.

Volviendo a nuestra metáfora del beso de Judas, se ha elegido este símil para explicar la hipótesis en la que la apoptosis supone un «gesto» (el «beso-apoptosis») que esconde una gran traición: parece ser una señal que, al contrario de lo que uno esperaría, corrompe a los macrófagos

e impide que estos eliminen las células pretumorales e incluso las tumorales y, por el contrario, favorezcan su progresión.

Lo que se hipotetiza en la presente tesis es que exista un mecanismo de control de la apoptosis no estocástico, controlado por retroalimentación o *feedback* negativo para inhibirla en unas condiciones determinadas y que implique la participación de todo el tejido y no una sola célula. La idea de que la apoptosis se controle por retroalimentación también deriva de la observación de que la exposición a tóxicos, sobre todo de forma aguda, produce pérdida de células (como por ejemplo en la enfermedad de aplasia medular), mientras que la exposición crónica a estos mismos tóxicos no produce una pérdida paulatina de células en el tejido, como cabría esperar, sino justo todo lo contrario: se produce una acumulación de células que no van a apoptosis y que además acumulan mutaciones que pueden conducir al cáncer. Este fenómeno soportaría la idea de que la apoptosis se controle de manera estricta por retroalimentación.

A modo de ejemplo, imaginemos que en un determinado tejido haya 1000 células que se expongan a un factor dañino, como son los rayos X. Según la actual creencia, de estas 1000 células, algunas sufrirán mutaciones que se reparen, otras células sufrirán mutaciones que no se podrán reparar y se mantendrán, y otras directamente irán a apoptosis. Como no existe un mecanismo de autorregulación de este fenómeno, una nueva exposición parecida de tóxicos producirá aproximadamente los mismos daños.

En un sistema como el anterior, si el factor dañino persiste, se debería producir una pérdida paulatina de células en el tejido. Por el contrario, la acumulación de mutaciones hasta formar un tumor comprende algo estadísticamente menos probable. Sin embargo, observamos una frecuencia mucho mayor de enfermedades por acumulación de mutaciones (como el cáncer) que por pérdida progresiva de células (como por ejemplo: la aplasia medular).

Con el mecanismo que proponemos ocurriría lo siguiente: Si en esas mismas 1000 células del tejido expuestas al mismo tóxico se diera un mecanismo de «retroalimentación negativo» de la apoptosis, en las siguientes exposiciones al tóxico, dado que se eleva el umbral de tolerancia al daño antes de producirse la apoptosis, se incrementaría progresivamente el número de células capaces de soportar una acumulación mayor de mutaciones y menos células irían a apoptosis.

Esta regulación sería parecida a la producida por la leptina que, se ha comentado, protege al organismo de la pérdida de energía, en este caso evitaría la pérdida de células. La leptina, como efecto adverso, nos hace engordar, dado que cuando intentamos «hacer dieta», baja sus niveles, produce sensación de hambre y gastamos poca energía (el llamado «efecto yoyó» de las dietas), mientras que «el beso de Judas» nos hace enfermar de cáncer, porque cuando eleva el umbral de la apoptosis aumenta el número de células que, pese a acumular mutaciones, se mantienen vivas y por lo tanto son caldo de cultivo para la transformación tumoral.

Si analizamos lo anterior desde un punto de vista evolutivo, ambos mecanismos poseen un motivo: aunque actualmente se conocen los problemas producidos por el exceso de alimentación, la ingesta insuficiente de energía puede matar al organismo de una forma mucho más rápida (meses, como mucho), mientras que enfermedades como la diabetes puede progresar durante décadas sin matar al paciente. Del mismo modo, la pérdida de células y, por tanto, del tejido, como en el caso de una aplasia medular, mataría con mayor rapidez (en semanas) en comparación con un tumor, que suele necesitar al menos una década desde que se inicia la formación tumoral hasta matar al paciente.



Hasta ahora se ha explicado el «porqué» de este mecanismo. A continuación se requiere hipotetizar un sistema que explique «cómo» ocurre.

La propuesta de la presente investigación consiste en que, durante la apoptosis, existe un sistema de reconocimiento de esta, mediado por macrófagos y otras células con capacidad fagocítica. La fagocitosis de las células apoptóticas funciona entonces como un termostato: a mayor número de células apoptóticas ingeridas, mayor liberación de factores que actuarán sobre el resto de células del tejido aumentando su umbral de tolerancia para inducir apoptosis. Por lo tanto, en una sucesiva exposición a tóxicos, habrá un menor número de células que lleguen a la apoptosis y un mayor número de células que se mantengan vivas, pero acumulando mutaciones. Este sistema permitiría la supervivencia de células (evitando la pérdida de tejido), pero a expensas de que estas acarrean muchas mutaciones. Si este fenómeno se da en concurrencia con otros procesos fundamentales del cáncer, como por ejemplo la proliferación descontrolada, ello favorecería la iniciación y la progresión tumoral. Este mismo proceso podría estar también relacionado con la inducción de la quimiorresistencia.

En un principio, en el tejido tumoral expuesto a quimioterápicos, la apoptosis es muy elevada, por lo que se observa una disminución de la masa tumoral. Desafortunadamente, al cabo de un tiempo relativamente corto, sobre todo en el cáncer de páncreas, la apoptosis disminuye progresivamente y las células se vuelven totalmente quimiorresistentes en menos de un año. Nuestra hipótesis postula que los macrófagos, expuestos a células apoptóticas, secretan factores que protegen al resto de las células de futuras exposiciones a dichos tratamientos y probablemente incluso a otras quimioterapias. Por este motivo, en general, las segundas o terceras líneas de tratamiento suelen ser históricamente menos efectivas que las primeras. Este proceso también estaría involucrado en la resistencia a la inmunoterapia, al fomentar una respuesta TH2 que reduce la efectividad de los tratamientos inmunoterápicos.

## II. Hipótesis y objetivos

En la introducción de esta tesis doctoral se ha mostrado cómo el cáncer de páncreas es actualmente uno de los desafíos más complicados a los que se enfrentan los oncólogos, tanto a nivel de diagnóstico como de tratamiento. En esta tesis se ha intentado aportar una nueva forma de abordar los tratamientos para el cáncer de páncreas, lo que se podría denominar una «revolución copernicana»: no es el sol el que gira alrededor de la tierra si no al contrario. En el caso que nos atañe, diríamos que el descubrimiento de nuevas terapias que realmente puedan erradicar los tumores de páncreas no estaría basado exclusivamente en el estudio de las células tumorales si no que, además, sería de vital importancia estudiar las células que rodean a la célula tumoral, es decir, las células del estroma y en especial los macrófagos. En concreto, nuestra hipótesis postula que los macrófagos asociados al tumor promueven la diseminación de las células tumorales y la quimiorresistencia adquirida en los tumores de PDAC. Para abordar esta tesis tumoral se plantean tres objetivos fundamentales:

1. Demostrar que los macrófagos están implicados en la capacidad metastásica de las PDAC. Este objetivo se dividiría en 2 subobjetivos:
  - a) Demostrar que las células tumorales de PDAC pueden asociarse/fusionarse con macrófagos;
  - b) Demostrar que las células tumorales de PDAC unidas a macrófagos presentan un potencial mayor de circulación.
2. Demostrar que en PDAC, los macrófagos asociados al tumor están implicados en la quimiorresistencia adquirida. A su vez, este objetivo se dividiría en 3 partes:
  - a) Demostrar que los macrófagos responden a la muerte inducida por la quimioterapia;
  - b) Demostrar que los macrófagos son capaces de inducir quimiorresistencia adquirida a través de factores secretados;
  - c) Dilucidar el mecanismo molecular subyacente que proporciona esta capacidad quimiorresistente.
3. Demostrar que los macrófagos pueden modificar la respuesta tumoral a otros tratamientos, especialmente a la inmunoterapia. Aunque actualmente estos fármacos inmunoterápicos no se están utilizando en el cáncer de páncreas, se pretende una posible vía de resistencia, mediada por los macrófagos, que pueden reducir la respuesta inmune, que podría ser clave para diferenciar a los pacientes que potencialmente se podrían beneficiar de la inmunoterapia de aquellos que serían resistentes a ella. Nuestra hipótesis es que los macrófagos, especialmente en configuración M2, puedan reducir la activación de los linfocitos CD8<sup>+</sup> y en general la respuesta inmune y, por ello, configurar un mecanismo de resistencia a los fármacos inmunoterápicos actuales, tales como los inhibidores de PD1 (Nivolumab y pembrolizumab).

Por lo tanto, el objetivo de esta parte conforma valorar si el estado de activación del sistema inmune medido con el *inflamed ratio* (IR) entre las células activadas (CD8<sup>+</sup>, M1, dendríticas activadas vs. Treg, M2, dendríticas alternativamente activadas), es un factor predictivo de respuesta mejor que PDL-1.

### III. Materiales y métodos

#### 3.1. Muestras de pacientes y macrófagos

**Citometría de flujo.** Las muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer de páncreas y de donantes sanos obtenidas en colaboración con el hospital Ramón y Cajal (detallado anteriormente), se fijaron previamente usando Transfix (Cytomark, TFB-20-01) para evitar alteraciones o degradación de las muestras. Partiendo de un volumen de sangre entre 1 y 5 ml, separamos el suero de las células mediante centrifugación (300 g, 5 min) y marcamos la sangre con los anticuerpos *antihuman* CD163 y *antihuman* EPCAM o *antihuman* citoqueratina. Las muestras marcadas se analizaron con el citómetro acústico Attune NxT de 4 láseres (ThermoFisher Scientific) utilizando el filtro «*no-wash/no-lyse*» que permite, sin necesidad de lisar para eliminar los eritrocitos, ni de lavar la muestra, separar las células nucleadas de las no nucleadas (los eritrocitos que componen la gran mayoría de células de la sangre) y poder restringir el análisis a las células de interés. La identificación de las células doble positivas para CD163 y EPCAM o citoqueratina se realizó usando el *software* FlowJo 9.3 (Tree Star Inc., Ashland, OR).

**Tabla 1. Anticuerpos primarios (elaboración propia)**

Abs primarios – Epitopos	Fuente	Dilución	Aplicación	Fabricante
a-hu-CD163 (clon 10D6)	Monoclonal de ratón	1:200	IHC	Leica (n° Cat. NCL-cd163)
a-hu-YWHAZ	Policlonal de conejo	1:500	WB	ProteinTech (n° Cat. 14881-1-AP)
u-hu-p-Akt (Ser473)	Conejo	1:500	WB	Cell Signaling (n° Cat. 9271)
u-hu-Akt total	Conejo	1:1000	WB	Ceil Signaling (n° Cat. 9272)
u-hu-p-AXL (clon 713610)	Monoclonal de ratón	1:500	WB	Thermo Fisher (MA5-24334)
u-hu-AXL total (clon E. 614.5)	Monoclonal de conejo	1:1,000	WB	Thermo Fisher (MA5-14987)
u-GAPDH	Ratón	1:10,000	WB	Abeam (ab8245)
a-hu-CD163PE (clon REA812)	Humano	1:50	FC	Miltenyi (n° Cat. 130-112-128)
u-hu-CD206-PE (clon 19.2)	Monoclonal de ratón	1:100	FC	eBioscience (n° Cat. 12-2069-41)
u-mu-YM1	Policlonal de cabra	1:50	IHC	RdD (n° Cat. AF2446)
u-mu-CD163	Monoclonal de conejo	1:50	IHC	Abeam (n° Cat. ab182422)
u-mu-CD11b-PerCP-Cy5.5A	Rata	1:200	FC	Tonbo Biosciences (n° Cat. M1/70)
a-mu-F4/80-PE {clon REA126}	Humano	1:100	FC	Miltenyi (n° Cat.130-102-422)
a-mu-CD45-FITC	Rata	1:100	FC	BD (n° Cat. 553080)
U-CD3-APC	Rata	1:100	FC	BD (n° cat. IM2467)
a-CD8-FITC	Rata	1:100	FC	BD (n° cat. A07756)
U-CD197-PE	Rata	1:100	FC	BD (n° cat. B30631)
U-CD83-FITC	Rata	1:100	FC	BD (n° cat.IM241)
U-CD85-PE	Rata	1:100	FC	BD (n° cat. A22334)
a- CD4-APC	Rata	1:100	FC	BD (n° cat. A07750)
U-CD25-FITC	Rata	1:100	FC	BD (n° cat. IM0478U)
u-CD45 PerCP	Ratón	2:100	FC	Thermo Scientific. MA1102-30
a-EpCAMAP	Ratón	2:100	FC	Miltenyi, 130-111-000
EpCAM PE	Ratón	2:10	FC	BioLegend. 32420

**Tabla 2. Anticuerpos secundarios (elaboración propia)**

Abs secundarios – Epitopos	Fuente	Dilución	Aplicación	Fabricante
Anti ratón-HRP	Conejo	1:100	IHC	Dako (n° Cat. P0260)
Anti conejo-HRP	Asno	1:5,000	WB	Amersham (n° Cat. NA934)
Anti ratón-HRP	Oveja	1:5,000	WB	Amersham (n° Cat. NA931)
Anti cabra-HRP	Conejo	1:200	IHC	Sigma (n° Cat. A8919)

Para los ensayos de citometría de flujo sobre células *in vitro*, las células se resuspendieron en tampón FLOW [1X PBS; 3 % FBS (v/v); 3mM EDTA (v/v)] antes del análisis con el citómetro acústico Attune NxT de 4 láseres (ThermoFisher Scientific). Los detalles de los anticuerpos primarios y secundarios se encuentra en las anteriores Tabla 1 y Tabla 2. Para la tinción con anexina-V, las células flotantes y adheridas se agruparon y se resuspendieron en tampón de tinción 1X anexina-V con anexina-V-APC diluido 1:20 (Biotium, Fremont, CA) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente antes del análisis por citometría de flujo. Para todas las pruebas se utilizó DAPI para marcar las células muertas con el método anteriormente descrito.

Los datos de citometría de flujo se analizaron con el *software* FlowJo 9.3 (Tree Star Inc., Ashland, OR).

**Células tumorales pancreáticas primarias humanas.** Se obtuvieron xenograftos derivados de pacientes con PDAC (PDX-PDAC) en virtud de un Acuerdo de Transferencia de Materiales con el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, España (Referencia I409181220BSMH). Los xenograftos se procesaron con el método anteriormente descrito <sup>11</sup> para establecer cultivos primarios de PDX-PDAC de un número bajo de pasajes. La denominación de los cultivos de PDX-PDAC obedece a una codificación numérica aleatoria (por ejemplo Panc354, Panc185 o Panc286); fueron colocados en medio RPMI enriquecido con 10 % de suero bovino fetal y 50 unidades/ml de penicilina/estreptomicina y fungizona (todos ellos de ThermoFisher Scientific). Los cultivos primarios fueron sometidos a pruebas de micoplasmas con una periodicidad mínima de 4 semanas.

**Reactivos.** Se utilizaron los kits humano y de ratón de ELISA de 14-3-33ζ (Amsbio, Reino Unido, nº de catálogo AMS.E01Y0009 y AMS.E03P0216) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se resuspendió gemcitabina (Gemzar® , Lilly S.A., Madrid, España) a una concentración de trabajo de 1μg/ml en PBS. Se resuspendió Abraxane (Celgene, Summit, NJ) a una concentración de trabajo de 1mM en H<sub>2</sub>O. Se adquirió SGI-7079 (AbMole Bioscience Inc., Houston, TX; Cat no. M218) a LabNet Biotécnica SL (Madrid, España), y se resuspendió a una concentración madre de 5mg/ml en DMSO y se utilizó *in vitro* a una concentración de 1μM, según la descripción previa de Wu *et al.* (2017). Se adquirió 14-3-3ζ recombinante (r14-3-3ζ) a Cymitquímica (Barcelona, España) a una concentración de 2,7 μg/μl y se utilizó *in vitro* a una concentración de 4 μg/ml, según la descripción previa de Kobayashi *et al.* (2009). Se resuspendió colchicina (Alfa Aesar, Haverhill, MA) a una concentración de 10mM y se utilizó *in vitro* a una concentración de 10μM, y se resuspendió citocalasina D (Acros Organics, Geel, Bélgica) a una concentración de 1mM y se utilizó *in vitro* a una concentración de 2μM, en ambos casos según la descripción previa de Eng *et al.* (2007).

**Análisis por PCR de mutaciones de los genes KRAS y p53.** Se generó ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc SuperScript™ VILO™ (ThermoFisher Scientific, Heidelberg, Alemania) a partir de 500 ng de ARN total aislado de las células Panc354, Panc185 y Panc286 por el método de tiocianato de guanidina (GTC) utilizando protocolos estándar <sup>3</sup>. Los exones 2 a 5 de KRAS se amplificaron a partir de 100 ng de ADNc utilizando pares de cebadores: KRAS humano For 5'-GCCATTTTCGGACTGGAGCG-3' y KRAS humano Rev 5'-GCTAACAGTCTGCATGAGC-3' para generar un amplicón de 791 pb. El ciclado térmico consistió en un paso inicial de desnaturalización de 2 minutos a 95 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturalización (35 seg. a 95 °C), recocido (30 seg. a 60,5 °C) y extensión (1 min. a 72 °C), con un paso final de elongación de 1 min. a 72 °C. Los exones 1 a 8 del gen TP53 se amplificaron a partir de 100 ng de ADNc utilizando pares de cebadores: TP53 humano For 5'-

GCTCAAGACTGGCGCTAAAA-3' y TP53 humano Rev 5'-GCAGTGCTCGCTTAGTGCTC-3' para generar un amplicón de 1098 pb. El ciclado térmico consistió en un paso inicial de desnaturalización de 2 minutos a 95 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturalización (30 seg. a 95 °C), recocido (30 seg. a 53 °C) y extensión (1 min. 20 seg. a 72 °C), con un paso final de elongación de 1 min. a 72 °C. Los productos de PCR se purificaron con el kit de purificación de PCR QIAquick® (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, y posteriormente se secuenciaron utilizando un analizador de ADN multicapilar ABI Prism 3130XL (ThermoFisher Scientific). Las secuencias y los archivos de seguimiento de ADN se analizaron con SerialCloner 2-6-1 (Serial Basics) y 4Peaks (Países Bajos, Ámsterdam), respectivamente.

**Prueba TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling*).** Se utilizaron secciones de tres micras de tumores de PDAC fijados en formol e incluidos en parafina (FFPE) para la detección de apoptosis mediante la técnica TUNEL (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, PROMEGA), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, los tejidos se desparafinaron con xileno fresco, se lavaron en etanol al 100 %, se rehidrataron sumergiéndolos secuencialmente en lavados de etanol graduados (100 %, 95 %, 85 %, 70 %, 50 %) y se fijaron utilizando formaldehído libre de metanol al 4 % en PBS. A continuación, las secciones tumorales se trataron con proteinasa K y se incubaron con la enzima transferasa y los fluoresceína-12-dUTPs, a 37 °C durante 60 minutos, en una cámara humidificada. Los portaobjetos se empaparon en solución Anti-Fade (Molecular Probes) y el ADN marcado con fluoresceína-12-dUTP se visualizó con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 200Ts (Izasa S.A., Barcelona, España); las imágenes se capturaron con una cámara de microscopio y se procesaron con un paquete de software de Nikon.

**Inmunohistoquímica.** Para el análisis histopatológico, se tiñeron secciones de 3 µm de bloques FFPE con hematoxilina y eosina (H&E). Se utilizaron secciones seriadas adicionales para el análisis inmunohistoquímico de CD163 o YM-1 empleando los anticuerpos primarios y secundarios y las diluciones previamente estudiadas. Los antígenos se visualizaron utilizando tetrahidrocloreto de 3,3-diaminobencidina plus (DAB+). La tinción de contraste se realizó con hematoxilina. Las imágenes digitales se obtuvieron usando un AxioScan.Z1 (Carl Zeiss) con un objetivo 20X Plan Apo (resolución de 0,22 micras/píxel). Las imágenes digitales se analizaron y ajustaron utilizando el paquete de software Zen Light de Carl Zeiss.

**Prueba de fagocitosis *in vitro*.** Para el estudio de fagocitosis *in vitro* se colocaron  $5 \times 10^4$  macrófagos derivados de monocitos en placas de cultivo de pocillos de 100 mm. Los macrófagos se incubaron en medio libre de suero durante 2 horas antes de añadir  $2 \times 10^5$  células apoptóticas de PDAC. Las células apoptóticas se retiraron 4 horas después, los macrófagos se lavaron repetidamente y, 12 horas después del lavado, los macrófagos se observaron con un microscopio invertido EVOS FL (ThermoFisher Scientific) o se recuperaron en tampón FLOW y se analizaron en un citómetro Attune NxT. Inmediatamente antes de establecer los cocultivos, las células se marcaron con fluorescencia con los colorantes retenidos por filtros de membrana PKH67 (Sigma) o DilC18 (ThermoFisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron imágenes de micrografía de luz utilizando un microscopio de contraste de fases EVOS FL invertido, con un objetivo de 10X.

**Experimentos de cocultivo:** Se generaron células apoptóticas de PDAC sembrando  $1-2 \times 10^6$  células en 12 placas de 100 mm. Veinticuatro horas después del cultivo, se trataron las células durante 24 horas con 10 mg/ml de gemcitabina o 10 µM de Abraxane. Las células flotantes

y adheridas se recogieron, se agruparon y se sometieron a dos rondas de centrifugación a 1400 rpm durante 5 minutos. Los macrófagos derivados de monocitos se colocaron en placas de 100 mm a una densidad aproximada de  $1-2 \times 10^6$  células/placa, y se cultivaron con o sin células apoptóticas de PDAC durante un total de 3-5 horas. Se procedió a retirar las células apoptóticas, se lavaron exhaustivamente los macrófagos para eliminar todas las células apoptóticas de PDAC no fagocitadas, y se cultivaron los macrófagos durante otras 24 horas para permitir la acumulación de sustancias secretadas en el medio. El medio de cultivo condicionado (respectivamente, MØ<sup>Apop</sup>CM y MØCM) se recogió y se utilizó para las pruebas WB y de quimiorresistencia. Para esta última, las células de PDAC se colocaron en placas de cultivo de 12 pocillos, a una densidad aproximada de  $3 \times 10^5$  células/pocillo, y se cultivaron durante la noche en medio completo RMPI, MØ<sup>Apop</sup>CM o MØCM. Al día siguiente se trataron las células con gemcitabina o Abraxane, según lo indicado, y 48 h después se determinaron con citometría de flujo los porcentajes de células anexina-V positivas, según la descripción previa. El mismo protocolo se siguió para los experimentos con SGI-7079 y 14-3-3ζ recombinante (r14-3-3ζ), pero en este caso las células se trataron previamente con SGI-7079 (1 μM) durante 5 horas, y a continuación se trataron con r14-3-3ζ (4 μg/ml) durante otras 6 horas más, o bien se aplicó un tratamiento único de 6 horas con r14-3-3ζ, en ambos casos en medio libre de suero, antes de la prueba quimioterapéutica.

**Pruebas *in vivo*.** Los ratones se alojaron siguiendo las directrices institucionales, y todos los experimentos se llevaron a cabo en plena observancia de dichas directrices institucionales para el bienestar de los animales de experimentación, aprobadas por el Comité Ético de la Universidad Autónoma de Madrid (CEI 60-1057-A068) y de la Comunidad de Madrid (PROEX 335/14), y siguiendo las pautas éticas para el cuidado y utilización de los animales de experimentación establecidas en las *Normas internacionales para la investigación biomédica con animales* publicadas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS).

Para los experimentos ortotópicos singénicos, se anestesió a ratones C57Bl/6 por inhalación de isoflurano, se les afeitó y se les limpió la piel con un antiséptico cutáneo con contenido de etanol. Se realizó una pequeña incisión cutánea de línea media (0,8 cm) y se practicó una pequeña bolsa subcutánea. Se realizó una incisión igualmente pequeña (0,8 cm) en el peritoneo, se movilizó y se expuso el páncreas. En el páncreas de 30 ratones se implantaron ortotópicamente trozos de tumor de PDAC murino [procedentes de un ratón retrocruzado K-Ras<sup>+LSL-G12D</sup>, Trp53<sup>LSL-R172H</sup>, PDX1-Cre (KPC)<sup>5</sup>] de aproximadamente 20 mm<sup>3</sup>. Seguidamente, el páncreas y el bazo se recolocaron cuidadosamente en el abdomen. A continuación, se cerró el peritoneo con un punto de sutura utilizando hilo Prolene 6-0. La piel se cerró con grapas quirúrgicas. Durante las siguientes 48 h, los ratones fueron visitados regularmente, y se les administró Dalsy<sup>TM</sup> (Abbot) como analgésico en el agua durante una semana después del trasplante. Para la depleción de macrófagos, los ratones recibieron 150 μl de liposomas encapsulados en clodronato (ClodronateLiposomes, Ámsterdam, Países Bajos) mediante inyección retro orbital dos veces por semana, comenzando 24 horas antes de la implantación del tumor ortotópico y durante toda la duración del experimento. La gemcitabina se administró dos veces por semana (125 mg/kg i.p.) durante dos semanas, comenzando en la semana 3 o 4 después de la implantación del tumor ortotópico. El SGI-7079 se resuspendió en hidroxipropilmetilcelulosa al 0,5 % (Sigma) más Tween 80 al 0,1 % (Sigma), y se administró a los ratones 50 mg/kg diarios por vía oral durante tres semanas a partir de la tercera semana de la implantación del tumor ortotópico. El páncreas y el hígado se cosecharon 5 o 6 semanas después de la implantación. Los páncreas se fotografiaron y se pesaron; la mitad se fijó en PFA al 4 % durante la noche a 4 °C y posteriormente se incrustó en parafina, y la otra mitad, junto con los

hígados, se disolvió mecánicamente para después digerirse enzimáticamente con colagenasa tipo I (Alfa Aesar, Alemania) durante 15 minutos a 37 °C con agitación, seguido de varias rondas de filtración y lavado antes de la tinción con los anticuerpos.

**Preparación de ARN y RTqPCR.** El ARN total se aisló por el método GTC.<sup>3</sup> Se utilizó 1 µg de ARN purificado para la síntesis de ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc Maxima First Strand para RT-qPCR con dsDNasa (ThermoFisher Scientific), seguido de RTqPCR con SYBR Green (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, ThermoFisher Scientific) utilizando un termociclador en tiempo real Applied Biosystems StepOnePlus™ (ThermoFisher Scientific). El ciclo térmico consistió en una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95 °C, seguida de 40 ciclos de desnaturalización (15 segundos a 95 °C) y recocido/extensión (1 minuto a 60 °C). El número relativo de copias de ARNm se determinó utilizando curvas estándar de diluciones seriadas de plásmidos con las secuencias codificantes objetivo, y se normalizaron con respecto a los niveles de β-actina.

**Datos de expresión génica y análisis GSEA.** Los datos de expresión génica utilizados en este estudio son de disponibilidad pública. Los datos de Janky *et al.* (2016) se descargaron de GEO (GSE62165); los datos de Jandaghi *et al.* (2016) se descargaron de ArrayExpress (E-MTAB-1791); los datos de Bailey *et al.* (2016) constan en una figura complementaria de su trabajo publicado, y los datos META, que contiene los sets de datos GSE15471, GSE16515, GSE22780 y GSE32688, se generaron con el procedimiento expuesto en<sup>9</sup>. Se estratificó a los pacientes en función de la mediana de los genes indicados, y el análisis de supervivencia se realizó con R. Se utilizó la prueba de LogRank para determinar el grado de significación estadística. Se practicó una regresión de Cox para calcular la razón de riesgos. Las muestras incluidas en el cuartil superior e inferior de expresión de 14-3-3ζ se compararon vía GSEA, utilizando la colección de conjuntos de genes Hallmark de la base de datos MSigDB. Se utilizó el módulo GSEA de la suite Genepattern del Broad Institute, con 1000 permutaciones, y el umbral de significación estadística adoptado es FDR<25 %.

**Análisis proteómico: preparación de la muestra, espectrometría de masas y análisis bioinformático.** Se cuantificaron por el método Bradford los concentrados de proteínas del secretoma de los macrófagos, células tumorales vivas y apoptóticas, cocultivo de macrófagos con células tumorales vivas y apoptóticas y medio DMEM, y 35 µg de cada muestra se hirvieron en tampón SDS-PAGE (60 mMTris/HCl pH 6.8, 2 % SDS, 0,001 % de azul de bromofenol, 10 % de glicerol, 2 % de 2-mercaptoetanol), se resolvieron con SDS PAGE en un gel de poliacrilamida al 12,5 % y se tiñeron con Comassie. Digestión *in situ*: Se cortaron carriles enteros de gel en siete tiras cada uno, se lavaron con agua MilliQ y acetonitrilo y se sometieron a digestión proteica *in situ*. En resumen, los cortes de gel se redujeron y alquilaron con 1,4-ditiotreitol (10 mM) y yodoacetamida (50 mM) respectivamente, y luego se lavaron y rehidrataron en solución de tripsina (12 ng/µl) en hielo durante 1h. Tras la adición de 30 µl de bicarbonato de amonio (10 mM, pH 7,5), las muestras se digirieron durante la noche a 37 °C. Se recogieron los sobrenadantes y se extrajeron los péptidos de las láminas de gel utilizando acetonitrilo al 100 %. Se recogió un sobrenadante duplicado y se combinó con el primero. Todas las muestras de péptidos se secaron y se disolvieron en FA al 10 % antes de la espectrometría de masas. Se inyectaron 5 µl de la mezcla de péptidos obtenida en un sistema LC nanoAcquity (Waters Corp. Manchester, Reino Unido). Los péptidos se separaron utilizando una columna BEH C-18 de 1,7 µm (Waters Corp. Manchester, Reino Unido) a un flujo de 280 nl/min. La elución de los péptidos se alcanzó con un gradiente lineal del 15 al 50 % (solución A: 95 % H<sub>2</sub>O, 5 % ACN, 0,1 % FA; solución B: 95 % ACN, 5 % H<sub>2</sub>O, 0,1 % FA) en 55 min. Los datos MS y MS/MS se obtuvieron utilizando un LTQ-

Orbitrap XL (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). El software Xcalibur (ThermoFisher Scientific) seleccionó automáticamente los quince iones peptídicos con carga doble y triple más intensos, que fueron fragmentados. Tras las mediciones de espectrometría de masas, los datos MS se procesaron para generar listas de picos para la identificación de proteínas. Las búsquedas en las bases de datos se realizaron con el servidor MASCOT. Se utilizó la base de datos SwissProt, que permite 2 escisiones perdidas, carbamidometilo (C) como modificación fija, y oxidación (M) y fosforilación (ST) como modificaciones variables. La tolerancia del péptido se fijó en 30 ppm y la tolerancia MS/MS, en 0,8 Da.

**Análisis Western blot.** Las células se cosecharon en tampón RIPA (Sigma) enriquecido con un cóctel de inhibidores de proteasa (Roche Applied Science, Indianápolis, IN). Se resolvieron con SDS-PAGE 50 microgramos de proteína o 50 µg de sobrenadantes concentrados en el filtro de membrana Amicon Ultra 30K (Millipore, Irlanda), y se transfirieron a membranas de PVDF (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ). Las membranas se bloquearon secuencialmente con 1X TBS con 5 % de BSA (p/v) y 0,5 % de Tween20 (v/v), se incubaron con una dilución 1:500-1:1000 de los anticuerpos indicados durante la noche a 4 °C, se lavaron 5 veces con 1X PBS con 0,5 % de Tween20 (v/v), se incubaron con anticuerpos de cabra anti-conejo o de cabra anti-ratón (Amersham) conjugados con peroxidasa de rábano, y se lavaron de nuevo para eliminar los anticuerpos libres. Los complejos de anticuerpos unidos se detectaron con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal (Amersham).

INFLAMED es un estudio observacional prospectivo en la que se incluirán 50 pacientes que van a iniciar o han iniciado el tratamiento con inhibidores de Pdl-1 (Nivolumab, Pembrolizumab) sin que haya habido cambios en la respuesta al mismo (mantienen respuesta completa, respuesta parcial o enfermedad estable).

#### 3.2. Tamaño del estudio y determinación del tamaño de la muestra

Dado que se trata de un estudio observacional no comparativo, los cálculos del tamaño de la muestra se centraron en el equilibrio entre el número de pacientes que podrían reclutarse en un período de tiempo razonable, la necesidad de analizar subgrupos de pacientes y la precisión de las estimaciones, medida como el según los cálculos estadísticos realizados, el número mínimo para obtener diferencias estadísticamente significativas se situaría entre los 40 y 60 pacientes; por lo tanto, situamos el tamaño de la muestra en 50 pacientes para optimizar los tiempos y mantener una buena calidad estadística.

#### 3.3. Recogida y envío de muestras

Se realizó una analítica de sangre del paciente en el momento previo a iniciar la inmunoterapia. La muestra se codificó para garantizar la anonimidad del paciente y se envió al laboratorio de genética del hospital Quirón de Madrid para proceder a su análisis. En el laboratorio se analizó el porcentaje de los distintos tipos celulares mediante la técnica de citometría de flujo.

**Citometría de flujo:** Se recogieron 5mL de sangre en tubos tratados con EDTA y se añadieron 200µL de Transfix (Cytomark, Cat no. TFB-20-1) para fijar las células. Transfix es una solución estabilizadora de antígenos celulares que previene su degradación a 4 °C durante al menos una semana. La muestra de sangre fijada se centrifugó, se trató con solución de lisis ACK (ThermoFisher Cat no. A1049201) para eliminar los glóbulos rojos (células no nucleadas) y las



células restantes (nucleadas) se resuspendieron en 1mL de solución de citometría [1X PBS; 3 % FBS (v/v); 3mM EDTA (v/v)] para su análisis con el citómetro Attune NxT Acoustic de 4 láseres (ThermoFisher Scientific) previo marcaje con los siguientes marcadores:

- Marcadores para células T efectoras: CD3-APC (BD Cat no. IM2467) y CD8-FITC (BD Cat no. A07756).
- Marcadores para células T reguladoras: CD4-APC (BD Cat no. A07750) y CD25-FITC (BD Cat no. IM0478U).
- Marcadores para macrófagos: CD197-PE (BD Cat no. B30631) para M1 y CD163-APC (Miltenyi Cat no. 130-097-63) para M2.
- Marcadores para células dendríticas: CD83-FITC (BD Cat no. IM241) para activadas y CD85-PE (BD Cat no. A22334) para inmunosupresoras.

Los resultados nos permitieron evaluar el *inflamed ratio* (IR) que, como se ha comentado, se obtuvo de calcular el ratio entre células inmunes activadas frente a las inhibitorias: CD8+/T-reg, M1/M2 y células dendríticas activadas/inmunosupresoras.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Macrocélulas en el proceso metastásico

Como se ha observado en la introducción, una de las mayores problemáticas en el cáncer de páncreas es la falta de detección precoz tanto de la enfermedad en sí como de las metástasis. En el primer caso, la falta de diagnóstico precoz impide llegar a tiempo para conseguir la curación del paciente; en el segundo caso, los pacientes con metástasis no diagnosticadas se someten a cirugías muy invasivas que, en sus circunstancias, no solo no se benefician de esta, sino que aumenta la morbi-mortalidad. Desafortunadamente, hasta la fecha, el único biomarcador empleado, el CA19.9, carece de la sensibilidad suficiente para conseguir un diagnóstico precoz, así como de la especificidad necesaria para evitar someter a pacientes a cirugías sospechando que pueda haber metástasis no detectadas.

Por todas estas razones, es necesario desarrollar nuevos biomarcadores que permitan tanto un diagnóstico precoz como la detección de metástasis «invisibles». Para lograrlo, es necesario entender bien la biología de todo el proceso de diseminación tumoral. En la parte de introducción de la presente tesis se han comentado dos procesos importantes: El primero es que existe una subpoblación de células tumorales, conocidas como «células madre de cáncer» o «células tumorales troncales,» que representan un porcentaje muy minoritario de todas las células que componen el tumor, pero que presentan una elevada capacidad para promover la tumorigénesis, las metástasis y la resistencia al tratamiento. La segunda es que las células tumorales, especialmente las troncales, cuando se encuentran en el torrente sanguíneo, están unidas de forma muy estrecha a los macrófagos, que les proporcionan «protección» frente a los sistemas de eliminación tumoral del organismo y amplifican su potencial metastásico.

Dado que esta unión de ambos tipos celulares, tumorales y macrófagos, solo puede estar presente en personas con cáncer, y que en sujetos sanos no deberían existir, a diferencia del marcador CA19.9 que también está presente en procesos benignos, hemos hipotetizado que esta unión de células podría ser un biomarcador de diagnóstico. Esto sobre todo podría resultar ser útil para el diagnóstico precoz de metástasis. Para poder utilizarlo como biomarcador, debe cumplir otras importantes características, entre ellas, principalmente que sea poco invasivo, que pueda ser detectado con una analítica de sangre y que resulte fácilmente reproducible.

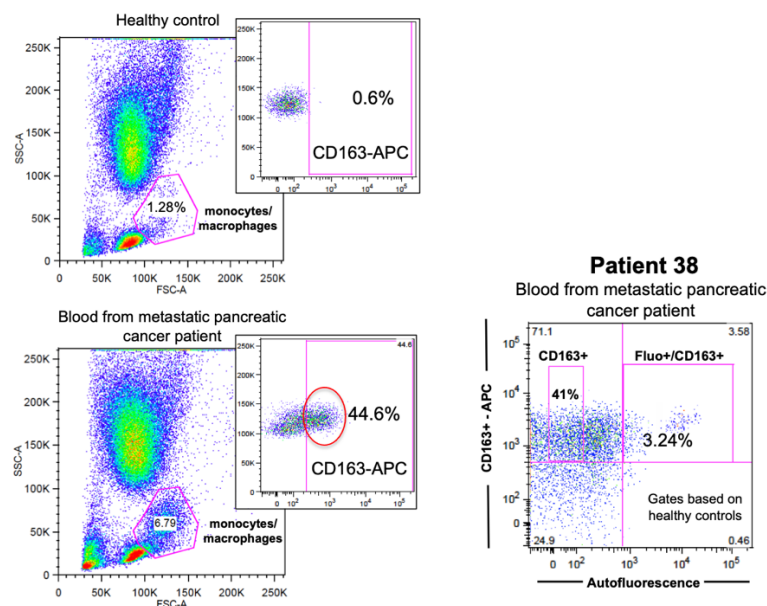
Las dificultades encontradas hasta la fecha para poder analizar las células tumorales en sangre periférica de pacientes se debía a que se trata células muy escasas, incluso en pacientes con elevada carga tumoral y en presencia de metástasis, sobre todo si tenemos en cuenta la relación entre células tumorales y el resto de células que se encuentran en la circulación periférica como los eritrocitos (10x9/ml), las plaquetas (10x6/ml) o incluso otras células del sistema inmune (10x3/ml). Hasta la fecha, se utilizaba un sistema de lisis de los eritrocitos para eliminarlos. No obstante, este sistema y, en definitiva, cualquier manipulación previa de la muestra de sangre, reducía el tamaño de la muestra y también el número de células tumorales que podíamos detectar; por lo tanto, nos planteamos la necesidad de encontrar otra metodología.

#### 4.1.1. Detección de células tumorales circulantes por citometría de flujo

Como en otros tipos de cáncer (por ejemplo, el cáncer de colon), se ha demostrado que las CTC comprenden un indicador relevante a nivel de pronóstico y de detección precoz, y pueden utilizarse en una biopsia «líquida» para evaluar la respuesta a diferentes tratamientos en tiempo real (Lim et al., 2014; Yap et al., 2014). Desafortunadamente, los métodos para la identificación de las CTC en pacientes con PDAC, e incluso su aislamiento mediante plataformas como Veridex CellSearch o los «chips» basados en microfluídica (por ejemplo, el sistema IsoFlux), poseen un rendimiento muy bajo, ya que las CTC representan menos de una de cada mil millones de células sanguíneas, de manera que atraparlas es bastante difícil. Resultaría más sencillo

*hallar una aguja en un pajar*. Además, métodos como el Veridex CellSearch se basan en 2 marcadores: el marcador epitelial EpCAM, un panantígeno de diferenciación epitelial que se expresa en las células epiteliales y en casi todos los carcinomas, y en el marcador ductal Citoqueratina 19 (Ck19). Si creemos que una célula tumoral circulante proviene de una célula epitelial que ha pasado de un estado epitelial a un estado mesenquimal (TEM), con total probabilidad la expresión de ambos marcadores se perderá en las CTC, lo que indica que métodos como el Veridex CellSearch no resultan los más adecuados para captar las CTC en pacientes con cáncer de páncreas.

Por otro lado, para mejorar la capacidad de detección de las CTC en sangre, los sistemas de Veridex CellSearch e IsoFlux emplean un paso previo de eliminación de leucocitos, de células endoteliales y de eritrocitos. Hipotéticamente, la eliminación de las células del sistema inmune debería mejorar la capacidad de detectar las CTC sino fuera por el hecho de que cada vez más estudios indican que las CTC salen a la circulación acompañadas físicamente de células del sistema inmune, como pueden ser los macrófagos «M2»/protumorales. Investigaciones de la última década apoyan la hipótesis de que las CTC interactúan con células inflamatorias durante el proceso de metástasis (Adams et al., 2014; Valent et al., 2012), probablemente vía interacciones célula a célula. En sangre periférica de pacientes con metástasis, observamos por citometría de flujo, separando la sangre por dispersión delantera y lateral para identificar las células nucleadas gracias al filtro «no wash/no lyse», que la mayoría de las CTC se encuentran junto a la población de monocitos/macrófagos. Estas células no solo se localizan junto con los monocitos y los macrófagos, sino que también son positivas para los marcadores de macrófagos M2, como CD163, y marcadores de CSC, como puede ser la autofluorescencia (Miranda-Lorenzo et al., 2014). El conjunto de estos datos indicó que las CTC en los pacientes con cáncer de páncreas pueden estar fusionadas con macrófagos o, al menos, íntimamente asociadas a ellos (Figura 8).



**Figura 8. Detección de CSC en la población de macrófagos M2 (elaboración propia).**

Arriba izquierda se muestra la citometría de flujo de un control sano, se observa que la población de células positivas para CD163-APC, dentro de la población de monocitos/macrófagos, es muy baja (inferior al 1%). Abajo izquierda se muestra como esta población se incrementa en casi un 45% en un paciente con cáncer de páncreas metastásico. Abajo derecha se identifica un 3,24% de células autofluorescentes (CSC) dentro del total de CD163 positivas. Estos resultados ponen de manifiesto que en pacientes con cáncer de páncreas metastásicos hay una cantidad de TAM que acompañan a las CSC en el torrente sanguíneo.

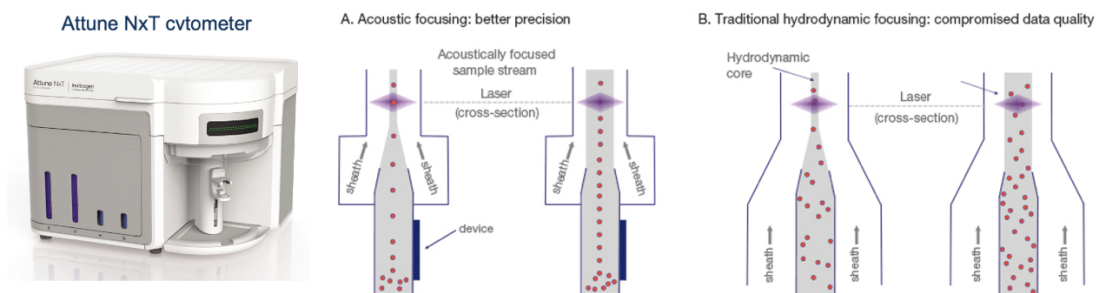
Esta observación concuerda con los estudios de Adams DL et al., donde los autores muestran que los macrófagos se fusionan con CTC de cáncer de mama y de cáncer de páncreas, creando «células gigantes» que puede servir como un biomarcador de diseminación en sangre (Adams et al., 2014). Asumiendo esta

interacción, en la presente tesis teníamos como objetivo desarrollar una metodología basada en citometría de flujo donde se pudieran sortear las CTC usando los marcadores tradicionales combinados con marcadores de TAM, como puede ser el marcador CD163. Esta metodología única nos ofrecería la oportunidad de estudiar y aislar, con alto rendimiento, la población de CTC circulantes que actualmente representan el puente entre el tumor primario y las lesiones metastásicas secundarias.

Para ello, propusimos establecer una metodología basado en citometría de flujo. En nuestro laboratorio disponemos de un citómetro Attune™ NxT, equipado con *acoustic-assisted hydrodynamic focusing*, un sistema que utiliza un proceso de enfoque acústico que alinea los eventos para que pasen de uno en uno aumentando la sensibilidad del análisis para detectar el máximo de eventos posibles, así como su velocidad (Figura 9).

Esta tecnología reduce el tiempo necesario para obtener resultados:

- 35.000 eventos(s) reales (+10 % tasa de coincidencia);
- Velocidad electrónica máxima de 65.000 eventos(s);
- Analizar muestras pequeñas o muy limitadas a mayor velocidad y sin pérdida de eventos;
- Identificar poblaciones escasas debido a la tecnología de enfoque acústico de alineamiento;
- Realizar eficazmente ensayos tradicionalmente largos.

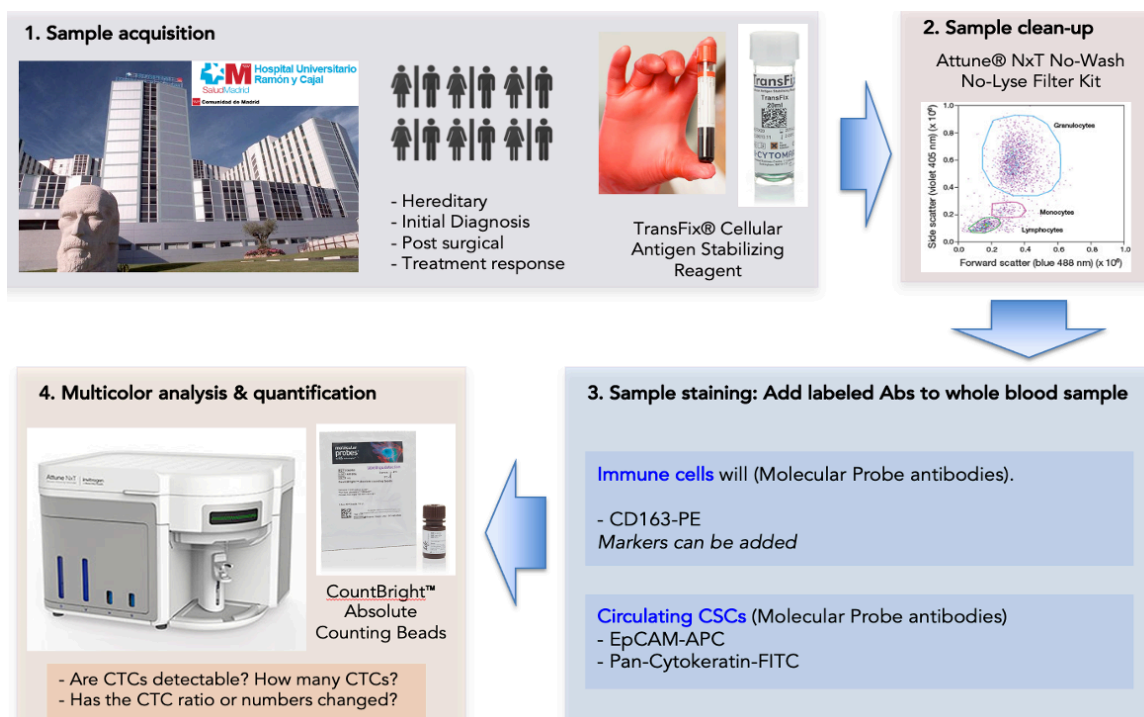


**Figura 9. Enfoque acústico del citómetro Attune NxT (Thermo Fisher Scientific, s.f.).**

A la izquierda vemos una imagen del citómetro Attune NxT. A su derecha se observa como los distintos sistemas de fluidica afectan al flujo de la muestra. En los dos primeros vemos como el sistema acústico permite una mayor precisión de análisis al alinear las células de una en una, además de permitir mayor velocidad de adquisición. En las 2 imágenes de la derecha vemos el método tradicional hidrodinámico donde varias células pueden pasar al mismo tiempo a través del láser, y más en el caso de aumentar la velocidad de adquisición, con la consecuente pérdida de precisión.

Asimismo, se ha utilizado un set de filtros llamados «*no wash/no lyse*». Este set de filtros sin lavado ni lisis es específico para el citómetro Attune™ NxT y permite su configuración con un canal de dispersión lateral adicional del láser violeta. Este set permite la inmunofenotipificación sin lisis ni lavado de sangre completa. La técnica permite, al mismo tiempo, reducir los tiempos al no ser necesario lisar ni lavar la muestra de sangre, y sobre todo, aumentar la sensibilidad al no perder «eventos», especialmente la células de interés que serían, en este caso, los macrófagos unidos a células tumorales, que se pueden perder cuando se lisa y se lava la sangre.

Detallado en la Figura 10 más abajo, mostramos el proceso desarrollado para la detección de las CTC en sangre de pacientes con cáncer de páncreas.



**Figura 10. Estudio de macrocélulas en biopsia líquida (elaboración propia).**

Representación gráfica del procesamiento de muestras: las muestras de sangre periférica obtenida (en el caso de la imagen, del Servicio de Oncología del Hospital Universitario Ramón y Cajal), se dividieron en controles sanos, pacientes con cáncer de páncreas en fase inicial y pacientes con cáncer de páncreas metastásico. Las muestras fueron estabilizadas con TransFix (Cytomark, Cat no. TFB-20-1) y posteriormente analizadas por citometría de flujo con el citómetro Attune NXT usando el filtro *No-wash no-Lyse*. Las muestras se marcaron previamente con los anticuerpos CD163-PE (para marcar macrófagos M2) y EpCAM-APC o Pan-Citoqueratina-FITC (para marcar células epiteliales).

Hemos utilizado como marcador de superficie de los macrófagos el CD163. Este es un marcador bien establecido en la literatura y uno de los más específicos para los macrófagos tipo TAM, tal y como se ha mostrado en el primer apartado de la presente tesis doctoral.

Como se puede ver en la anterior Figura 10, para las células tumorales hemos utilizado los marcadores EPCAM y citoqueratina que identifican a las células epiteliales que, en condiciones normales, no deberían estar presentes en la sangre periférica y, por lo tanto, al encontrar células positivas en la sangre, podemos asumir que son células tumorales.

#### 4.1.2. Detección de células tumorales circulantes por citometría de flujo - *No Wash/No Lyse*

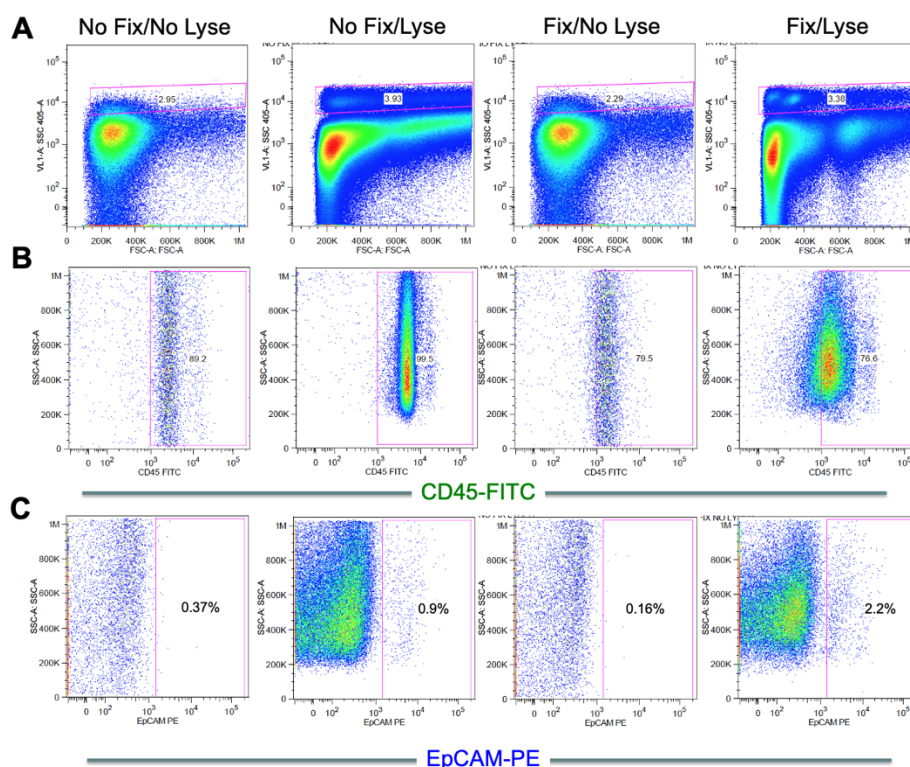
Teniendo en cuenta que nuestro objetivo final suponía desarrollar una metodología susceptible de ser utilizada con muestras de pacientes y posiblemente en un entorno clínico, tuvimos que considerar la opción de fijar las muestras con un producto que preservara los antígenos de la superficie celular a 4 °C durante un período de al menos una semana. Para esto, seleccionamos el TransFix® Cellular Antigen Stabilizing Reagent, que ha demostrado ser compatible con el reconocimiento de antígenos basado en citometría de flujo con anticuerpos marcados con fluorescencia. Además, se pretendía confirmar si el conjunto de filtros *No Wash/No Lyse* era absolutamente necesario para detectar las CTC y reducir el ruido de fondo, tradicionalmente asociado a las técnicas de lisado. Para ello, procesamos 10 ml de sangre de un donante sano mediante 4 protocolos:

1. La muestra se fijó con «TransFix®» pero no se lisó.
2. La muestra se fijó con «TransFix®» y se lisó con el tampón de lisado ACK.

3. La muestra no se fijó, pero se lisó con tampón de lisado ACK.
4. La muestra no se fijó ni se lijó.

Independientemente del procesamiento, las 4 muestras se tiñeron con anticuerpos contra CD45 y EpCAM humanos y se analizaron con el citómetro Attune Nxt Acoustic utilizando el conjunto de filtros *No Wash/No Lyse*.

En primer lugar, se observó que, utilizando el conjunto de filtros «*No Wash/No Lyse*», resultaba posible identificar la población de glóbulos blancos nucleados; sin embargo, la lisis de la muestra mejoraba la capacidad de identificar visualmente las poblaciones objetivo, las células nucleadas y positivas para CD45 (Figura 11A-B). La fijación con TransFix® Cellular Antigen Stabilizing Reagent no pareció afectar al tamaño ni a la complejidad de la población y, lo que es más importante, no aumentó la unión del anti-CD45 ni del anti-EpCAM, lo que sugiere que la fijación no aumenta la fluorescencia inespecífica de fondo (Figura 11B-C). Sin embargo, la lisis de la muestra aumentó la fluorescencia inespecífica de fondo, lo que fue particularmente evidente con el anticuerpo anti-EpCAM (Figura 11C). Estos datos sugieren que la fijación podría utilizarse para almacenar las muestras de los pacientes para su posterior procesamiento, pero el lisado de la muestra para reducir la cantidad de eritrocitos aumentó la posibilidad de falsos negativos.



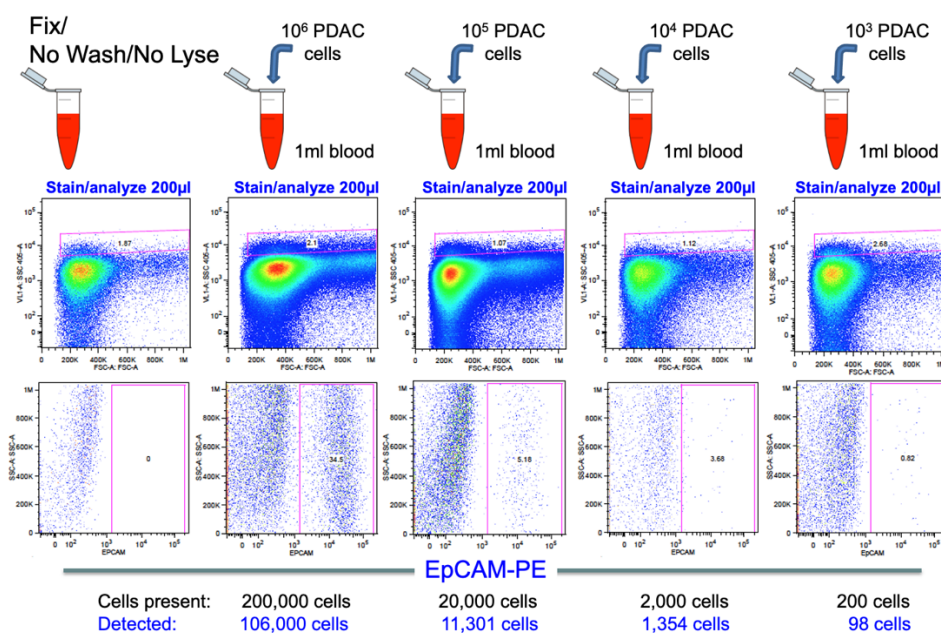
**Figura 11. Selección del método óptimo para el procesamiento de muestras (elaboración propia).**

En la figura se observa la citometría realizada a una muestra de un individuo sano dividida en cuatro porciones, una sin fijar ni lisar, otra lisada y sin fijar, una tercera fijada y no lisada y, por último, una fijada y lisada. Todas las porciones fueron posteriormente marcadas con CD45 FITC (leucocitos) y EpCAM PE (células epiteliales). (A) Observamos que la lisis mejora ligeramente el porcentaje de células nucleadas identificadas. (B) Dentro de la selección de células nucleadas, no se observan diferencias significativas en la detección de células CD45 positivas. (C) Las porciones lisadas presentan un elevado porcentaje de eventos EpCAM PE positivos (los cuales deberían ser prácticamente inexistentes en la sangre de un individuo sano), mientras que estos porcentajes son casi indetectables en las porciones no lisadas, por lo que atribuimos la presencia de estos eventos a falsos positivos o ruido de fondo debido a la lisis. Concluimos que la fijación de la muestra no altera la detección de las células de interés, mientras que la lisis sí lo hace.

#### 4.1.3. Detección de células tumorales circulantes por citometría de flujo - límite de detección

Partiendo de estas premisas, propusimos testar nuestra metodología basada en citometría de flujo para detectar células tumorales, que asumimos que son células madre o troncales de cáncer (CTC) unidas a macrófagos (doble-positiva = EPCAM+ o Citoqueratina+/ CD163+) a partir de tan solo 1 ml de sangre periférica.

En primer lugar, para evaluar nuestro límite de detección de células tumorales en sangre, realizamos un experimento preliminar en el que mezclamos concentraciones decrecientes de células tumorales PDAC con 1 ml de sangre periférica de individuos sanos. Sabiendo que las muestras tenían 200.000, 20.000, 2000 y 200 células tumorales, respectivamente, analizamos estas muestras con el citómetro Attune™ NxT utilizando el filtro *No Wash/No Lyse*. Gracias a este ensayo se comprobó que resulta posible detectar al menos la mitad de las células tumorales presentes. Por ejemplo, se detectaron 106.000 células en la muestra con 200.000 e incluso hasta 98 células en la muestra con solo 200 células, posibles resultados muy prometedores (Figura 12).



**Figura 12. Experimento preliminar para determinar el límite de detección de células epiteliales en sangre (elaboración propia).** La muestra de sangre de un individuo sano (fijada y sin lisar) se dividió en porciones de 1 ml y se mezclaron con números conocidos de células tumorales primarias de PDAC. Se marcó con anticuerpo EpCAM-PE y se analizó por citometría con el filtro *No wash/No lyse*. Se determinó que la capacidad de detección de células tumorales en sangre era de al menos un 50 %.

#### 4.1.4. Detección de células tumorales circulantes por citometría de flujo – estudio prospectivo

Con estos experimentos preliminares, se decidió realizar un estudio prospectivo (Figura 10) en el que se analizaron muestras de sangre periférica de personas sanas (n=22) y se compararon con pacientes con cáncer de páncreas en fase inicial (n=10) o metastásica (n=11).

Los resultados se muestran en la Figura 13 (*MF+Tumors cells fusion*). Las macrocélulas (o fusión macrófago-célula tumoral), CD163+/EPCAM+ o CD163+/citoqueratina+ son prácticamente inexistentes o presentan porcentajes muy bajos en personas sanas; se mantienen muy bajas también en personas con cáncer de páncreas en fases iniciales y, finalmente, son muy elevadas, de forma estadísticamente significativa, en pacientes con cáncer de páncreas metastásico. Las implicaciones de estos resultados se discutirán en el siguiente capítulo de la presente tesis doctoral.

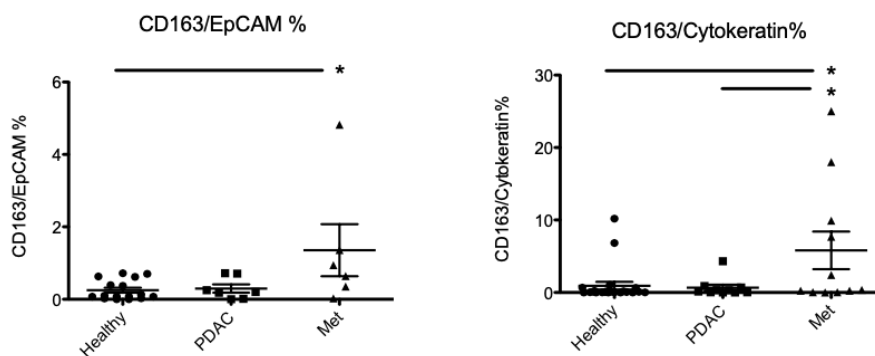


Figura 13. Resultados del estudio de macrocélulas (elaboración propia).

## 4.2. Mecanismos de resistencia a la apoptosis producidos por los TAM en respuesta a la quimioterapia

### 4.2.1. Polarización de los macrófagos promovida por las células apoptóticas

Como hemos mencionado en la introducción, la infiltración por TAM es una característica importante del cáncer de páncreas. Además de la función que puedan poseer en la circulación y diseminación de las CTC, se ha demostrado que su infiltración de TAM se encuentra inversamente relacionada con la supervivencia. Dado que el objetivo principal de la quimioterapia es inducir apoptosis en la célula tumoral y que la función principal de los macrófagos consiste en fagocitar esas mismas células apoptóticas, se ha hipotetizado que las mismas células apoptóticas pueden promover la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo TAM.

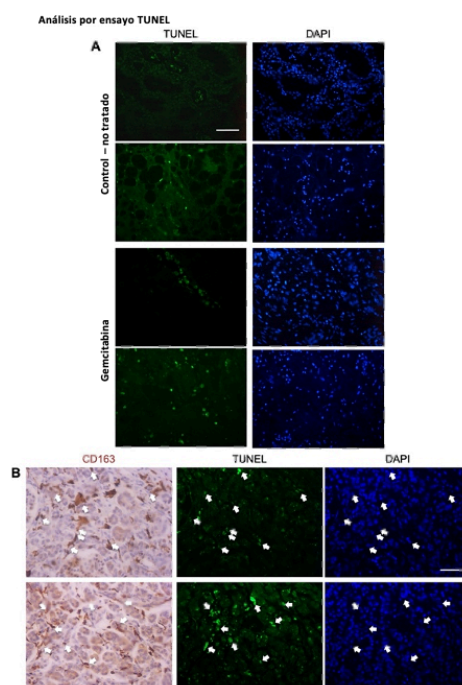


Figura 14. Análisis mediante técnica TUNEL (elaboración propia).

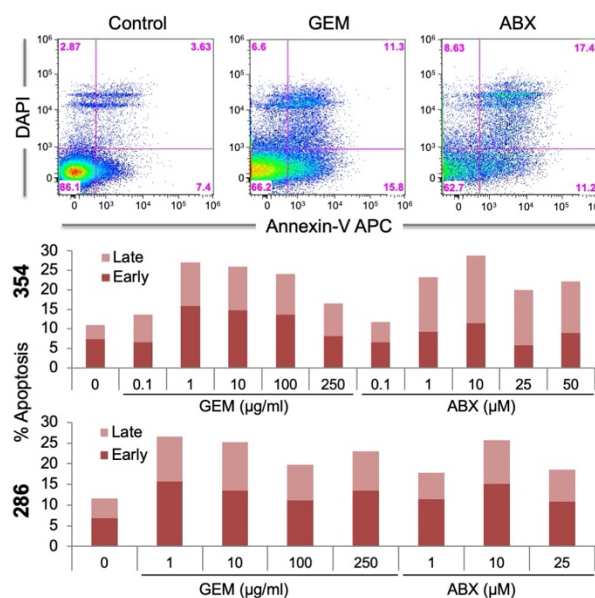
Para comprobar esta hipótesis, se ha realizado un experimento preliminar para evaluar la cantidad de infiltración de los macrófagos durante la quimioterapia. Se han analizado los diferentes grados de infiltración por macrófagos y la cantidad de células apoptóticas presentes en paciente con cáncer de páncreas sometidos a



tratamiento quimioterápico frente a pacientes sin tratamiento mediante la técnica de TUNEL (Figura 14 más abajo). Gracias a estos experimentos, se ha podido detectar por inmunohistoquímica la infiltración por macrófagos M2 en ambos grupos usando el marcador CD163. A su vez, se ha descubierto que, en las muestras de pacientes en tratamiento, estos colocalizan con las células apoptóticas, mientras que estas últimas son escasas en pacientes sin tratamiento. Dado que una de las funciones principales de los macrófagos consiste en eliminar a las células apoptóticas, se ha evaluado si la fagocitosis de estas células induce la polarización de los macrófagos hacia TAM.

El experimento anteriormente mencionado consiste en lo siguiente:

- Se ha determinado la dosis apropiada de gemcitabina para obtener un aumento de 2 veces en la apoptosis de células las primarias de PDAC Panc354 (TP53 mutadas) y Panc286 (TP53 WT) (Figura 15).
- Se ha utilizado la dosis elegida de 1  $\mu\text{g/ml}$  para inducir células apoptóticas que sucesivamente han sido cocultivadas con macrófagos no polarizados y se ha demostrado que estos últimos fagocitan eficazmente a las células apoptóticas.
- Tras 48 h de coincubación de células apoptóticas con los macrófagos, estos inician un proceso de cambio morfológico, se vuelven más elongados y, al mismo tiempo, empiezan a expresar marcadores de superficie como CD163 y CD206, sugiriendo que se está produciendo una polarización hacia M2.
- La polarización hacia M2 se confirma posteriormente valorando la transcripción de genes como *ACTA1*, *COL1A1*, *COL3A1*, *CTGF*, *LOX*, *LOXL2*, *MMP3*.



**Figura 15. Dosis de gemcitabina o abraxane para inducir la apoptosis óptima (elaboración propia).**

La dosis que se ha utilizado en los experimentos se ha valorado utilizando dosis crecientes de gembitabina y abraxane. Los valores en los que se obtuvo mejor ratio de apoptosis fueron con 10 microgramos/ml de gemcitabina y 10 micromoles de abraxane.

Cabe precisar que se han valorado las características de los macrófagos en cultivo a las 12 horas, evidenciando que solo el 25 % eran CD163+ (y por lo tanto, M2), indicando que, en esta fase, la mayor parte de la población es M1 que, de acuerdo con la literatura, tiene mayor capacidad fagocítica que los M2. Esta

parte del experimento es muy importante, pues implica que la fagocitosis de las células apoptóticas por los macrófagos les confiere las características de los M2.

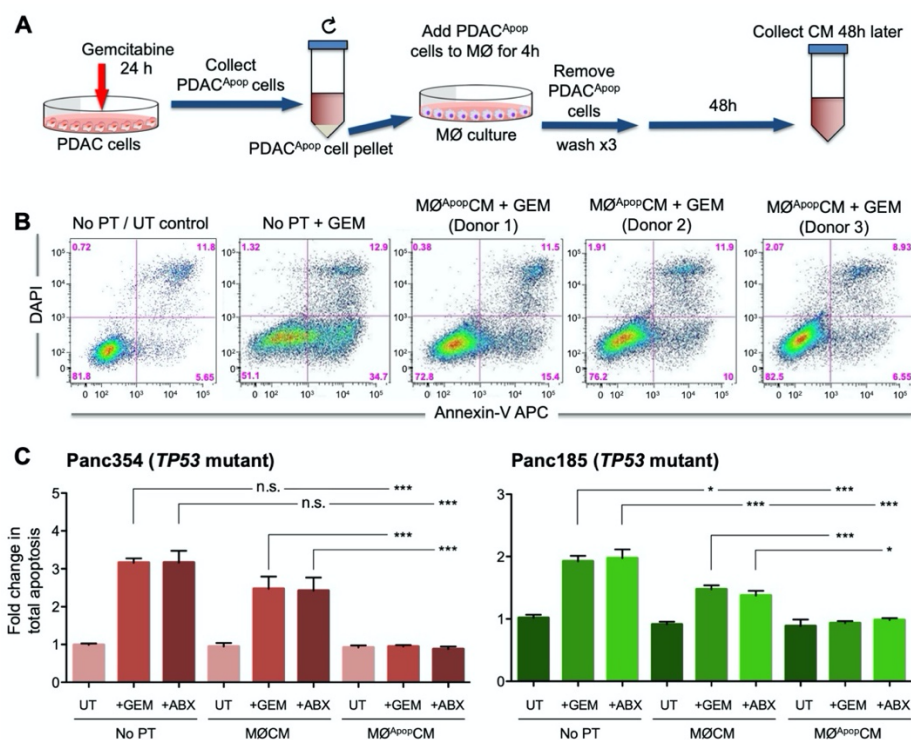
Aunque este resultado se ha obtenido *in vitro*, se podría hipotetizar que durante la quimioterapia se producen células apoptóticas que, del mismo modo, tras ser fagocitadas por los macrófagos, las convierten en M2/TAM.

#### 4.2.2. Promoción de los factores de quimiorresistencia por los macrófagos que fagocitan células apoptóticas

Los siguientes experimentos tenían como objetivo determinar si los macrófagos que adquieren características TAM tras la fagocitosis de células apoptóticas son capaces de secretar factores de quimiorresistencia (Figura 16).

Para desarrollar dicho experimento, el procedimiento fue el siguiente:

- El medio condicionado de los macrófagos que han ingerido células apoptóticas ( $M\emptyset^{Apop}CM$ ) se centrifugó para eliminar las células apoptóticas sobrantes (Figura 16A).
- Se establecieron como controles el medio de cultivo habitual de las células y un medio de macrófagos no expuestos a células apoptóticas ( $M\emptyset CM$ ); además, se utilizó también un control con células PDAC no expuestas a gemcitabina.
- Las células Panc354 fueron cultivadas en los tres diferentes medios y posteriormente fueron tratadas con gemcitabina.
- Se demostró que la apoptosis inducida por gemcitabina en las células Panc354 cultivadas con el medio  $M\emptyset^{Apop}CM$  se reducía al menos 2 veces, así como que la viabilidad de las células aumentaba hasta el nivel de células no tratadas con gemcitabina (Figura 16B-C).
- El experimento se repitió con otras líneas celulares primarias de PDAC, como Panc185 (TP53 Mut) y Panc 286 (TP53 WT), y también con otros estímulos quimioterápicos (abraxane).



**Figura 16. Inducción de resistencia a la quimioterapia en células PDAC tras incubación en medio condicionado de macrófagos que fagocitan células apoptóticas (D'Errico *et al.*, 2019).**

Para producir el MØ<sup>Apop</sup>CM se ha realizado el experimento en (A): se obtuvieron células apoptóticas de PDAC tratándolas durante 24 horas con 10 mg/ml de gemcitabina o 10  $\mu$ M de Abraxane. Las células se recogieron y se sometieron a dos rondas de centrifugación para eliminar las células vivas. Los macrófagos se colocaron con las células apoptóticas producidas durante 4 horas. Como control MØCM, se dejaron macrófagos sin células apoptóticas durante el mismo tiempo. Se procedió a retirar las células apoptóticas, se lavaron los macrófagos para eliminar todas las células apoptóticas de PDAC no fagocitadas y se cultivaron los macrófagos durante otras 24 horas para permitir la acumulación de sustancias secretadas en el medio. El medio de cultivo condicionado (MØ<sup>Apop</sup>CM y MØCM, respectivamente) se recogió y se utilizó para las pruebas de quimiorresistencia: las células de PDAC se cultivaron durante la noche en medio completo RMPI, MØ<sup>Apop</sup>CM o MØCM. Posteriormente, se añadió a todas las condiciones, menos el control, Gemcitabina o Abraxane. En (B) se evidencia por citofluorimetría la cantidad de células vivas en las condiciones experimentales. En (C) se evidencia cómo la apoptosis en MØ<sup>Apop</sup>CM es menor que medio MØCM y medio de cultivo normal, de forma estadísticamente significativa.

Con este experimento demostramos que el MØ<sup>Apop</sup>CM induce quimiorresistencia de forma estadísticamente significativa en células de cáncer de páncreas expuestas a quimioterápicos, aunque el efecto es mucho más marcado en líneas de cáncer de páncreas con TP53 mutado. En la línea con TP53 wt (286) las diferencias solo fueron estadísticamente significativas con el tratamiento con abraxane.

Como se evidencia en este experimento, los macrófagos, tras fagocitar a las células apoptóticas, secretan un(os) factor(es) que aumenta(n) el umbral de la apoptosis en los tratamientos sucesivos.

Asimismo, en este caso se podría hipotetizar que, *in vivo*, tras un ciclo de quimioterapia, se producen células apoptóticas que, tras ser engullidas por los macrófagos, cambian sus características e inducen la producción de factores de quimiorresistencia, aumentando así el umbral de las células tumorales presentes y volviendo cada vez menos eficaz el tratamiento pautado.

#### 4.2.3. Aumento de la sensibilidad a la gemcitabina *in vivo* por la eliminación de los macrófagos

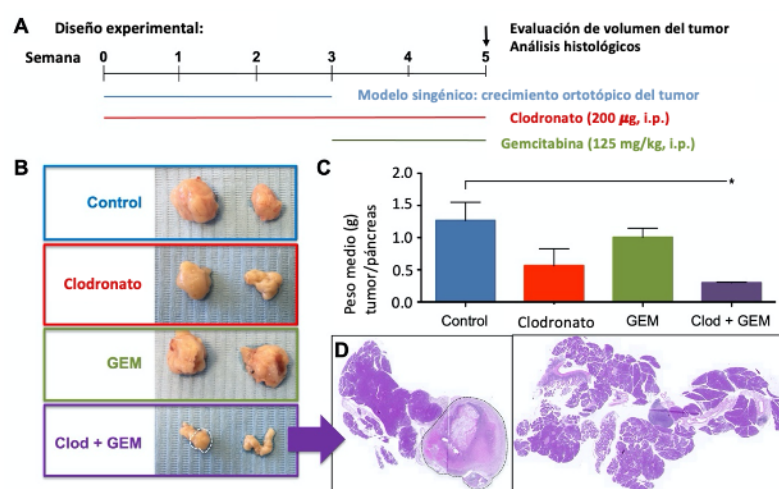
Dado que los resultados *in vitro* son muy relevantes, se decidió analizar qué ocurre *in vivo*.

En la literatura, son varios los experimentos en animales de laboratorio con cáncer de páncreas tratados con gemcitabina en los que se ha evidenciado que este quimioterápico es inefectivo a la hora de erradicar el

tumor. Dado que nuestra hipótesis se basa en la asunción que los macrófagos inducen quimiorresistencia, hemos utilizado el fármaco clodronato para eliminar los macrófagos en modelos de ratón con cáncer de páncreas. Este fármaco, encapsulado en liposomas, es capaz de eliminar los macrófagos pero es incapaz, en monoterapia, de inducir cambios en el tumor de páncreas.

Utilizando la combinación de clodronato para eliminar los macrófagos y gemcitabina como quimioterápico, hemos obtenido una reducción estadísticamente significativa del tamaño del tumor; incluso en un ratón se obtuvo una eliminación completa del tumor (respuesta patológica completa en la jerga de los oncólogos) (Figura 17).

Este experimento demuestra que la eliminación de los macrófagos mejora la eficacia de la gemcitabina *in vivo*, permitiendo incluso una respuesta completa, no observada en los grupos tratados con monoterapia (gemcitabina sola o clodronato solo).

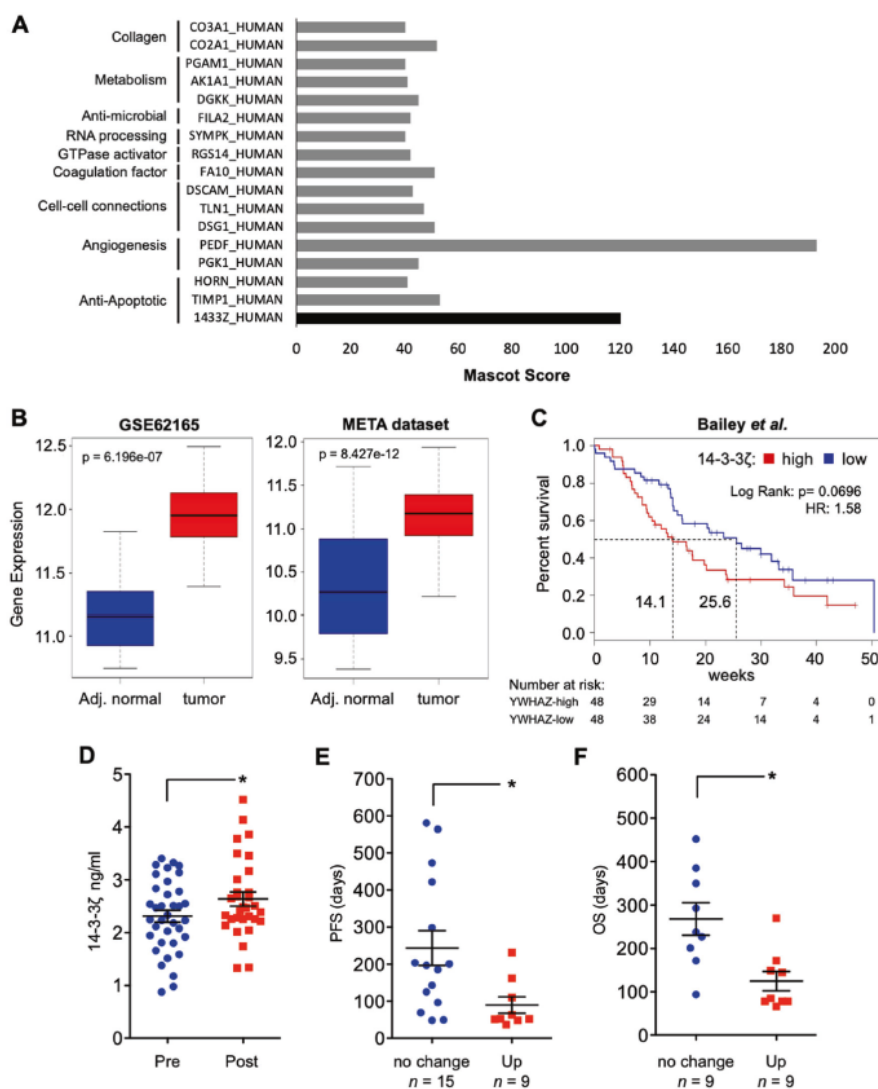


**Figura 17. Aumento de sensibilidad a la gemcitabina *in vivo* tras eliminación de los macrófagos (D'Errico *et al.*, 2019).**

Los ratones con cáncer de páncreas se aleatorizaron para recibir (A) control, clodronato en monoterapia, gemcitabina en monoterapia o la combinación de clodronato más gemcitabina. Tras sacrificar los ratones, se examinaron los tumores, tal y como se observa en (B), tanto de control como con clodronato y gemcitabina en monoterapia. El tamaño tumoral resulta parecido mientras que, en la combinación, el tumor presenta un tamaño menor. En (C) se puede apreciar el diferente tamaño entre el control (azul), el grupo de clodronato (rojo), el de gemcitabina en monoterapia (verde) y el de combinación (morado). En (D) se pueden observar los cambios histopatológicos en el tumor.

La proteína 14-3-3  $\zeta$  es una de las «diferenciales» en el secretoma de  $M\emptyset^{Apop}CM$ .

El siguiente paso implicaba valorar qué factor se encuentra implicado en la inducción de la quimiorresistencia. Para ello, se realizó un análisis proteómico mediante espectrometría de masas del secretoma del  $M\emptyset^{Apop}CM$  para identificar las proteínas diferencialmente presentes respecto al medio  $M\emptyset CM$  y al medio de cultivo habitual de las células o medio control (MC) (Figura 18). Analizando el MASCOT score, una puntuación estadística que se relaciona inversamente con la probabilidad de que la proteína se encuentre por casualidad (cuanto más elevado es el MASCOT score, menor es la probabilidad de que el evento sea casual) se realizó un primer análisis comparando el  $M\emptyset^{Apop}CM$  con el medio control. En primer lugar, eliminamos aquellas proteínas con MASCOT score  $< 60$ . De este análisis se obtuvieron 23 proteínas. Posteriormente se eliminaron las proteínas presentes en el  $M\emptyset CM$  con MASCOT score  $< 40$ , obteniendo finalmente 3 proteínas, YWHAZ/14-3-3 $\zeta$ , inhibidor de metalopeptidasa 1 (TIMP1) y Hornerin (HORN).



**Figura 18. Proteína 14-3-3ζ: (A) proteómica, (B) diferentes expresiones en tejidos normales y tumorales, (C) diferencia en el pronóstico del cáncer, (D) diferencia pre y posquimioterapia, (E) diferencia en SLP y (F) diferencia en SG (D'Errico *et al.*, 2019).** 14-3-3ζ se expresa en  $M\phi^{ApopCM}$  y en muestras humanas de PDAC. a) Análisis proteómico de las proteínas enriquecidas en el secretoma de macrófagos cocultivados con células tumorales apoptóticas ( $M\phi^{ApopCM}$ ). Se muestran las puntuaciones Mascot para cada proteína identificada (eje x) y las funciones putativas (eje y). b) Diagrama de cajas que muestran la expresión diferencial de 14-3-3ζ en muestras de PDAC frente a tejido adyacente normal en dos series independientes de datos transcriptómicos (izquierda: n = 13 ady. normal, n = 118 tumor; derecha: n = 70 normal ady., n = 108 tumor). c) Curva de Kaplan-Meier que muestra la supervivencia global de los pacientes con PDAC, estratificada según el valor medio de la expresión de 14-3-3ζ (n = 96). Se muestra la razón de riesgo (HR) y el número de pacientes en riesgo. d) Cuantificación de los niveles de 14-3-3ζ en el suero de 35 pacientes de PDAC emparejados antes y después de la quimioterapia. Gráficos de dispersión: e) supervivencia libre de progresión (SLP), o f) supervivencia global (SG) de los pacientes sin cambios significativos o con un aumento superior al 15 % (Up) en los niveles de 14-3-3ζ. Significación estadística: \* $p < 0.05$ . PDAC Adenocarcinoma pancreático ductal

La dificultad tanto económica como técnica de realizar experimentos sobre las 3 proteínas conllevó decidir con cuál de las 3 proteínas se debían realizar los experimentos posteriores. La elección recayó sobre la proteína YWHAZ/14-3-3ζ por varias razones aquí resumidas:

- Presenta un MASCOT score elevado (120), indicando que su identificación no era un evento casual.
- Posee un elevado número de *matches* (28) indicando una elevada concentración.
- Esta proteína tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática y entrar en el núcleo celular.
- Existe evidencia en la literatura de que esta proteína presenta características antiapoptóticas.

- Existen evidencias en otros tumores de que existe una relación inversamente proporcional de esta proteína con la supervivencia de los pacientes.

En última instancia, faltaba valorar su expresión *in vivo* en pacientes con cáncer de páncreas y, sobre todo, la relación con la supervivencia global y su aumento tras el tratamiento quimioterápico.

En la literatura no se han encontrado estudios en los que su expresión hubiese sido examinada de forma rigurosa, por lo que se han realizado los siguientes análisis:

- Para valorar su expresión se han utilizado 3 bases de datos de transcriptoma públicamente disponibles [Martinelli *et al.* (2016); Jandaghi *et al.* (2016); Janky *et al.* (2016)] y, como cabía esperar, la expresión de YWHAZ/14-3-3 era más elevada de forma estadísticamente significativa en muestras de pacientes con cáncer de páncreas respecto a individuos sanos o a los pacientes con pancreatitis.
- Para valorar la relación con la supervivencia global, se ha utilizado la serie de pacientes de Bailey *et al.* (2016) en la que se observó una disminución de la supervivencia global en pacientes con alta expresión de la proteína comparado con los de baja expresión, aunque no estadísticamente significativa.
- Finalmente, mediante la técnica ELISA, se examinaron los niveles de la proteína YWHAZ/14-3-3 $\zeta$  en el suero de 34 pacientes obtenidos antes y después de la quimioterapia. Se evidenció un aumento de la proteína tras la quimioterapia y una relación entre el nivel de la proteína y la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG).

Resumiendo, la proteína YWHAZ/14-3-3 $\zeta$  se había encontrado de forma diferencialmente presente en el medio de MØApopCM (<sup>^^</sup>), presentaba una buena calidad en la proteómica, un mecanismo de acción compatible con nuestra hipótesis y una literatura en que se evidenciaba tanto su presencia en pacientes con cáncer de páncreas como un aumento de la proteína tras el tratamiento quimioterápico, y una relación directa con los criterios de eficacia del mismo tratamiento (SG y SLP). Por lo tanto, la proteína YWHAZ/14-3-3 $\zeta$  se eligió para realizar los experimentos posteriores.

#### 4.2.4. Promoción de la quimiorresistencia en las PDAC por YWHAZ/14-3-3 $\zeta$

Dado que nuestros experimentos han demostrado que el MØ<sup>Apop</sup>CM induce quimiorresistencia en la línea primaria de PDAC Panc354, se han utilizado estas células para los estudios sucesivos.

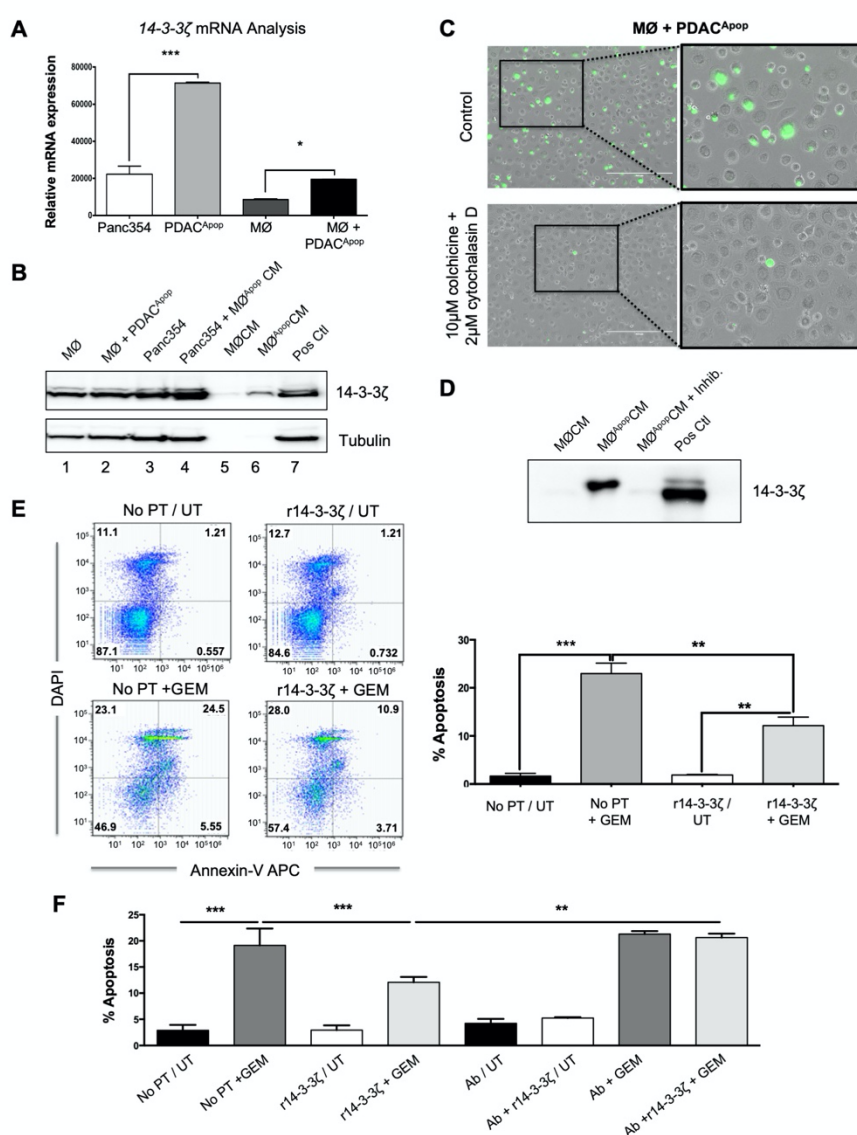
En primer lugar, se ha valorado la expresión de 14-3-3 $\zeta$  en las células PDAC, en la que se ha observado que los niveles de ARN mensajero (RNAm) de la proteína en estas células son elevados de forma basal y que aumentan cuando se induce apoptosis. También se han evaluado los niveles de RNAm en los macrófagos, demostrando que aumentan cuando están expuestos a células apoptóticas mientras que, a nivel de proteína, esta no aumenta desde el punto de vista intracelular.

Esta observación concuerda con nuestra hipótesis de que la fagocitosis de células apoptóticas por parte de los macrófagos induce la secreción de la proteína: en efecto, el RNAm (y no la proteína) aumenta en las PDAC, especialmente cuando inician el proceso de apoptosis. Además, en los macrófagos que fagocitan células apoptóticas, también aumenta el RNAm pero no la proteína intracelular, dado que esta se secreta al medio (como ha evidenciado la proteómica).

Para confirmar que la proteína es secretada por los macrófagos en respuesta a la fagocitosis de células apoptóticas, inhibimos la fagocitosis mediante colchicina y citocalasina D. Mediante este ensayo comprobamos que los niveles de secreción de 14-3-3 $\zeta$  disminuyen de forma estadísticamente significativa al inhibir la fagocitosis.

Una vez confirmado que la proteína 14-3-3 $\zeta$  se secreta en respuesta a la fagocitosis de células apoptóticas por parte de los macrófagos, hemos utilizado la proteína recombinante y determinado la respuesta a la quimioterapia de las células PDAC tratadas demostrando que las células incubadas con 14-3-3 $\zeta$  recombinante presentaban una mayor quimiorresistencia (Figura 19).

Posteriormente se realizó un experimento, siempre utilizando las células PDAC incubadas con un anticuerpo policlonal contra la proteína 14-3-3 $\zeta$  para inhibir su efecto, obteniendo como resultado una abolición de la quimiorresistencia y demostrando por tanto su posible efecto terapéutico.



**Figura 19. Inducción de quimiorresistencia promovida por 14-3-3 $\zeta$  (D'Errico *et al.*, 2019).**

La 14-3-3 $\zeta$  promueve la quimiorresistencia del PDAC. **a)** Análisis de RTqPCR de los niveles de expresión de ARNm relativos a 14-3-3 $\zeta$  en células Panc354, células Panc354 apoptóticas (PDAC<sup>Apop</sup>), MØ no pretratados o MØ incubados durante 4 h con PDAC<sup>Apop</sup>. Los niveles de expresión de ARNm de cada gen diana están normalizados con respecto a los niveles de  $\beta$ -actina (n = 4 muestras por grupo). **b)** Expresión de 14-3-3 $\zeta$ , detectada por Western blot, en lisados totales de MØ no pretratados, MØ incubados durante 4 h con PDAC<sup>Apop</sup>, células Panc354 o células Panc354 tratadas durante 24 h con MØ<sup>Apop</sup>CM, o en CM concentrado de MØ no pretratados (MØCM) o MØ incubados durante 4 h con PDAC<sup>Apop</sup> (MØ<sup>Apop</sup>CM). Para el control de carga se utilizó tubulina. Para el control positivo (Pos Ctl) se

utilizó el lisado total de células Raji. Blot representativo de dos experimentos independientes. **c)** Micrografías representativas de luz e inmunofluorescencia superpuestas de cultivos de MØ incubados durante 4 h con células PDAC<sup>Apop</sup> teñidas con PKH67 en presencia o ausencia de inhibidores de la fagocitosis (10  $\mu$ M de colchicina + 2  $\mu$ M de citocalasina D). **d)** Expresión de 14-3-3 $\zeta$ , detectada por Western blot, en CM concentrado de MØ no pretratados (MØCM) o MØ incubados durante 4 h con PDAC<sup>Apop</sup> (MØ<sup>Apop</sup>CM) con o sin inhibidores de fagocitosis (Inhib). Para el control de carga se utilizó tubulina. Para el control positivo (Pos Ctl) se utilizó el lisado total de células Raji. **e)** Análisis (citometría de flujo) representativo de la tinción con Anexina-V en células Panc354 48 h después del tratamiento con GEM. Las células no fueron pretratadas (No PT) o bien lo fueron con r14-3-3 $\zeta$  durante 6 h antes de la provocación con o sin 1  $\mu$ g/ml (UT) de GEM. Se muestran las estrategias de establecimiento de ventanas (izquierda). Cuantificación de la apoptosis total (derecha). Media de dos experimentos independientes. **f)** Cuantificación de la apoptosis total en células Panc354 48 h después del tratamiento con GEM. Las células no fueron pretratadas (No PT) o bien lo fueron durante 6 h con r14-3-3 $\zeta$  solo, un anticuerpo anti-14-3-3 $\zeta$  (1  $\mu$ g/ml) o una combinación de ambos antes de la provocación con o sin 1  $\mu$ g/ml (UT) de GEM. Media de dos experimentos independientes (n = 3 muestras/experimento). Significación estadística: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001. PDAC Adenocarcinoma pancreático ductal

#### 4.2.5. Inducción de quimiorresistencia por la proteína 14-3-3 $\zeta$ mediante la vía de señalización de AXL

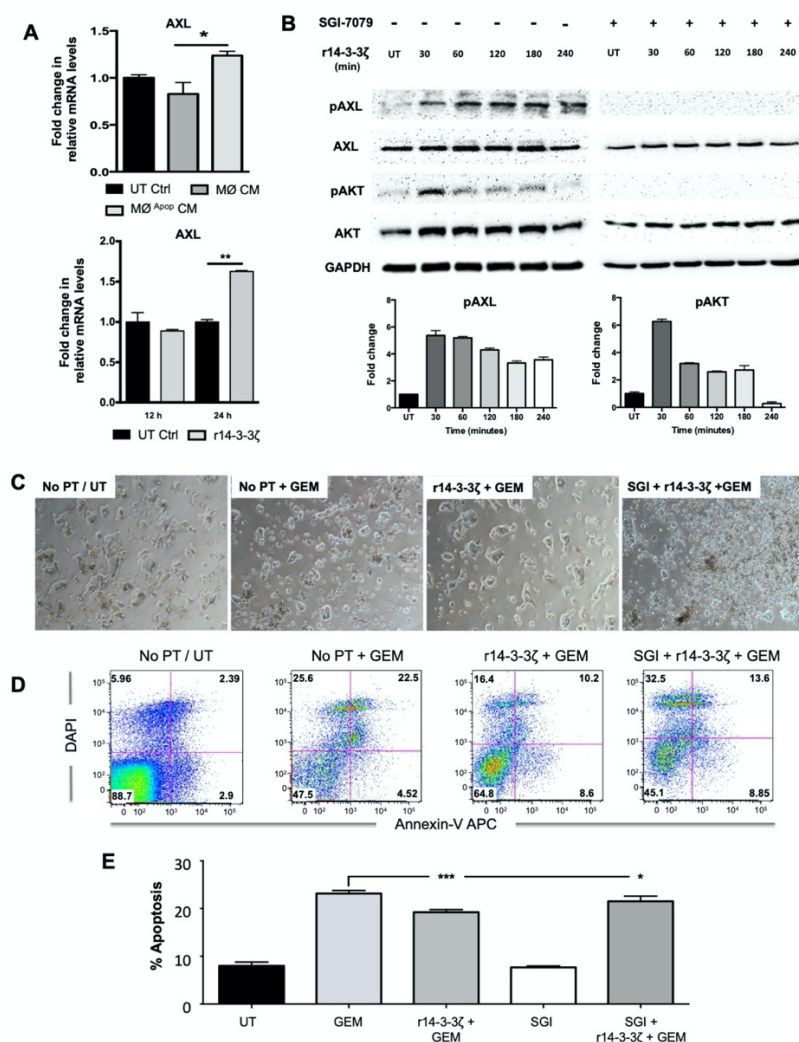
En la literatura se conocen más de 100 proteínas relacionadas con 14-3-3 $\zeta$ . Reichl *et al.* (2015) recientemente han demostrado que el receptor tirosina-quinasa AXL se une a 14-3-3 $\zeta$  y que esta interacción es necesaria para la activación de la cascada de señalización mediada por AXL, que incluye entre otros eventos la inducción de la quimiorresistencia.

A continuación, cuantificamos la expresión de AXL en células PDAC tratadas con MØ<sup>Apop</sup>CM y r14-3-3 $\zeta$ , obteniendo en ambos casos un aumento del ARNm de AXL (Figura 20, A-B).

Además, se ha demostrado que la proteína recombinante 14-3-3 $\zeta$  induce la fosforilación de AXL y de AKT (un mediador esencial en la cascada de AXL). La fosforilación de AXL y AKT a su vez induce la expresión de varias proteínas implicadas en supervivencia celular.

Tras valorar estos efectos sobre la vía de señalización de AXL, se realizó un experimento utilizando un inhibidor de la fosforilación de AXL (SGI-7070), obteniendo como resultado una pérdida en la capacidad de r14-3-3 $\zeta$  de inducir quimiorresistencia a la gemcitabina (Figura 20, C-D).





**Figura 20. Resistencia a la apoptosis mediada por la proteína 14-3-3ζ recombinante (D'Errico *et al.*, 2019).**

La 14-3-3ζ promueve la quimiorresistencia a través de la activación de las vías de supervivencia mediadas por AXL. **a**) Análisis de RTqPCR de los niveles relativos de expresión de ARNm de Axl en las células Panc354 sin tratamiento (UT Ctrl), con tratamiento con MØCM o MØ<sup>Apop</sup>CM durante 24 h (zona superior), o con tratamiento con 4 μg/ml de r14-3-3ζ durante 12 o 24 h (zona inferior). Los niveles de expresión de ARNm están normalizados con respecto a los niveles de β-actina, y los datos se representan como tasas de cambio respecto del UT control (fijado en 1,0). n = 4 muestras por grupo. Significación estadística: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01. **b**) Expresión de p-Axl, Axl total, p-AKT o AKT total, detectada por Western blot, en lisados totales de células Panc354 sincronizadas tratadas durante los minutos indicados con r14-3-3ζ en presencia o ausencia o SGI-7079 (1 μM). Para el control de carga se utilizó GAPDH (zona superior). Tasas de cambio en los niveles de fosfoproteínas, determinados por análisis densitométrico de dos experimentos repetidos (zona inferior). **c**) Micrografías de luz representativas, **d**) análisis (citometría de flujo) representativo de la tinción de Anexina-V, y **e**) cuantificación de la apoptosis total en células Panc354 48 h después del tratamiento con GEM. Las células: 1) no fueron pretratadas (No PT), o bien 2) lo fueron con r14-3-3ζ durante 6 h, o 3) con SGI-7079 (SGI; 1 μM) durante 5 h, o 4) con SGI (1 μM) durante 5 h seguido de r14-3-3ζ durante 6 h antes de la provocación con o sin 1 μg/ml (UT) de GEM. Media de tres experimentos independientes (n = 3 muestras/experimento). Significación estadística: \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001

#### 4.2.6. Potenciación de la eficacia de la gemcitabina *in vivo* mediante la inhibición de AXL

La activación de la vía de señalización de AXL aumenta la capacidad de proliferación y el potencial de producir metástasis en varios tipos de cánceres, también en células PDAC. Esta vía de señalización ha demostrado tener un papel muy importante en la plasticidad celular, las metástasis y la quimiorresistencia. Basándonos en nuestros resultados que vinculan la vía de señalización de 14-3-3ζ y AXL con la quimiorresistencia en cáncer de páncreas, hemos realizado un experimento *in vivo* en el que hemos tratado ratones modelo de cáncer de páncreas, los ratones KPC, con gemcitabina, SGI-7079 (inhibidor de AXL) o una combinación de ambos.

Los resultados han demostrado cómo el tratamiento combinado produce una profunda disminución de la masa tumoral en la mayoría de los ratones, llegando incluso en dos de ellos a experimentar una respuesta patológica completa (de forma parecida a lo que ocurre en los ratones en los que se eliminan los macrófagos). Otro resultado muy prometedor, utilizando el bloqueo de la vía de AXL mediado por SGI-7079, ha sido la reducción de las metástasis, confirmando así una conexión entre AXL y la transición epitelio-mesénquima.

### 4.3. Los macrófagos en la resistencia al tratamiento con inmunoterapia

Tal y como se ha observado al inicio de la presente tesis doctoral, los nuevos fármacos inmunoterápicos, también conocidos como «inhibidores de *checkpoints*», dado que bloquean el *checkpoint* PD1-PDL1, solo funcionan en el caso de los tumores «calientes», aquellos que presentan una mayor infiltración del sistema inmune.

Hasta la fecha, el factor predictivo de respuesta para estos fármacos es el PDL-1, suponiendo que, cuanto mayor sea el PDL-1, mejor resultará la respuesta con los fármacos inhibidores de este *checkpoint*.

Sin embargo, se está demostrando que el PDL-1 no comprende un factor predictivo de respuesta fiable al observarse pacientes PDL-1 negativos que, al contrario de lo que se esperaría, presentan una buena respuesta al tratamiento.

Se mantiene la opinión de que el PDL-1 presenta algunas características intrínsecas que lo hacen poco fiable a la hora de utilizarlo como factor predictivo de respuesta al tratamiento:

En primer lugar, la expresión de PDL-1 cambia con el tiempo; por lo tanto, según el momento en que realicemos la biopsia al paciente, obtendremos unos valores de PDL-1 diferentes a los que se observaron cuando empezamos el tratamiento. Además, durante el mismo tratamiento, este valor irá cambiando y resulta inviable hacer un seguimiento a tiempo real durante todo el proceso.

Los niveles de PDL-1 reflejan el estado de activación de la respuesta inmune. Como se ha observado al inicio de la presente investigación, la activación de la respuesta inmune y la secreción de IFN- $\gamma$  estimulan la producción de PDL-1; no obstante, existen también otros factores que puede hacer que se obtengan niveles de PDL-1 elevados sin activación de la respuesta inmune o con baja activación del mismo.

Las muestras necesarias para identificar los niveles de PDL-1 son difíciles de obtener. La biopsia líquida no es suficiente, puesto que se precisa de gran cantidad de material y de anticuerpos para valorarlo.

Sabemos por la inmunología básica, que las células «sensoras» de sistema inmune, como los macrófagos y las células dendríticas, pueden estar en una configuración proinflamatoria (macrófagos M1 y células dendríticas activadas) o antiinflamatoria (macrófagos M2 o células dendríticas alternativamente activadas), siendo más eficaz e intensa la respuesta inmune en el primer caso. También las células efectoras como los linfocitos pueden estar en una configuración activada (Cd8+) o supresora o reguladora (Treg). Según nuestra hipótesis, si estos tres tipos celulares presentan una conformación activada (mayor ratio de macrófagos M1, células dendríticas inflamatorias y linfocitos Cd8+), la respuesta al tratamiento con inmunoterapia debería ser mejor y esta sería independiente de los niveles de PDL-1.

### 4.4. Estudio INFLAMED

En nuestro proyecto se pretendía realizar un estudio global sobre estas células, analizando tanto las que favorecen la actividad del sistema inmune (M1, CD8+, células dendríticas activadas) como las que lo inhiben (M2, Treg, células dendríticas alternativamente activadas), dada la presunción de que para que la

respuesta a la inmunoterapia sea efectiva, las primeras deberían estar presentes en mayor proporción que las segundas.

Con los resultados obtenidos del análisis por cotillearía de flujo, se dividieron los pacientes en tres grupos: ALTO, MEDIO Y BAJO IR que, como ya se ha comentado, se determinará por un sistema de percentil, en el que el percentil del 1 al 33 % será *low*, el del 34 al 66 % será *medium* y el del >66 será *high*.

Posteriormente, se evaluó la respuesta al tratamiento inmunoterápico por medio de las pruebas de evaluación solicitadas de acuerdo con el protocolo clínico habitual, determinando si, estadísticamente, los pacientes con ratio elevado presentan mejor respuesta al tratamiento en comparación con los pacientes con ratio bajo. Se han determinado tantos criterios de inclusión como de exclusión que se detallan a continuación:

#### Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años.
- Pacientes que presenten enfermedad metastásica y medible por los criterios RECIST 1.1.

#### Criterios de exclusión

- Pacientes que presenten enfermedades autoinmunes diagnosticadas, aunque estén controladas mediante medicación.
- Pacientes que estén en tratamiento con fármacos inmunomoduladores (incluyendo corticoides a dosis > 10 mg/día de prednisona o equivalentes).
- Pacientes que presenten insuficiencia adrenal no controlada.
- Pacientes que hayan recibido líneas previas de tratamiento con inmunoterapia.
- Pacientes en los que la reevaluación por pruebas de imagen muestre un cambio en la respuesta al tratamiento (cualquier cambio en la progresión, como pasar de enfermedad estable a respuesta parcial o completa).

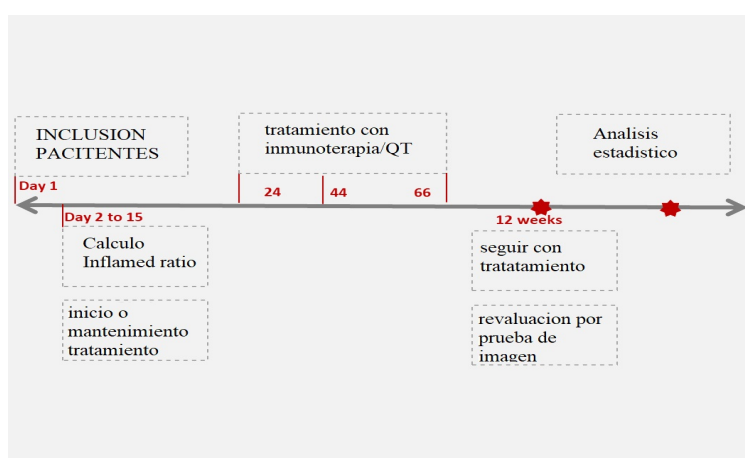


Figura 21. Cronograma del estudio INFLAMED (elaboración propia).

Hasta la fecha, tal y como se ha comentado, debido a los problemas derivados de la pandemia y la dificultad de utilizar inmunoterapia en pacientes con cáncer de páncreas, solo ha resultado posible incluir un paciente en este estudio. Por estos motivos, se decidió incluir otros tumores digestivos y no solo cáncer de páncreas, que esperamos poder añadir a este proyecto en los próximos meses para tener un número satisfactorio de pacientes.

De momento, aunque obviamente el número de paciente incluidos no resulta estadísticamente significativo, sí se ha encontrado un resultado muy prometedor:

El paciente incluido presenta un IR alto y actualmente presenta una supervivencia global, pese a ser un cáncer de páncreas en tercera línea con inmunoterapia en uso compasivo (Nivolumab), muy superior a lo esperable (actualmente el paciente sigue vivo y por lo tanto cuenta con una supervivencia global al menos superior a 2 años).

## V. DISCUSIÓN

Como ya se ha comentado previamente, el cáncer de páncreas es, parafraseando a Siddhartha Mukherjee, el «emperador de todos los males». Supone un reto complicado para los oncólogos; se trata de una enfermedad desalentadora para los pacientes y una frustración para los investigadores, dado que en los últimos años se han realizado muy pocos avances.

Como decía Albert Einstein, «si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo». Hasta ahora, nos hemos fijado en cómo es el cáncer de páncreas a nivel morfológico y fisiológico. En los tumores de PDAC se observa un microambiente en el cual las células tumorales representan un pequeño porcentaje de la masa tumoral y dicha observación ha sido la base de nuestro trabajo. Partiendo de esta base, hemos intentado realizar una revolución copernicana: Copérnico impulsó una de las mayores revoluciones de la historia afirmando que no era el sol el que giraba alrededor de la tierra, si no lo contrario, abriendo el camino a conocimientos fundamentales para la evolución humana. Nosotros, a pequeña escala, queremos proponer una revolución en el tratamiento del cáncer de páncreas: los problemas no giran solo alrededor de la célula pancreática, sino que las responsables de una gran parte del problema son las células que giran alrededor del tumor.

Para explicar nuestra hipótesis sobre la transformación neoplásica y discutir los resultados obtenidos en esta tesis, pongamos como ejemplo la triste evolución de una persona sana a un paciente con cáncer de páncreas metastásico. Recordemos que actualmente la fisiopatogénesis del cáncer se entiende como un mecanismo estocástico, centrado exclusivamente en la célula tumoral y sin regulación por retroalimentación o interacción con las células que la rodean. Nosotros hemos demostrado que la apoptosis responde a un control por retroalimentación que implica a todas las células en su conjunto y que, a consecuencia de estos hallazgos, no se puede considerar como un proceso estocástico.

Cocultivando células apoptóticas con macrófagos, hemos obtenido un medio condicionado que es capaz de inhibir la apoptosis en otras células incubadas con dicho medio. Gracias a estos resultados, podemos inferir que los macrófagos, tras fagocitar a las células apoptóticas, secretan factores que aumenta el umbral de la apoptosis en otras células del microambiente. En vista de estos resultados, proponemos la existencia de un mecanismo que reconoce que existe apoptosis en el microambiente y que esta, a su vez, se regula por retroalimentación. Este mecanismo explicaría porqué tras una primera exposición a factores proapoptóticos, como pueden ser tóxicos ambientales o quimioterapias, se produce una menor respuesta a la inducción de la apoptosis en las exposiciones sucesivas.

Poniendo como ejemplo un paciente en el que se ha producido una transformación neoplásica en su páncreas, vemos la sucesión de eventos que se producirían de acuerdo con nuestra hipótesis comparada con lo que se pensaba hasta ahora. Por ejemplo, pongamos un caso hipotético de un sujeto sano que empieza a tomar niveles elevados de alcohol (nuestro factor tóxico en este caso). Este factor tóxico, además de ser mutagénico, produce apoptosis tanto en células hepáticas como pancreáticas. Las células expuestas pueden sufrir apoptosis o, por el contrario, acumular mutaciones de forma estocásticas que pueden cambiar la respuesta de las células incrementando la liberación de factores prosupervivencia y disminuyendo la respuesta a factores proapoptóticos, generando así a una célula tumoral que poco a poco dará lugar al cáncer. Considerando que las células tumorales en algunos casos presentan hasta diez mil mutaciones y que estas tienen que ser específicas en genes determinados, se entiende que la probabilidad de que aparezca una célula tumoral es realmente baja, sobre todo si además tenemos en cuenta que existe un control para que las células con muchas mutaciones o con proteínas alteradas se eliminen por apoptosis.

Llama la atención que, en nuestro organismo, donde casi todo se encuentra estrictamente regulado, se deje al azar un proceso tan importante como la apoptosis, por el cual tanto un exceso como un defecto en su función puede generar daños y enfermedades letales. Algunos ejemplos de procesos regulados por

retroalimentación son, por ejemplo, la regulación del apetito mediante la leptina, la secreción hormonal (mediada por el eje hipotálamo-hipófisis-glándula) o la regulación del sistema inmune.

Partiendo de los resultados obtenidos en esta tesis, podríamos asumir que lo que ocurre es algo parecido lo siguiente:

Utilizando el mismo ejemplo ya mencionado, el sujeto se expone a sustancias tóxicas, el alcohol. Este produce alteraciones en las células del páncreas que conducen a la apoptosis o a la acumulación de mutaciones. Pongamos un ejemplo con números sencillos. Supongamos que, con la primera ingesta de alcohol, en su páncreas, que contenía 1000 células, se produce una apoptosis tal que quedan 900 células. Dado que todas las que han sufrido daño en el ADN mueren por apoptosis, de momento no hay ninguna célula con mutaciones. Si los resultados observados en este trabajo de tesis doctoral se reproducen en células normales *in vivo*, los macrófagos engullirían a las células apoptóticas y secretarían factores que aumenten el umbral de la apoptosis en las 900 células restantes del páncreas.

Si el sujeto sigue ingiriendo alcohol, dado que ha aumentado el umbral apoptótico, esta vez solo mueren 50 células pero a expensas de que se salven células con mutaciones. Si el sujeto continúa ingiriendo alcohol, dado que el umbral de apoptosis sería todavía más elevado, solo morirían 20 células, pero las que sobreviven siguen acumulando cada vez más mutaciones que finalmente pueden llegar a dar lugar a una célula neoplásica.

Bien es cierto que nuestros experimentos se han realizado *in vitro* en células tumorales, pero concordaría y explicaría de forma lógica lo que observamos en clínica sobre la formación de tumores. Vemos tumores que se inician con una frecuencia más elevada de lo esperado e incluso en pacientes jóvenes, pese a que estadísticamente la probabilidad de obtener la cantidad de mutaciones necesarias en una misma célula para convertirla en neoplásica es muy baja. Estos resultados también explicarían la frecuencia de casos de cáncer observados en pacientes con factores de riesgo como la pancreatitis, donde se produce una elevación de la apoptosis.

Aunque para poder afirmar que la transformación neoplásica se deba al mecanismo propuesto en este trabajo doctoral faltarían todavía muchos estudios, sobre todo en células no tumorales, es decir, normales, y mediante estudios *in vivo*; los resultados obtenidos abren la posibilidad de que la transformación tumoral no sea un evento estocástico como se venía pensando hasta el momento. Esta nueva concepción del proceso neoplásico no solo supondría un cambio semántico sino que, si de verdad se encontrara un mecanismo molecular no estocástico en la base de la transformación tumoral, ello supondría una revolución al poder contar con una diana terapéutica para investigar fármacos que inhibieran este mecanismo molecular, logrando así frenar o disminuir la incidencia cada vez más elevada de esta enfermedad.

A nivel clínico, a partir de que la primera célula se ha transformado en una célula neoplásica, podríamos considerar a nuestro sujeto como un paciente, pero probablemente al que no se le hayan realizado todavía pruebas de diagnóstico. Dado que las fases tempranas de la enfermedad son probablemente muy oligosintomáticas, la persona no acudirá al médico y no se le realizarán pruebas por lo que, desafortunadamente, como ya vimos en la introducción, lo más probable es que el diagnóstico se realice en fases ya tardías. Durante el tiempo que ha transcurrido entre el inicio de la transformación tumoral y la aparición de la de metástasis, han ocurrido varios procesos, algunos de los cuales están bien documentados en la literatura y hemos resumido más arriba. En nuestro trabajo nos hemos focalizado en descubrir cómo las células tumorales pueden, desde el páncreas, pasar al torrente sanguíneo y superar todos los mecanismos de control.

Los experimentos realizados demuestran cómo en la sangre periférica de pacientes con PDAC podemos localizar células tumorales unidas a macrófagos M2 y cómo la presencia de estas células fusionadas, o macrocélulas, resulta prácticamente nula en los sujetos sanos, no presentan diferencias significativas en los

sujetos con cáncer no metastásico y, sin embargo, muestran niveles significativamente elevados en los pacientes metastásicos.

Aunque este estudio ha sido realizado de forma prospectiva en un número limitado de pacientes debido a la baja disponibilidad de muestras y que, además, solo se han tenido en cuenta los resultados de aquellos pacientes de los que se disponía de información respecto a la presencia o ausencia de metástasis en el momento del análisis, los resultados narrados abren la puerta a la posibilidad de realizar nuevos estudios prospectivos para valorar si la biopsia líquida con nuestro sistema de análisis podría resultar una herramienta diagnóstica para que los pacientes con cáncer de páncreas sean diagnosticados de forma más precoz. Además, podría ayudar a decidir si un paciente es candidato o no a cirugía, dado que esta supone un problema actual en esta patología por la alta agresividad del procedimiento y la elevada morbi-mortalidad en pacientes que realmente no se benefician de la cirugía por ser ya metastásicos, aunque sus metástasis no habían sido detectadas todavía en las pruebas de imagen.

Los problemas éticos que suponen no operar a una persona cuando potencialmente es el único tratamiento curativo son muy elevados. Valorando la especificidad de nuestra técnica, cabría la posibilidad de realizar un estudio prospectivo en los pacientes previo a la cirugía y permitiría la estratificación de esos pacientes en función de los resultados de «biopsia líquida+» (detección por encima de un umbral determinado de células tumorales fusionadas a macrófagos M2) o «biopsia líquida-» (detección por debajo de dicho umbral). Si efectivamente existe una elevada tasa de pacientes que al tener biopsia + presentan recaídas muy precoces tras la cirugía, probablemente debería tomarse en cuenta este factor en la decisión clínica.

Continuando con la evolución de un sujeto sano a un paciente enfermo de cáncer de páncreas, ahora llegamos al punto en el que, teniendo el paciente metástasis, el tratamiento quirúrgico se descarta y se inicia el tratamiento quimioterápico. Como hemos visto en la introducción, los dos tratamientos utilizados son gemcitabina-abraxane o FOLFIRINOX. En nuestros experimentos hemos utilizado como quimioterápicos gemcitabina y abraxane.

Imaginemos ahora que el oncólogo prescribe al paciente gemcitabina y abraxane con esquema día 1-8-15 cada 28 días, es decir, que el paciente recibe las dosis de quimioterapia un día a la semana, tres semanas consecutivas, dejando un descanso en la cuarta semana. Tras tres meses de tratamiento, se realiza el primer Tc Body (TC tórax abdomen y pelvis) de control para valorar la evolución de la enfermedad.

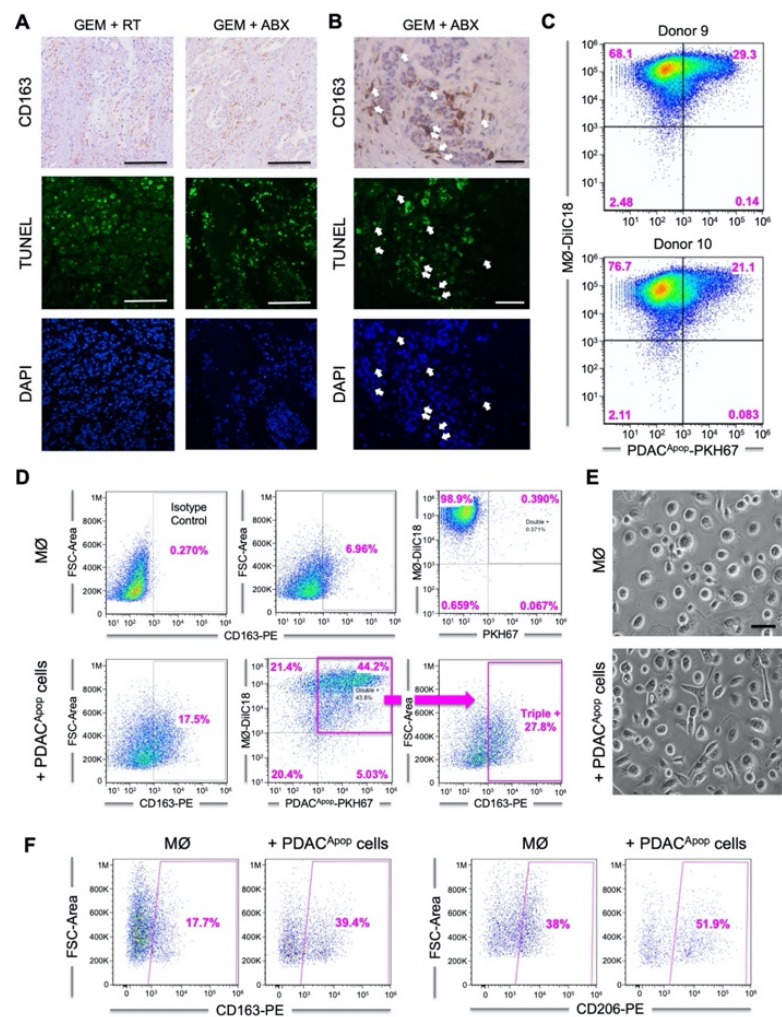
En un porcentaje lamentablemente demasiado elevado (>60 %), ya en la primera reevaluación por TC, se observa que la enfermedad no responde al tratamiento, probablemente debido a que las células PDAC son intrínsecamente resistentes a los quimioterápicos administrados. Aproximadamente un 30 % de los pacientes sí responde al tratamiento pero, desafortunadamente, conforme se avanza en la administración de este, la quimioterapia deja de funcionar. En nuestros experimentos nos hemos focalizado sobre este punto, cuando la quimioterapia deja de ser efectiva. Imaginemos que nuestro hipotético paciente presenta una respuesta al tratamiento durante los primeros 3-6 meses para luego iniciar una lenta fase en la que las células tumorales se vuelven cada vez más resistentes hasta que los tratamientos son claramente ineficaces. En esta situación, se suele cambiar el fármaco quimioterápico y se inicia la segunda línea de tratamiento. Pese a este cambio, la supervivencia global no suele llegar a los 6 meses posteriores al inicio de la segunda línea, con lo que la supervivencia global desde el diagnóstico, por lo general, no llega a superar los 11 meses.

Hasta la fecha, la explicación más aceptada en la comunidad científica era que existe una parte de células tumorales que son intrínsecamente resistentes al quimioterápico administrado y que, por presión selectiva al matar las células sensibles, al cabo de un tiempo más o menos corto, pasan a formar la mayor parte de las células de la masa tumoral. Esta es la razón por la que normalmente se suele dar una segunda línea de tratamiento; sin embargo, la experiencia clínica nos dice que las segundas líneas, en casi la totalidad de los

casos, son menos eficaces que las primeras. Por lo tanto, la explicación de la presión selectiva por sí sola no es resulta para explicar este fenómeno.

Con estos experimentos hemos abierto el camino hacia una nueva explicación de este fenómeno que se basa en una regulación por retroalimentación negativa de la apoptosis que consiste en lo siguiente: los quimioterápicos como gemcitabina y/o abraxane inducen apoptosis en las células de PDAC y los macrófagos proceden a su eliminación. Este proceso conlleva la producción y secreción de uno o varios factores que inhiben, o al menos reducen, la capacidad de los quimioterápicos de inducir apoptosis en las células restantes y volviendo a su vez a las células PDAC expuestas a estos factores, más resistentes a los fármacos antineoplásicos. Como se puede ver en la Figura 22 más abajo, las células PDAC cultivadas en el medio de macrófagos que previamente han fagocitado células apoptóticas, al ser expuestas a un tratamiento quimioterápico, presentan niveles de apoptosis parecidos a los de las células no expuestas a quimioterápicos.

Extrapolado a lo que ocurriría *in vivo*, cuando el paciente recibe un tratamiento con quimioterapia, se producirían muchas células apoptóticas y estas serían fagocitadas por los macrófagos que secretarían factores antiapoptóticos que actuarían sobre las restantes células PDAC del paciente, volviéndolas más resistentes al siguiente ciclo de quimioterapia. Conociendo la existencia de este proceso, se hace fundamental encontrar el mecanismo de acción que lo produce para poder dirigir terapias para inhibir este proceso. En la actualidad, la mayoría de los tratamientos empleados en la lucha contra el cáncer, y especialmente en el de páncreas, se basan en la inducción de apoptosis en las células tumorales.



**Figura 22. Regulación de la polarización de macrófagos por parte de las células apoptóticas (D'Errico *et al.*, 2019).**

Apoptosis de las células de PDAC y condicionamiento de macrófagos. **a)** Expresión de CD163 (marcador TAM), *terminal deoxynucleotide transferase dUTP nick-end labeling* (TUNEL) y DAPI en muestras FFPE de PDAC de pacientes tratados con



Gemcitabina (GEM) más radioterapia (RT) o GEM más Abraxane (ABX). Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ . **b)** Expresión de CD163, TUNEL y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en cortes seriados FFPE de pacientes tratados con GEM más ABX. Las flechas muestran la colocalización. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ . **c)** Análisis (citometría de flujo) de cultivos de macrófagos (MØ) de  $n = 2$  donantes diferentes incubados durante 4 h con células apoptóticas de PDAC (PDAC<sup>Apopt</sup>). Las células PDAC<sup>Apopt</sup> se marcaron con PKH67 y los MØ se marcaron con DilC 8 h después de la coincubación. **d)** Análisis (citometría de flujo) de cultivos de macrófagos (MØ) ( $n = 1$ ) incubados durante 4 h con células PDAC apoptóticas (PDAC<sup>Apopt</sup>). Las células PDAC<sup>Apopt</sup> se marcaron con PKH67 y los MØ se marcaron con DilC y se tiñeron adicionalmente para CD163 8 h después de la coincubación. **e)** Micrografías de luz de MØ y MØ incubados con células PDAC<sup>Apopt</sup> durante 4 h ( $n = 1$ ). **f)** Análisis (citometría de flujo) de la expresión de la superficie celular de CD163 y CD206 para los MØ mostrados en el panel (e). Todas las ventanas electrónicas (*gates*) de la citometría se establecieron a partir de controles isotipo. PDAC Adenocarcinoma pancreático ductal, TAM Macrófago asociado a tumores

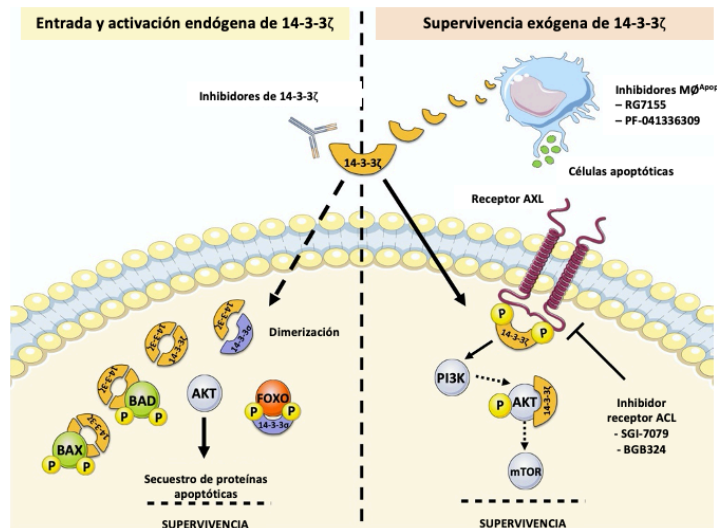
Para dilucidar el factor que puede estar detrás de este mecanismo se ha realizado un análisis proteómico para valorar qué factor o factores son los responsables de inducir esta quimiorresistencia. Se han encontrado varias proteínas expresadas en el medio condicionado de macrófagos que han fagocitado células apoptóticas; entre estos factores, el que se consideró que cumplía mejor con los requisitos para ser responsable de la quimiorresistencia inducida era la proteína 14-3-3Z. Las razones de esta elección son varias y se resumen las más importantes a continuación:

- Como se puede observar en la Figura 18, la proteína 14-3-3Z presenta un MASCOT score elevado (120) y, por tanto, su presencia en el medio condicionado no puede ser considerada como meramente casual.
- Como se puede ver más abajo en la Figura 23, esta proteína es capaz de ser secretada y de penetrar a través de la membrana celular, así como de entrar en el núcleo en el que desarrolla su función. De forma independiente de otros receptores, es capaz de dimerizar con factores proapoptóticos, como BAX y BAD, inhibiéndolos y reduciendo así el potencial apoptótico de las células.
- De forma AXL dependiente, es capaz de inhibir AKT y reactivar MTOR, promoviendo la supervivencia de las células.
- A su vez, la proteína 14.3.3 $\zeta$  es capaz, de forma redundante, tanto mediada por AXL como de manera independiente, de aumentar la supervivencia celular y de reducir la apoptosis, volviendo más quimiorresistentes las células.

Para confirmar esta capacidad de la proteína de inducir quimiorresistencia, hemos realizado dos experimentos para incrementar o disminuir sus niveles utilizando respectivamente la proteína 14.3.3 $\zeta$  recombinante y un anticuerpo monoclonal capaz de inhibirla. Como se puede observar en la Figura 19, el tratamiento con la proteína recombinante vuelve a las células más quimiorresistentes y, por el contrario, al utilizar el anticuerpo se revierte la quimiorresistencia.

Con los resultados obtenidos podemos hipotetizar una vía de señalización celular explicada en la Figura 23 que inicia con la fagocitosis de células apoptóticas por parte de los macrófagos, que secretan la proteína 14.3.3 $\zeta$ ; esta última penetra en la membrana celular llegando al núcleo de la misma y activa estos dos procesos:

1. Se produce la unión a proteínas proapoptóticas, como BAX y BAD, inhibiéndolas y por lo tanto reduciendo la apoptosis celular.
2. Se induce la fosforilación de AXL y AKT (un mediador esencial en la cascada de AXL). La fosforilación de AXL y AKT a su vez induce la expresión de varias proteínas implicadas en supervivencia celular, aumentándola.



**Figura 23. Mecanismo de acción de la proteína 14.3.3ζ (D'Errico *et al.*, 2016).**

La proteína 14.3.3ζ, secretada por los macrófagos tras fagocitar células apoptóticas puede (i) interactuar con BAX y BAD, dos proteínas implicadas en la apoptosis, inhibiéndolas y, por lo tanto, reduciendo la capacidad de entrar en apoptosis de las células; e (ii) inducir la fosforilación de AXL y AKT, induciendo la activación de mTOR y, por lo tanto, favorecer la supervivencia celular. Esta vía de señalización puede ser bloqueada con inhibidores de macrófagos, con anticuerpos monoclonales anti P-14-3-3ζ y con inhibidores del receptor AXL (SGI-7079).

Ambos experimentos, especialmente el de inhibición, son fundamentales para entender el potencial terapéutico de esta vía de señalización. Estos resultados ofrecen la posibilidad de utilizar un anticuerpo monoclonal capaz de inhibir a la proteína 14.3.3ζ como fármaco y administrarlo de forma conjunta con la quimioterapia estándar para evitar que esta pierda su eficacia con el tiempo con el objetivo final de aumentar y, sobre todo, de prolongar la quimiosensibilidad de las células PDAC y finalmente de mejorar la supervivencia global de los pacientes tratados.

Un tratamiento como el que proponemos en la presente tesis resultaría totalmente revolucionario dado que no se trataría de un fármaco para matar a células tumorales, sino de evitar que las células tumorales se volvieran resistentes a los tratamientos ya conocidos. Hasta la fecha, ni en la práctica clínica habitual ni en ensayos clínicos, incluso aquellos en fase precoz, ningún tratamiento ha sido dirigido a esta problemática, representando por lo tanto no solo un avance, sino un enfoque totalmente innovador en la lucha contra el cáncer que podría a su vez evaluarse para el tratamiento de otros tipos de cáncer, dado que la aparición de la quimiorresistencia supone un problema común a otras patologías tumorales.

El mismo experimento hace observar cómo esta vía de señalización también implica el receptor AXL, y cómo su inhibición realizada con SGI-7079 aumenta la eficacia *in vivo* de la gemcitabina y también reduce el riesgo de metástasis. Por lo tanto, otra forma de inhibir farmacológicamente la regulación por retroalimentación mediada por la apoptosis es inhibiendo el receptor AXL.

De la tercera parte del aparato de resultados (*Los macrófagos en la resistencia al tratamiento con inmunoterapia*), desafortunadamente no resulta posible arrojar un análisis más detallado, dado que el ensayo se ha visto afectado en gran medida por la pandemia Covid-19 y por la ausencia actual de una indicación en cáncer de páncreas de la inmunoterapia.

Esperemos que pronto se solucione el primer problema, dado que se encuentra produciendo daños más importantes y prolongados que la propia realización de ensayos clínicos; con respecto al segundo problema, hemos incluido una enmienda que nos permite utilizar los datos de pacientes con cualquier tumor digestivo.

Pese a lo anterior, el único paciente incluido ha arrojado resultados prometedores.

Si los resultados en el futuro se mantienen en la misma línea, el presente experimento abriría la puerta a dos importantes mejorías en el tratamiento del cáncer de páncreas:

- En primer lugar, representa el posible descubrimiento de un factor productivo de respuesta mejor que el PDL-1.
- En segundo lugar, se considera un camino que nos lleve a mejorar la eficacia de la inmunoterapia, gracias a la modulación de la respuesta inmune.

Para finalizar, en resumen, este trabajo pretende y logra dar una nueva clave de lectura al cáncer de páncreas, permitiendo así abrir nuevos caminos en el diagnóstico y en el tratamiento de esta patología y, con suerte, arrojando una nueva luz para los pacientes, los familiares y los médicos que se enfrentan a ella.

## VI. CONCLUSIONES

Como cierre de la investigación anteriormente narrada, a continuación se presentan las principales conclusiones al respecto de todo el estudio.

- La elevada mortalidad del cáncer de páncreas depende en parte de la falta de un biomarcador que permita un diagnóstico precoz, así como de la quimiorresistencia que las células tumorales adquieren rápidamente tras el inicio del tratamiento.
- La presencia de metástasis «oculta» comporta la realización de cirugías que aportan elevada mortalidad sin mejorar la supervivencia de los pacientes.
- La inmunoterapia actual no funciona en el cáncer de páncreas al ser una neoplasia «fría», con poca activación inmunitaria.
- El biomarcador de macrocélulas formadas por macrófagos y células tumorales (CD163+/EPCAM+) puede utilizarse en ensayos clínicos tanto retro como prospectivos para evaluar su utilidad en el diagnóstico precoz del cáncer de páncreas y en el diagnóstico de metástasis ocultas.
- La apoptosis podría regularse mediante retroalimentación negativa; los macrófagos poseen el doble papel de registrar la apoptosis y de responder a ella con factores que la regulan.
- El proceso anterior puede resultar un factor importante y hasta ahora desconocido que favorece la formación del cáncer de páncreas (y de las neoplasias en general).
- El mismo proceso puede ser responsable de la resistencia adquirida que se evidencia en el cáncer de páncreas (y probablemente en otras histologías tumorales).
- La proteína 14-3-3 $\zeta$  es una de las responsables de la resistencia a la apoptosis, activando la vía de señalización de AXL.
- Una inhibición farmacológica de 14-3-3 $\zeta$  o de AXL podría revertir la resistencia a la apoptosis que se genera por retroalimentación negativa durante la quimioterapia.

Como broche final, en resumen, este trabajo pretende y logra dar una nueva clave de lectura al cáncer de páncreas, permitiendo abrir nuevos caminos en el diagnóstico y en el tratamiento de esta patología y, con suerte, arrojando así una nueva luz para los pacientes, los familiares y los médicos que se enfrentan a ella.

## BIBLIOGRAFÍA

- Al-Hawary, M. M., Francis, I. R., Chari, S. T., Fishman, E. K., Hough, D. M., Lu, D. S., Macari, M., Megibow, A. J., Miller, F. H., Mortelet, K. J., Merchant, N. B., Minter, R. M., Tamm, E. P., Sahani, D. V., & Simeone, D. M. (2014). Pancreatic ductal adenocarcinoma radiology reporting template: consensus statement of the society of abdominal radiology and the american pancreatic association. *Gastroenterology*, *146*(1), 291–304. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.004>
- Andersson, P., Yang, Y., Hosaka, K., Zhang, Y., Fischer, C., Braun, H., Liu, S., Yu, G., Liu, S., Beyaert, R., Chang, M., Li, Q., & Cao, Y. (2018). Molecular mechanisms of IL-33-mediated stromal interactions in cancer metastasis. *JCI insight*, *3*(20), e122375. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122375>
- Aponte, P. M., & Caicedo, A. (2017). Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their Microenvironment. *Stem cells international*, *2017*, 5619472. <https://doi.org/10.1155/2017/5619472>
- Avgerinos, K. I., Spyrou, N., Mantzoros, C. S., & Dalamaga, M. (2019). Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism: clinical and experimental*, *92*, 121–135. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.001>
- Bailey, P., Chang, D. K., Nones, K., Johns, A. L., Patch, A. M., Gingras, M. C., Miller, D. K., Christ, A. N., Bruxner, T. J., Quinn, M. C., Nourse, C., Murtaugh, L. C., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourbakhsh, E., Wani, S., Fink, L., Holmes, O., Chin, V., ... Grimmond, S. M. (2016). Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*, *531*(7592), 47–52. <https://doi.org/10.1038/nature16965>
- Bazhin, A. V., von Ahn, K., Fritz, J., Werner, J., & Karakhanova, S. (2018). Interferon- $\alpha$  Up-Regulates the Expression of PD-L1 Molecules on Immune Cells Through STAT3 and p38 Signaling. *Frontiers in immunology*, *9*, 2129. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02129>
- Berger, A. (2000). Th1 and Th2 responses: what are they?. *BMJ (Clinical research ed.)*, *321*(7258), 424. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7258.424>
- Bilimoria, K. Y., Bentrem, D. J., Ko, C. Y., Ritchey, J., Stewart, A. K., Winchester, D. P., & Talamonti, M. S. (2007). Validation of the 6th edition AJCC Pancreatic Cancer Staging System: report from the National Cancer Database. *Cancer*, *110*(4), 738–744. <https://doi.org/10.1002/cncr.22852>
- Blackford, A. L., Canto, M. I., Klein, A. P., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2020). Recent Trends in the Incidence and Survival of Stage 1A Pancreatic Cancer: A Surveillance, Epidemiology, and End Results Analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, *112*(11), 1162–1169. <https://doi.org/10.1093/jnci/djaa004>
- Blackford, A., Parmigiani, G., Kensler, T. W., Wolfgang, C., Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C., Leary, R. J., Eshleman, J. R., Goggins, M., Jaffee, E. M., Iacobuzio-Donahue, C. A., Maitra, A., Klein, A., Cameron, J. L., Olin, K., Schulick, R., Winter, J., Vogelstein, B., ... Hruban, R. H. (2009). Genetic mutations associated with cigarette smoking in pancreatic cancer. *Cancer research*, *69*(8), 3681–3688. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0015>
- Bonavita, E., Galdiero, M. R., Jaillon, S., & Mantovani, A. (2015). Phagocytes as Corrupted Policemen in Cancer-Related Inflammation. *Advances in cancer research*, *128*, 141–171. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.04.013>
- Calon, A., Tauriello, D. V., & Batlle, E. (2014). TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Seminars in cancer biology*, *25*, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.12.008>
- Chang, H. H., & Eibl, G. (2019). Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation as a Strong Promotional Factor for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cells*, *8*(7), 673. <https://doi.org/10.3390/cells8070673>
- Chang, H. H., Moro, A., Takakura, K., Su, H. Y., Mo, A., Nakanishi, M., Waldron, R. T., French, S. W., Dawson, D. W., Hines, O. J., Li, G., Go, V., Sinnott-Smith, J., Pandol, S. J., Lugea, A., Gukovskaya, A. S., Duff, M. O., Rosenberg, D. W., Rozengurt, E., & Eibl, G. (2017). Incidence of pancreatic cancer is dramatically increased by a high fat, high calorie diet in KrasG12D mice. *PLoS one*, *12*(9), e0184455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184455>

- Clarke, D. L., Clarke, B. A., Thomson, S. R., Garden, O. J., & Lazarus, N. G. (2004). The role of preoperative biopsy in pancreatic cancer. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 6(3), 144–153. <https://doi.org/10.1080/13651820410030862>
- Conklin, D. J., Schick, S., Blaha, M. J., Carll, A., DeFilippis, A., Ganz, P., Hall, M. E., Hamburg, N., O'Toole, T., Reynolds, L., Srivastava, S., & Bhatnagar, A. (2019). Cardiovascular injury induced by tobacco products: assessment of risk factors and biomarkers of harm. A Tobacco Centers of Regulatory Science compilation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 316(4), H801–H827. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00591.2018>
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J. L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardière, C., Bennouna, J., Bachet, J. B., Khemissa-Akouz, F., Péré-Vergé, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., Ducreux, M., ... PRODIGE Intergroup (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England journal of medicine*, 364(19), 1817–1825. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011923>
- Conroy, T., Hammel, P., Hebbar, M., Ben Abdelghani, M., Wei, A. C., Raoul, J. L., Choné, L., Francois, E., Artru, P., Biagi, J. J., Lecomte, T., Assenat, E., Faroux, R., Ychou, M., Volet, J., Sauvanet, A., Breysacher, G., Di Fiore, F., Cripps, C., Kavan, P., ... Canadian Cancer Trials Group and the Unicancer-GI-PRODIGE Group (2018). FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *The New England journal of medicine*, 379(25), 2395–2406. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809775>
- Corrêa, L. H., Corrêa, R., Farinasso, C. M., de Sant'Ana Dourado, L. P., & Magalhães, K. G. (2017). Adipocytes and Macrophages Interplay in the Orchestration of Tumor Microenvironment: New Implications in Cancer Progression. *Frontiers in immunology*, 8, 1129. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01129>
- Dawood, S., Austin, L., & Cristofanilli, M. (2014). Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 28(12), 1101–1110.
- Di Carlo, C., Brandi, J., & Cecconi, D. (2018). Pancreatic cancer stem cells: Perspectives on potential therapeutic approaches of pancreatic ductal adenocarcinoma. *World journal of stem cells*, 10(11), 172–182. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v10.i11.172>
- D'Errico, G., Alonso-Nocelo, M., Vallespinos, M., Hermann, P. C., Alcalá, S., García, C. P., Martín-Hijano, L., Valle, S., Earl, J., Cassiano, C., Lombardia, L., Feliu, J., Monti, M. C., Seufferlein, T., García-Bermejo, L., Martinelli, P., Carrato, A., & Sainz, B., Jr (2019). Tumor-associated macrophage-secreted 14-3-3 $\zeta$  signals via AXL to promote pancreatic cancer chemoresistance. *Oncogene*, 38(27), 5469–5485. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0803-9>
- D'Errico, G., Machado, H. L., & Sainz, B., Jr (2017). A current perspective on cancer immune therapy: step-by-step approach to constructing the magic bullet. *Clinical and translational medicine*, 6(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40169-016-0130-5>
- D'Esposito, V., Passaretti, F., Hammarstedt, A., Liguoro, D., Terracciano, D., Molea, G., Canta, L., Miele, C., Smith, U., Beguinot, F., & Formisano, P. (2012). Adipocyte-released insulin-like growth factor-1 is regulated by glucose and fatty acids and controls breast cancer cell growth in vitro. *Diabetologia*, 55(10), 2811–2822. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2629-7>
- Diaz, D., Fabre, I., Daujat, M., Saint Aubert, B., Bories, P., Michel, H., & Maurel, P. (1990). Omeprazole is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology*, 99(3), 737–747. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(90\)90963-2](https://doi.org/10.1016/0016-5085(90)90963-2)
- Drifka, C. R., Loeffler, A. G., Mathewson, K., Keikhosravi, A., Eickhoff, J. C., Liu, Y., Weber, S. M., Kao, W. J., & Eliceiri, K. W. (2016). Highly aligned stromal collagen is a negative prognostic factor following pancreatic ductal adenocarcinoma resection. *Oncotarget*, 7(46), 76197–76213. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12772>
- Duncan, D. D., & Swain, S. L. (1994). Role of antigen-presenting cells in the polarized development of helper T cell subsets: evidence for differential cytokine production by Th0 cells in response to antigen presentation by B cells and macrophages. *European journal of immunology*, 24(10), 2506–2514. <https://doi.org/10.1002/eji.1830241037>
- Eng, E. W., Bettio, A., Ibrahim, J., & Harrison, R. E. (2007). MTOC reorientation occurs during Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis in macrophages. *Molecular biology of the cell*, 18(7), 2389–2399. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-12-1128>

- Ferreccio, C., Yuan, Y., Calle, J., Benítez, H., Parra, R. L., Acevedo, J., Smith, A. H., Liaw, J., & Steinmaus, C. (2013). Arsenic, tobacco smoke, and occupation: associations of multiple agents with lung and bladder cancer. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, *24*(6), 898–905. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e31829e3e03>
- Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature reviews. Immunology*, *12*(4), 253–268. <https://doi.org/10.1038/nri3175>
- Galon, J., & Bruni, D. (2019). Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nature reviews. Drug discovery*, *18*(3), 197–218. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0007-y>
- Goral, V. (2015). Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, *16*(14), 5619–5624. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.14.5619>
- Gordon, S., & Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, *32*(5), 593–604. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>
- Gosselin, D., Link, V. M., Romanoski, C. E., Fonseca, G. J., Eichenfield, D. Z., Spann, N. J., Stender, J. D., Chun, H. B., Garner, H., Geissmann, F., & Glass, C. K. (2014). Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell*, *159*(6), 1327–1340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.023>
- Guertin, K. A., Freedman, N. D., Loftfield, E., Stolzenberg-Solomon, R. Z., Graubard, B. I., & Sinha, R. (2015). A prospective study of coffee intake and pancreatic cancer: results from the NIH-AARP Diet and Health Study. *British journal of cancer*, *113*(7), 1081–1085. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.235>
- Halbrook, C. J., Pontious, C., Kovalenko, I., Lapienyte, L., Dreyer, S., Lee, H. J., Thurston, G., Zhang, Y., Lazarus, J., Sajjakulnukit, P., Hong, H. S., Kremer, D. M., Nelson, B. S., Kemp, S., Zhang, L., Chang, D., Biankin, A., Shi, J., Frankel, T. L., Crawford, H. C., ... Lyssiotis, C. A. (2019). Macrophage-Released Pyrimidines Inhibit Gemcitabine Therapy in Pancreatic Cancer. *Cell metabolism*, *29*(6), 1390–1399.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.02.001>
- Han, Y., Liu, D., & Li, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American journal of cancer research*, *10*(3), 727–742.
- Hartwig, W., Schneider, L., Diener, M. K., Bergmann, F., Büchler, M. W., & Werner, J. (2009). Preoperative tissue diagnosis for tumours of the pancreas. *The British journal of surgery*, *96*(1), 5–20. <https://doi.org/10.1002/bjs.6407>
- Hartwig, W., Strobel, O., Hinz, U., Fritz, S., Hackert, T., Roth, C., Büchler, M. W., & Werner, J. (2013). CA19-9 in potentially resectable pancreatic cancer: perspective to adjust surgical and perioperative therapy. *Annals of surgical oncology*, *20*(7), 2188–2196. <https://doi.org/10.1245/s10434-012-2809-1>
- Harvey, A. E., Lashinger, L. M., Hays, D., Harrison, L. M., Lewis, K., Fischer, S. M., & Hursting, S. D. (2014). Calorie restriction decreases murine and human pancreatic tumor cell growth, nuclear factor- $\kappa$ B activation, and inflammation-related gene expression in an insulin-like growth factor-1-dependent manner. *PLoS one*, *9*(5), e94151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094151>
- Herring, A. C., Hernández, Y., Huffnagle, G. B., & Toews, G. B. (2004). Role and development of TH1/TH2 immune responses in the lungs. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, *25*(1), 3–10. <https://doi.org/10.1055/s-2004-822300>
- Heshmati F. (2014). Updating ECP action mechanisms. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*, *50*(3), 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2014.04.003>
- Hu, H., Hang, J. J., Han, T., Zhuo, M., Jiao, F., & Wang, L. W. (2016). The M2 phenotype of tumor-associated macrophages in the stroma confers a poor prognosis in pancreatic cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *37*(7), 8657–8664. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4741-z>
- Huang, J., Lok, V., Ngai, C. H., Zhang, L., Yuan, J., Lao, X. Q., Ng, K., Chong, C., Zheng, Z. J., & Wong, M. (2021). Worldwide Burden of, Risk Factors for, and Trends in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*, *160*(3), 744–754. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.10.007>

- Hüttner, F. J., Fitzmaurice, C., Schwarzer, G., Seiler, C. M., Antes, G., Büchler, M. W., & Diener, M. K. (2016). Pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) versus pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2(2), CD006053. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006053.pub6>
- Iodice, S., Gandini, S., Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. B. (2008). Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's archives of surgery*, 393(4), 535–545. <https://doi.org/10.1007/s00423-007-0266-2>
- Iwamoto, C., Ohuchida, K., Shinkawa, T., Okuda, S., Otsubo, Y., Okumura, T., Sagara, A., Koikawa, K., Ando, Y., Shindo, K., Ikenaga, N., Nakata, K., Moriyama, T., Miyasaka, Y., Ohtsuka, T., Eto, M., Akashi, K., & Nakamura, M. (2021). Bone marrow-derived macrophages converted into cancer-associated fibroblast-like cells promote pancreatic cancer progression. *Cancer letters*, 512, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.04.013>
- Iyer, S. S., Pulskens, W. P., Sadler, J. J., Butter, L. M., Teske, G. J., Ulland, T. K., Eisenbarth, S. C., Florquin, S., Flavell, R. A., Leemans, J. C., & Sutterwala, F. S. (2009). Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48), 20388–20393. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908698106>
- Jandaghi, P., Najafabadi, H. S., Bauer, A. S., Papadakis, A. I., Fassan, M., Hall, A., Monast, A., von Knebel Doeberitz, M., Neoptolemos, J. P., Costello, E., Greenhalf, W., Scarpa, A., Sipos, B., Auld, D., Lathrop, M., Park, M., Büchler, M. W., Strobel, O., Hackert, T., Giese, N. A., ... Hoheisel, J. D. (2016). Expression of DRD2 Is Increased in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Inhibitors Slow Tumor Growth in Mice. *Gastroenterology*, 151(6), 1218–1231. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.08.040>
- Janky, R., Binda, M. M., Allemeersch, J., Van den Broeck, A., Govaere, O., Swinnen, J. V., Roskams, T., Aerts, S., & Topal, B. (2016). Prognostic relevance of molecular subtypes and master regulators in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC cancer*, 16, 632. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2540-6>
- Janssen, Q. P., O'Reilly, E. M., van Eijck, C., & Groot Koerkamp, B. (2020). Neoadjuvant Treatment in Patients With Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer. *Frontiers in oncology*, 10, 41. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00041>
- Kaseb, H. O., Fohrer-Ting, H., Lewis, D. W., Lagasse, E., & Gollin, S. M. (2016). Identification, expansion and characterization of cancer cells with stem cell properties from head and neck squamous cell carcinomas. *Experimental cell research*, 348(1), 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.09.003>
- Kaps, L., & Schuppan, D. (2020). Targeting Cancer Associated Fibroblasts in Liver Fibrosis and Liver Cancer Using Nanocarriers. *Cells*, 9(9), 2027. <https://doi.org/10.3390/cells9092027>
- Kawase, T., Yasui, Y., Nishina, S., Hara, Y., Yanatori, I., Tomiyama, Y., Nakashima, Y., Yoshida, K., Kishi, F., Nakamura, M., & Hino, K. (2015). Fibroblast activation protein- $\alpha$ -expressing fibroblasts promote the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC gastroenterology*, 15, 109. <https://doi.org/10.1186/s12876-015-0340-0>
- Kenner B. J. (2018). Early Detection of Pancreatic Cancer: The Role of Depression and Anxiety as a Precursor for Disease. *Pancreas*, 47(4), 363–367. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001024>
- Kirkegård, J., Mortensen, F. V., & Cronin-Fenton, D. (2017). Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *The American journal of gastroenterology*, 112(9), 1366–1372. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.218>
- Kleinclaus, F., Perruche, S., Masson, E., de Carvalho Bittencourt, M., Biichle, S., Remy-Martin, J. P., Ferrand, C., Martin, M., Bittard, H., Chalopin, J. M., Seilles, E., Tiberghien, P., & Saas, P. (2006). Intravenous apoptotic spleen cell infusion induces a TGF-beta-dependent regulatory T-cell expansion. *Cell death and differentiation*, 13(1), 41–52. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401699>
- Kobayashi, R., Deavers, M., Patenia, R., Rice-Stitt, T., Halbe, J., Gallardo, S., & Freedman, R. S. (2009). 14-3-3 zeta protein secreted by tumor associated monocytes/macrophages from ascites of epithelial ovarian cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 58(2), 247–258. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0549-7>
- Korc M. (2007). Pancreatic cancer-associated stroma production. *American journal of surgery*, 194(4 Suppl), S84–S86. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2007.05.004>



- Kurahara, H., Shinchu, H., Mataka, Y., Maemura, K., Noma, H., Kubo, F., Sakoda, M., Ueno, S., Natsugoe, S., & Takao, S. (2011). Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *The Journal of surgical research*, 167(2), e211–e219. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.05.026>
- Kwok, G., Yau, T. C., Chiu, J. W., Tse, E., & Kwong, Y. L. (2016). Pembrolizumab (Keytruda). *Human vaccines & immunotherapeutics*, 12(11), 2777–2789. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1199310>
- Lafaro, K. J., & Melstrom, L. G. (2019). The Paradoxical Web of Pancreatic Cancer Tumor Microenvironment. *The American journal of pathology*, 189(1), 44–57. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.09.009>
- Lashinger, L. M., Malone, L. M., Brown, G. W., Daniels, E. A., Goldberg, J. A., Otto, G., Fischer, S. M., & Hursting, S. D. (2011). Rapamycin partially mimics the anticancer effects of calorie restriction in a murine model of pancreatic cancer. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 4(7), 1041–1051. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0023>
- Lee, K. L., Lim, S. K., Orlov, Y. L., Yit, I., Yang, H., Ang, L. T., Poellinger, L., & Lim, B. (2011). Graded Nodal/Activin signaling titrates conversion of quantitative phospho-Smad2 levels into qualitative embryonic stem cell fate decisions. *PLoS genetics*, 7(6), e1002130. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002130>
- Lei, Y., Zhang, D., Yu, J., Dong, H., Zhang, J., & Yang, S. (2017). Targeting autophagy in cancer stem cells as an anticancer therapy. *Cancer letters*, 393, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.02.012>
- Liu, P., Wang, Z., Brown, S., Kannappan, V., Tawari, P. E., Jiang, W., Irache, J. M., Tang, J. Z., Armesilla, A. L., Darling, J. L., Tang, X., & Wang, W. (2014). Liposome encapsulated Disulfiram inhibits NFκB pathway and targets breast cancer stem cells in vitro and in vivo. *Oncotarget*, 5(17), 7471–7485. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2166>
- Llach, J., Carballal, S., & Moreira, L. (2020). Familial Pancreatic Cancer: Current Perspectives. *Cancer management and research*, 12, 743–758. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S172421>
- Loke, P., & Allison, J. P. (2003). PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5336–5341. <https://doi.org/10.1073/pnas.0931259100>
- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of pathology*, 229(2), 176–185. <https://doi.org/10.1002/path.4133>
- Martinelli, P., Carrillo-de Santa Pau, E., Cox, T., Sainz, B., Jr, Dusetti, N., Greenhalf, W., Rinaldi, L., Costello, E., Ghaneh, P., Malats, N., Büchler, M., Pajic, M., Biankin, A. V., Iovanna, J., Neoptolemos, J., & Real, F. X. (2017). GATA6 regulates EMT and tumour dissemination, and is a marker of response to adjuvant chemotherapy in pancreatic cancer. *Gut*, 66(9), 1665–1676. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311256>
- Mattiuzzi, C., & Lippi, G. (2019). Current Cancer Epidemiology. *Journal of epidemiology and global health*, 9(4), 217–222. <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191008.001>
- McFarland, D. C., Jutagir, D. R., Miller, A. H., Breitbart, W., Nelson, C., & Rosenfeld, B. (2020). Tumor Mutation Burden and Depression in Lung Cancer: Association With Inflammation. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 18(4), 434–442. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2019.7374>
- Mendonsa, A. M., Chalfant, M. C., Gorden, L. D., & VanSaun, M. N. (2015). Modulation of the leptin receptor mediates tumor growth and migration of pancreatic cancer cells. *PloS one*, 10(4), e0126686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126686>
- Miranda-Lorenzo, I., Dorado, J., Lonardo, E., Alcalá, S., Serrano, A. G., Clausell-Tormos, J., Cioffi, M., Megias, D., Zagorac, S., Balic, A., Hidalgo, M., Erkan, M., Kleeff, J., Scarpa, A., Sainz, B., Jr, & Heeschen, C. (2014). Intracellular autofluorescence: a biomarker for epithelial cancer stem cells. *Nature methods*, 11(11), 1161–1169. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3112>
- Miyazono, K., Katsuno, Y., Koinuma, D., Ehata, S., & Morikawa, M. (2018). Intracellular and extracellular TGF-β signaling in cancer: some recent topics. *Frontiers of medicine*, 12(4), 387–411. <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0646-8>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology*, 8(12), 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>

- Neoptolemos, J. P., Palmer, D. H., Ghaneh, P., Psarelli, E. E., Valle, J. W., Halloran, C. M., Faluyi, O., O'Reilly, D. A., Cunningham, D., Wadsley, J., Darby, S., Meyer, T., Gillmore, R., Anthoney, A., Lind, P., Glimelius, B., Falk, S., Izbicki, J. R., Middleton, G. W., Cummins, S., ... European Study Group for Pancreatic Cancer (2017). Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 389(10073), 1011–1024. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32409-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32409-6)
- Nomura, A., Gupta, V. K., Dauer, P., Sharma, N. S., Dudeja, V., Merchant, N., Saluja, A. K., & Banerjee, S. (2018). NFκB-Mediated Invasiveness in CD133<sup>+</sup> Pancreatic TICs Is Regulated by Autocrine and Paracrine Activation of IL1 Signaling. *Molecular cancer research : MCR*, 16(1), 162–172. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0221>
- Norton, J., Foster, D., Chinta, M., Titan, A., & Longaker, M. (2020). Pancreatic Cancer Associated Fibroblasts (CAF): Under-Explored Target for Pancreatic Cancer Treatment. *Cancers*, 12(5), 1347. <https://doi.org/10.3390/cancers12051347>
- Nurmik, M., Ullmann, P., Rodriguez, F., Haan, S., & Letellier, E. (2020). In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *International journal of cancer*, 146(4), 895–905. <https://doi.org/10.1002/ijc.32193>
- Oettle, H., Neuhaus, P., Hochhaus, A., Hartmann, J. T., Gellert, K., Ridwelski, K., Niedergethmann, M., Zülke, C., Fahlke, J., Arning, M. B., Sinn, M., Hinke, A., & Riess, H. (2013). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA*, 310(14), 1473–1481. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.279201>
- Ohue, Y., & Nishikawa, H. (2019). Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer science*, 110(7), 2080–2089. <https://doi.org/10.1111/cas.14069>
- Pannala, R., Basu, A., Petersen, G. M., & Chari, S. T. (2009). New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. *The Lancet. Oncology*, 10(1), 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70337-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70337-1)
- Perri, G., Prakash, L. R., & Katz, M. (2019). Pancreatic neuroendocrine tumors. *Current opinion in gastroenterology*, 35(5), 468–477. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000571>
- Petty, A. J., & Yang, Y. (2017). Tumor-associated macrophages: implications in cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 9(3), 289–302. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0135>
- Pilarski R. (2019). The Role of *BRCA* Testing in Hereditary Pancreatic and Prostate Cancer Families. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, 39, 79–86. [https://doi.org/10.1200/EDBK\\_238977](https://doi.org/10.1200/EDBK_238977)
- Pizzato, M., Turati, F., Rosato, V., & La Vecchia, C. (2019). Exploring the link between diabetes and pancreatic cancer. *Expert review of anticancer therapy*, 19(8), 681–687. <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1642109>
- Quaranta, V., & Schmid, M. C. (2019). Macrophage-Mediated Subversion of Anti-Tumour Immunity. *Cells*, 8(7), 747. <https://doi.org/10.3390/cells8070747>
- Raman, P., Maddipati, R., Lim, K. H., & Tozeren, A. (2018). Pancreatic cancer survival analysis defines a signature that predicts outcome. *PloS one*, 13(8), e0201751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201751>
- Rao, C. V., & Mohammed, A. (2015). New insights into pancreatic cancer stem cells. *World journal of stem cells*, 7(3), 547–555. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i3.547>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World journal of oncology*, 10(1), 10–27. <https://doi.org/10.14740/wjon1166>
- Reichl, P., Dengler, M., van Zijl, F., Huber, H., Führlinger, G., Reichel, C., Sieghart, W., Peck-Radosavljevic, M., Grubinger, M., & Mikulits, W. (2015). Axl activates autocrine transforming growth factor-β signaling in hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 61(3), 930–941. <https://doi.org/10.1002/hep.27492>
- Safi, F., Roscher, R., Bittner, R., Schenkluhn, B., Dopfer, H. P., & Beger, H. G. (1987). High sensitivity and specificity of CA 19-9 for pancreatic carcinoma in comparison to chronic pancreatitis. Serological and immunohistochemical findings. *Pancreas*, 2(4), 398–403. <https://doi.org/10.1097/00006676-198707000-00006>

- Sainz, B., Alcalá, S., García, E., Sánchez-Ripoll, Y., Azevedo, M. M., Cioffi, M., Tatari, M., Miranda-Lorenzo, I., Hidalgo, M., Gómez-López, G., Cañamero, M., Erkan, M., Kleeff, J., García-Silva, S., Sancho, P., Hermann, P. C., & Heeschen, C. (2015). Microenvironmental hCAP-18/LL-37 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma by activating its cancer stem cell compartment. *Gut*, *64*(12), 1921–1935. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308935>
- Sainz, B., Carron, E., Vallespinós, M., & Machado, H. L. (2016). Cancer Stem Cells and Macrophages: Implications in Tumor Biology and Therapeutic Strategies. *Mediators of inflammation*, *2016*, 9012369. <https://doi.org/10.1155/2016/9012369>
- Saito, T., Ebihara, Y., Li, L., Shirosaki, T., Iijima, H., Tanaka, K., Nakanishi, Y., Asano, T., Noji, T., Kurashima, Y., Murakami, S., Nakamura, T., Tsuchikawa, T., Okamura, K., Shichinohe, T., & Hirano, S. (2021). A novel laparoscopic near-infrared fluorescence spectrum system for photodynamic diagnosis of peritoneal dissemination in pancreatic cancer. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, *33*, 102157. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102157>
- Santamaría, S., Delgado, M., Kremer, L., & García-Sanz, J. A. (2017). Will a mAb-Based Immunotherapy Directed against Cancer Stem Cells Be Feasible? *Frontiers in immunology*, *8*, 1509. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01509>
- Schima, W., Ba-Ssalamah, A., Goetzinger, P., Scharitzer, M., & Koelblinger, C. (2007). State-of-the-art magnetic resonance imaging of pancreatic cancer. *Topics in magnetic resonance imaging : TMRI*, *18*(6), 421–429. <https://doi.org/10.1097/rmr.0b013e31816459e0>
- Shan, S. J., Zahurak, M., Khan, Z., & Califano, J. A. (2010). Reluctance to undergo follow-up screening for head and neck cancer is associated with income, gender, and tobacco use. *ORL: journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties*, *72*(5), 266–271. <https://doi.org/10.1159/000310353>
- Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation*, *122*(3), 787–795. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>
- Sreedhar, U. L., DeSouza, S. V., Park, B., & Petrov, M. S. (2020). A Systematic Review of Intra-pancreatic Fat Deposition and Pancreatic Carcinogenesis. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, *24*(11), 2560–2569. <https://doi.org/10.1007/s11605-019-04417-4>
- Steinman, R. M., & Idoyaga, J. (2010). Features of the dendritic cell lineage. *Immunological reviews*, *234*(1), 5–17. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00888.x>
- Stopa, K. B., Kusiak, A. A., Szopa, M. D., Ferdek, P. E., & Jakubowska, M. A. (2020). Pancreatic Cancer and Its Microenvironment-Recent Advances and Current Controversies. *International journal of molecular sciences*, *21*(9), 3218. <https://doi.org/10.3390/ijms21093218>
- Takehara, M., Sato, Y., Kimura, T., Noda, K., Miyamoto, H., Fujino, Y., Miyoshi, J., Nakamura, F., Wada, H., Bando, Y., Ikemoto, T., Shimada, M., Mugaruma, N., & Takayama, T. (2020). Cancer-associated adipocytes promote pancreatic cancer progression through SAA1 expression. *Cancer science*, *111*(8), 2883–2894. <https://doi.org/10.1111/cas.14527>
- Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *Funciones del citómetro de flujo Attune*. <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometers/attune-nxt-flow-cytometer/features.html>
- Vainio, H., Kaaks, R., & Bianchini, F. (2002). Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, *11 Suppl 2*, S94–S100.
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *Lancet (London, England)*, *378*(9791), 607–620. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0)
- Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S. A., Ma, W. W., Saleh, M. N., Harris, M., Reni, M., Dowden, S., Laheru, D., Bahary, N., Ramanathan, R. K., Taberner, J., Hidalgo, M., Goldstein, D., Van Cutsem, E., ... Renschler, M. F. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England journal of medicine*, *369*(18), 1691–1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304369>
- Weigert, A., Olesch, C., & Brüne, B. (2019). Sphingosine-1-Phosphate and Macrophage Biology-How the Sphinx Tames the Big Eater. *Frontiers in immunology*, *10*, 1706. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01706>

- White, P. B., True, E. M., Ziegler, K. M., Wang, S. S., Swartz-Basile, D. A., Pitt, H. A., & Zyromski, N. J. (2010). Insulin, leptin, and tumoral adipocytes promote murine pancreatic cancer growth. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, *14*(12), 1888–1894. <https://doi.org/10.1007/s11605-010-1349-x>
- Xin, W., Fang, L., Fang, Q., Zheng, X., & Huang, P. (2018). Effects of metformin on survival outcomes of pancreatic cancer patients with diabetes: A meta-analysis. *Molecular and clinical oncology*, *8*(3), 483–488. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1541>
- Yu, H., Zhong, X., Gao, P., Shi, J., Wu, Z., Guo, Z., Wang, Z., & Song, Y. (2019). The Potential Effect of Metformin on Cancer: An Umbrella Review. *Frontiers in endocrinology*, *10*, 617. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00617>
- Wang, W., Marinis, J. M., Beal, A. M., Savadkar, S., Wu, Y., Khan, M., Taunk, P. S., Wu, N., Su, W., Wu, J., Ahsan, A., Kurz, E., Chen, T., Yaboh, I., Li, F., Gutierrez, J., Diskin, B., Hundeyin, M., Reilly, M., Lich, J. D., ... Miller, G. (2018). RIP1 Kinase Drives Macrophage-Mediated Adaptive Immune Tolerance in Pancreatic Cancer. *Cancer cell*, *34*(5), 757–774.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.10.006>
- Wang, X., Shen, H., Zhangyuan, G., Huang, R., Zhang, W., He, Q., Jin, K., Zhuo, H., Zhang, Z., Wang, J., Sun, B., & Lu, X. (2018). 14-3-3 $\zeta$  delivered by hepatocellular carcinoma-derived exosomes impaired anti-tumor function of tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cell death & disease*, *9*(2), 159. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0180-7>
- Watanabe, S., Alexander, M., Misharin, A. V., & Budinger, G. (2019). The role of macrophages in the resolution of inflammation. *The Journal of clinical investigation*, *129*(7), 2619–2628. <https://doi.org/10.1172/JCI124615>
- Weigert, A., Tzieply, N., von Knethen, A., Johann, A. M., Schmidt, H., Geisslinger, G., & Brüne, B. (2007). Tumor cell apoptosis polarizes macrophages role of sphingosine-1-phosphate. *Molecular biology of the cell*, *18*(10), 3810–3819. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-12-1096>
- Williams, C. A., Harry, R. A., & McLeod, J. D. (2008). Apoptotic cells induce dendritic cell-mediated suppression via interferon-gamma-induced IDO. *Immunology*, *124*(1), 89–101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02743.x>
- Wu, C., Zhang, Y., Jiang, Y., Wang, Q., Long, Y., Wang, C., Cao, X., & Chen, G. (2013). Apoptotic cell administration enhances pancreatic islet engraftment by induction of regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells. *Cellular & molecular immunology*, *10*(5), 393–402. <https://doi.org/10.1038/cmi.2013.16>
- Wu, G., Ma, Z., Hu, W., Wang, D., Gong, B., Fan, C., Jiang, S., Li, T., Gao, J., & Yang, Y. (2017). Molecular insights of Gas6/TAM in cancer development and therapy. *Cell death & disease*, *8*(3), e2700. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.113>
- Zhang, A., Qian, Y., Ye, Z., Chen, H., Xie, H., Zhou, L., Shen, Y., & Zheng, S. (2017). Cancer-associated fibroblasts promote M2 polarization of macrophages in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer medicine*, *6*(2), 463–470. <https://doi.org/10.1002/cam4.993>