Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca

UNIÓ EUROPEA
Fons Social Europeu

Memòria justificativa de recerca de les beques predoctorals per a la formació de personal investigador (FI)

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Títol del projecte ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Caracterización de las células madre neoplásicas en el cáncer de endometrio

Dades de l'investigador (benficiari de l'ajut)

Nom: Cristina
Cognoms: Mirantes Barbeito
Correu electrònic: cristinamirantes@gmail.com

Dades del director del projecte

Nom: **Xavier**
Cognoms: Matias-Guiu Guia
Correu electrònic: **xmatias@arnau.scs.es**

Dades de la universitat / centre al que s'està vinculat
Grupo de Cáncer del Laboratorio de Investigación del HUAV. Universidad de Lleida

Número d'expedient
2010FI_B 01040

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
endometrio, cáncer, células madre somáticas, células madre tumorales, radioterapi

Data de presentació de la justificació
31/8/2011

Generalitat de Catalunya
Departament d'Innovació, Universitats i Empresa

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)
El carcinoma de endometrio (CE) es el tumor maligno más frecuente del tracto genital femenino en países desarrollados. Durante los últimos años, ha ganado firmeza la hipótesis de que el origen de los tumores se encuentra en la transformación de células indiferenciadas multipotenciales denominadas células madre somáticas (CMS) en células madre neoplásicas (CSC). Estudios recientes han observado la existencia de células madre en endometrios murinos y humanos; el presente proyecto pretende identificar, aislar, cultivar y caracterizar las CSC endometriales y estudiar los mecanismos moleculares responsables de su transformación. Nuestros resultados muestran que diferentes lineas celulares de cancer de endometrio expresan factores de célula indiferenciada. Un trabajo más extenso con la línea celular Ishikawa muestra la capacidad de estas células para crecer como esferas, diferenciarse a otros linajes y resistir al tratamiento radioterapéutico. Los resultados obtenidos nos permiten pensar que la línea Ishikawa es un buen modelo para el estudio de las CSC endometriales, aunque se necesitaría ampliar el estudio para ser concluyente.

Resum en anglès(màxim 300 paraules)
Endometrial carcinoma (EC) is the most common malignant tumor of the female genital tract in developed countries. Classical models of carcinogenesis, described as stochastic, claim that any cell in any organ can be transformed by the right combination of mutations, thus, all the cells in a developed cancer are equally malignant. This theory of cancer stem cells (CSC) assumes that only a very small subset of cells has the capacity to initiate and sustain tumor growth. Recent studies have noted the existence of stem cells in murine and human endometrium. This project aims to identify, isolate, cultivate and characterize the endometrial CSCs and explore the molecular mechanisms responsible for their transformation. Our results show that different cancer cell lines express endometrial undifferentiated cell factors. A more extensive study with the Ishikawa cell line shows the ability of these cells to grow as spheres, differentiate into other lineages and resist radiotherapy. The results obtained allow us to think that the line Ishikawa is a good model for the study of endometrial CSC, although further study is needed to be conclusive.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

Caracterización de las células madre neoplásicas en el cáncer de endometrio

Introducción

El carcinoma de endometrio (CE) es el tumor maligno más frecuente del tracto genital femenino en países desarrollados. Existen dos formas clínico-patológicas de CE: los de tipo I son tumores de bajo grado, estrógeno-dependientes y de morfología endometrioide (CEE), generalmente se desarrollan en mujeres peri-menopáusicas y coexisten o son precedidos por hiperplasia endometrial. Los tumores de tipo II, son carcinomas non-endometrioides (CNEE), que se comportan de forma agresiva, independientes de los estrógenos y ocurren en mujeres post-menopáusicas a partir de pólipos endometriales o endometrio atrófico. La prevalencia de los tumores de tipo I es superior a la de tipo II (85% y 15%, respectivamente). A nivel molecular, las alteraciones presentes en cada uno de los tipos también son diferentes: los CEE muestran inestabilidad de microsatélites (MSI), y mutaciones en PTEN, PIK3CA, k-RAS, y CTNNB1; en cambio, los CNEE muestran inestabilidad cromosómica y alteraciones en p53.

Durantes los últimos años, ha ganado firmeza la hipótesis de que el origen de los tumores se encuentra en la transformación de células indiferenciadas multipotenciales denominadas células madre somáticas (CMS). En condiciones normales, estas células realizan funciones de gran importancia para el mantenimiento de la homeostasis tisular y del organismo. El modelo de carcinogénesis conocido como “de células madre”, postula que el cáncer se desarrolla por la acumulación de alteraciones en CMS, convirtiéndolas en células madre neoplásicas (CSC). Las CSC, mantendrían características de células madre somáticas, incluyendo su capacidad de división asimétrica y autorreplicación, produciendo células que mantienen estas características, y al mismo tiempo, produciendo células maduras que confieren al tumor los principales rasgos morfológicos de diferenciación. No obstante, las CSC carecen de mecanismos de control de crecimiento, o los tienen alterados, causa principal de su malignidad.[1,2]

Las CSC fueron observadas por primera vez en neoplasias hematológicas, pero existen evidencias crecientes que demuestran su presencia en tumores sólidos, apoyando la hipótesis de que el modelo sea extrapolable a tumores epiteliales, como el adenocarcinoma endometrial. Este modelo de CSC proporcionaría una explicación aceptable de la heteterogeneidad funcional observada en los tumores sólidos

Las vías de señalización intracelular que orquestan la autorreplicación y proliferación de las CMS son, en muchos casos, las mismas que se encuentran alteradas en diferentes tipos de tumores. En el caso de cáncer de endometrio, destacan frecuentemente alteraciones iniciales

tanto en β-catenina como en PTEN, que son componentes importantes de las vías Wnt y PI3K respectivamente.

Estudios recientes han observado la existencia de CMS en endometrios murinos y humanos.[3] Asimismo, se ha demostrado que las células epiteliales de endometrio humano se pueden mantener en cultivo e incluso diferenciarse a estructuras glandulares similares a las que se encuentra en el endometrio humano.

Objetivos del proyecto

En el presente proyecto se pretende identificar, caracterizar, aislar y cultivar las células madre neoplásicas del endometrio y estudiar los mecanismos moleculares implicados en la transformación de las células madre endometriales normales en células madre neoplásicas. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos:

1-Identificación, aislamiento y establecimiento de cultivos de la población de CSC a partir de líneas celulares de adenocarcinoma endometrial humano.

2-Caracterización inmunofenotípica de las CSC endometriales.

3- Diferenciación "*in vitro*" de CSC a células endometriales epiteliales y a otros tejidos, demostrando su potencialidad.

4- Evaluación de la capacidad tumorigénica de las CSC en ratones SCID.

5- Estudio de la respuesta de las CSC al tratamiento con radioterapia.

Material y métodos

Cultivo celular

Las células se mantuvieron con el medio Dulbeco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10% de Foetal Bovine Serum, 1mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamina. y 1% de penicilina/estreptomicina a 37ºC con una humedad del 5% de CO2. En el caso de las esferas, se empleó medio DMEM F12 suplementado con 1% de antibiótico, B27 50x, 20ng/mL de EGF y 10ng/mL de bFGF.

Para los ensayos de diferenciación celular se plantaron 100 células en pozos de M24 y se empleó un medio osteogénico durante 21 días, cambiando el medio de cultivo cada 3 días. El medio de cultivo de base fue medio MEM, suplementado con 100 nM de dexametasona, 0.2 mM de L-ascorbato, 10 mM beta-glicerol fosfato, 10% iFBS, 1% antibióticos y 2 mM de L-glutamina.

Análisis por Western Blot

Al final de los correspondientes tratamientos, las líneas celulares se lavaron por duplicado con PBS frío. Los lisados se obtuvieron añadiendo tampón de lisis (2% SDS, 125 mM Tris-Hcl pH 6.8) y se desnaturalizaron los extractos de proteicos por choque térmico a 95ºC durante 5 minutos. La concentracion de los mismos se determinó mediantes un ensayo Lowry. Las mismas cantidades de proteína se cargaron en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Tras el bloqueo de la misma con leche desnatada en polvo diluída al 5%, se blotaron con los anticuerpos correspondientes a 4ºC durante 16h. La señal fue detectada mediante el empleo de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa.

Incorporación de 5-Bromodeoxyuridine (BrdU)

Para determinar la proliferación, las células se incubaron con 6 mmol/L de 5-bromodesoxiuridina (BrdU) durante 60 minutos y a continuacion se fijaron con PFA 4%. El DNA se desnaturalizó con 2 mol/L de HCl durante 30 minutos y se paró la reacción con 0,1 mol/L $Na_2B_4O_7$ durante 2 minutos. Para realizar la inmunofluorescencia, se bloqueó la muestra con suero fetal bovino al 5%, 0.2% glicina y 0.1% Tritón X-100 durante 1 h. El anticuerpo primario se incubó durante 16h a 4ºC y el secundario 1h a temperatura ambiente. Para la visualización de los nucleos se empleó Hoescth 33342.

Tinción de Von Kossa

Esta técnica permite la visualización de depósitos de calcio de color negro en células diferenciadas a tejido óseo. Básicamente, tras 21 días de tratamiento, las células se fijaron en PFA 4% y tras dos lavados con PBS se mantuvieron en nitrato de plata al 2% durante 1 hora, manteniendo la preparacion bajo luz ultravioleta. Posteriormente, se lavaron con agua destilada, se incubaron con tiosulfato de sodio al 5% durante 5 minutos para parar la reaccion y se repitieron los lavados. Por ultimo, se contra-tiñeron con nuclear red durante 2 minutos, se lavaron con agua y se procedió a la observación de las muestras.

Irradiación de las células

Las dosis de irradiación utilizadas en este estudio fueron 2, 4, 6, 8 y 10Gy utilizando fotones de 6 Mv de acelerador lineal VARIAN 2100 con una tasa de dosis de 300 cGy/minuto. Las células se plantaron tras su irradiación a densidad clonogénica para evaluar su supervivencia mediante ensayos clonogénicos.

Ensayo de proliferación celular (Ensayo Clonogénico)

La supervivencia de las células una vez irradiadas, se define como la habilidad de las células para formar colonias. Se mantendrán las células hasta llegar a una confluencia del 70-80%, y se expondrán a la radiación. A continuación se tripsinizarán las células y se transferirán a una placa de 6 pozos con una concentración de $1x10^3$ células/pozo en medio completo. Después de 12-14 días de incubación a 37ºC con una humedad del 5% de CO2, se observará la viabilidad celular con una tinción de MTT y se realizará el contaje de colonias con el programa Colony Counting del Quantity One 4.5.0, en el analizador de imágenes (Versa Doc).

Resultados y discusión

Durante periodo de vigencia de la beca, hemos conseguido resultados preliminares que demuestran la existencia de células madre neoplásicas en el endometrio y que permiten su caracterización.

Las líneas celulares de cáncer de endometrio expresan factores de célula indiferenciada

En nuestro laboratorio disponemos de tres líneas celulares diferentes de adenocarcinoma endometrial: Ishikawa, Hec-1A y RL.95, todas ellas con fenotipo epitelial. El análisis de lisados proteicos de cada una de ellas reveló que las tres expresan factores de célula madre. Concretamente, se analizó la expresión de ABCG2, Oct-4 y Klf4, todos ellos han sido propuestos como marcadores característicos de estas poblaciones en otros tejidos.[1],[2]

Recientes publicaciones en el campo proponen la proteína de membrana CD133 como marcador que permita identificar y aislar la población de CSC endometriales.[4,5] Por este motivo, también evaluamos su expresión en las líneas celulares mencionadas anteriormente. Tal y como muestra la figura 1, los factores analizados fueron detectados en todas las líneas celulares estudiadas, a excepción de CD133, presente exclusivamente en la línea Ishikawa (IK). Este resultado nos llevó a excluir las otras líneas del estudio y seguir solamente con las Ishikawa.

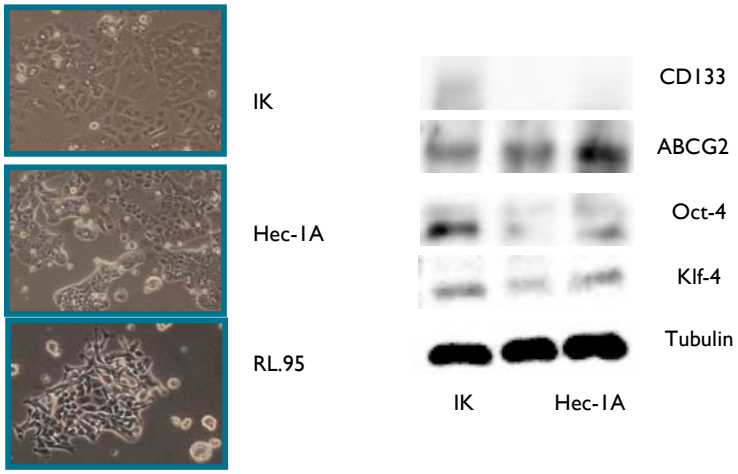

Figura 1. Diferentes líneas de adenocarcinoma de endometrio expresan factores característicos de célula madre.

La línea celular Ishikawa contiene una población CD133+ pero dicho marcador no identifica CSC

Mediante sorteo con bolas magnéticas, se separaron las poblaciones positiva y negativa para CD133 de las células Ishikawa. A diferencia de las referencias bibliográficas que muestran porcentajes de células positivas inferiores al 1%, en el sorteo celular se obtuvo un 80% de células CD133+, cantidad muy superior a la esperada.(figura 2) Posteriormente, se realizaron estudios de clonogenicidad y retención de BrdU entre las poblaciones IK CD133+ y CD133-, pero los resultados fueron equivalentes para ambas. También se evaluó la expresión de proteínas propias de células indiferenciadas (Oct-4, Sox2, Klf4, c-Myc), no hallándose diferencias entre Ishikawa CD133+ y CD133-.

Una de las principales características de las CSC es su capacidad de crecimiento en forma de esferas o tumoresferas en condiciones de no adherencia a sustrato y en medio de cultivo libre de suero.[6,7] Hemos puesto a punto dicho sistema de cultivo y solo las células Ishikawa han sido capaces de desarrollarse como esferas en estas condiciones. Sin embargo, tanto las IK CD133+ como CD133- fueron capaces de crecer como tumoresferas.

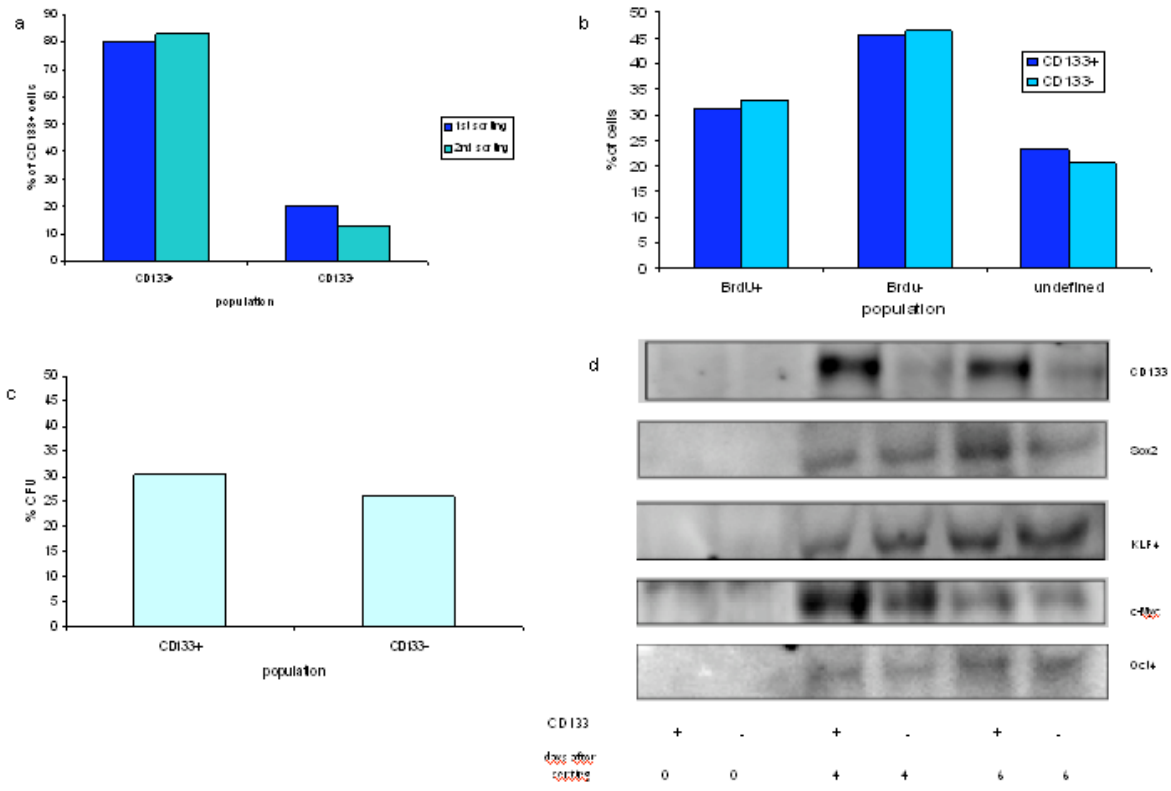

Figura 2. Resultados del sorteo celular. A: La línea Ishikawa contiene un elevado porcentaje de células CD133+. No se detectaron diferencias en los ensayos de BrdU (B) ni de clonogenicidad (C) entre las dos poblaciones. Tampoco se apreciaron diferencias en la expresión de factores de célula indiferenciada (D)

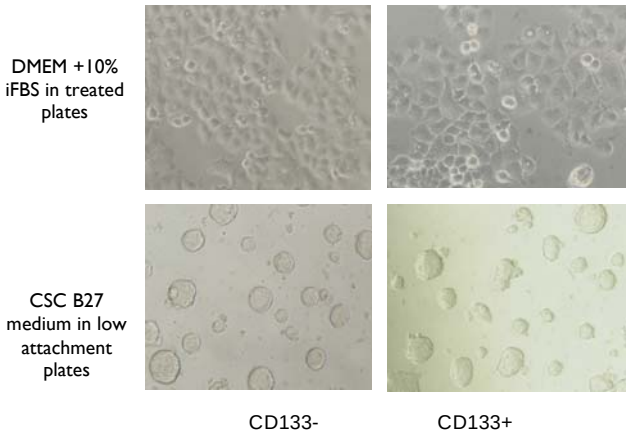

Figura 3. Tanto la población Ishikawa CD133 positiva como negativa son capaces de formar esferas en medio suplementado y condiciones de baja adherencia.

Los resultados anteriores, llevaron a concluir que en células IK, la expresión de CD133 no identifica la población de células madre del cáncer de endometrio. Si bien es cierto que en algunos trabajos se propone este marcador para identificarlas, no podemos extrapolarlo a la línea celular con la que trabajamos. No obstante, no descartamos la posibilidad de que CD133 pueda ejercer esta función si se complementa con otros marcadores.

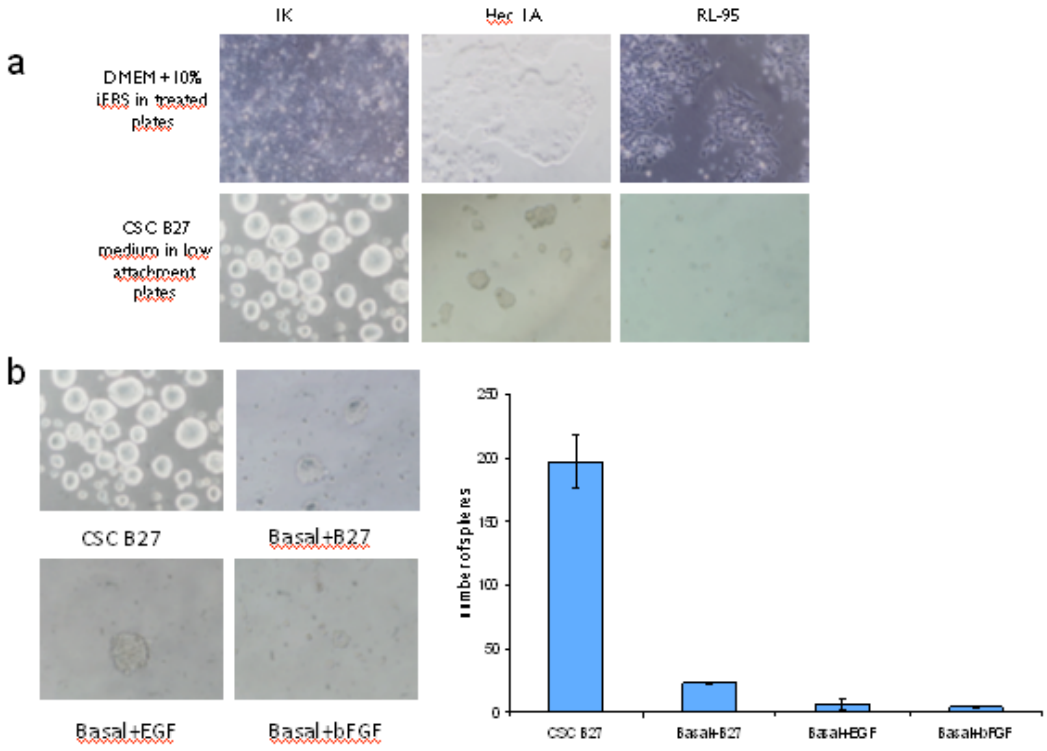

Figura 4. La línea celular IK es la única capaz de crecer en forma de esferas en condiciones de baja adherencia sin suero (A). Los tres suplementos del medio de cultivo son críticos para la formación de dichas esferas. (B)

La línea celular Ishikawa es capaz de crecer como esferas

Ya que en otros tejidos como mama o glioma el crecimiento en forma de esfera permite aislar las células madre neoplásicas, intentamos caracterizar las esferas derivadas de la línea IK, en comparación con la línea creciendo en condiciones normales con suero. Una vez mas, se comparó el comportamiento de las tres líneas celulares, pero solamente las Ishikawa fueron capaces de desarrollar esferas.

Para el crecimiento de estas esferas se emplearon placas de cultivo no tratadas, de baja adherencia, y un medio de cultivo basal complementado con B27, EGF y bFGF. El uso de los

tres suplementos es necesario para el correcto crecimiento del cultivo y la deprivación de los mismos disminuye de forma crítica el número de esferas obtenidas, como se ve en la figura 4. No sólo el medio de cultivo, sino también las condiciones de baja adherencia resultaron factores clave para la formación de los agregados.

Mediante *western blot*, se analizó la expresión de factores de célula madre en Ishikawas cultivadas en placas de adherencia normal o reducida y empleando medio con suero (iFBS) o el medio basal suplementado (CSC B27). Sorprendentemente, la expresión de dichas proteínas no fue superior en las esferas, sino que incluso se detectaron niveles por debajo del control. (fig.5)

Figura 5. Análisis de la expresión de diferentes factores de célula madre en Ishikawas cultivadas con suero o en medio CSC B27 y diferentes condiciones de adherencia.

La línea celular Ishikawa es capaz de diferenciarse a otros linajes

Una de las características principales de las células madre es su capacidad de diferenciarse a otros tejidos. En nuestro caso, evaluamos la capacidad de las Ishikawa para diferenciarse a tejido osteogénico, evaluando dicha capacidad mediante la tinción de Von Kossa. En una primera etapa, las células crecieron en medio con suero o CSCB27 y condiciones de adherencia baja o normal; posteriormente, se empleó un medio para inducir la osteogénesis. Tal y como muestra la figura, las células crecidas en CSCB27 o con baja adherencia fueron capaces de diferenciarse a tejido osteogénico, obteniéndose un mejor resultado cultivándolas bajo ambas características.

Para eliminar la posibilidad de que éste comportamiento fuera algo común de las células de carcinoma endometrial, se realizó el mismo experimento con la línea celular Hec-1A. En

ninguna de las combinatorias se obtuvieron resultados positivos tras la tinción de Von Kossa. (fig. 6)

Las esferas derivadas de células Ishikawa son radiorresistentes.

Entre los principales atractivos de las CSC destaca su resistencia a los tratamientos convencionales. En el caso del cáncer de endometrio, el tratamiento de rutina implica radioterapia y cirugía, utilizándose la quimioterapia como adyuvante secundario. En nuestro caso, hemos evaluado la respuesta de la línea Ishikawa a la radioterapia, comparando la supervivencia en condiciones de crecimiento con suero o en forma de esferas. Nuestros resultados preliminares señalan la existencia de una población radiorresistente entre las tumoresferas derivadas de la línea Ishikawa, obteniendo supervivencias de incluso 40% a dosis de 10 Gy frente a porcentajes que no llegan al 1% cuando las células crecen en condiciones adherente con suero. (fig. 7)

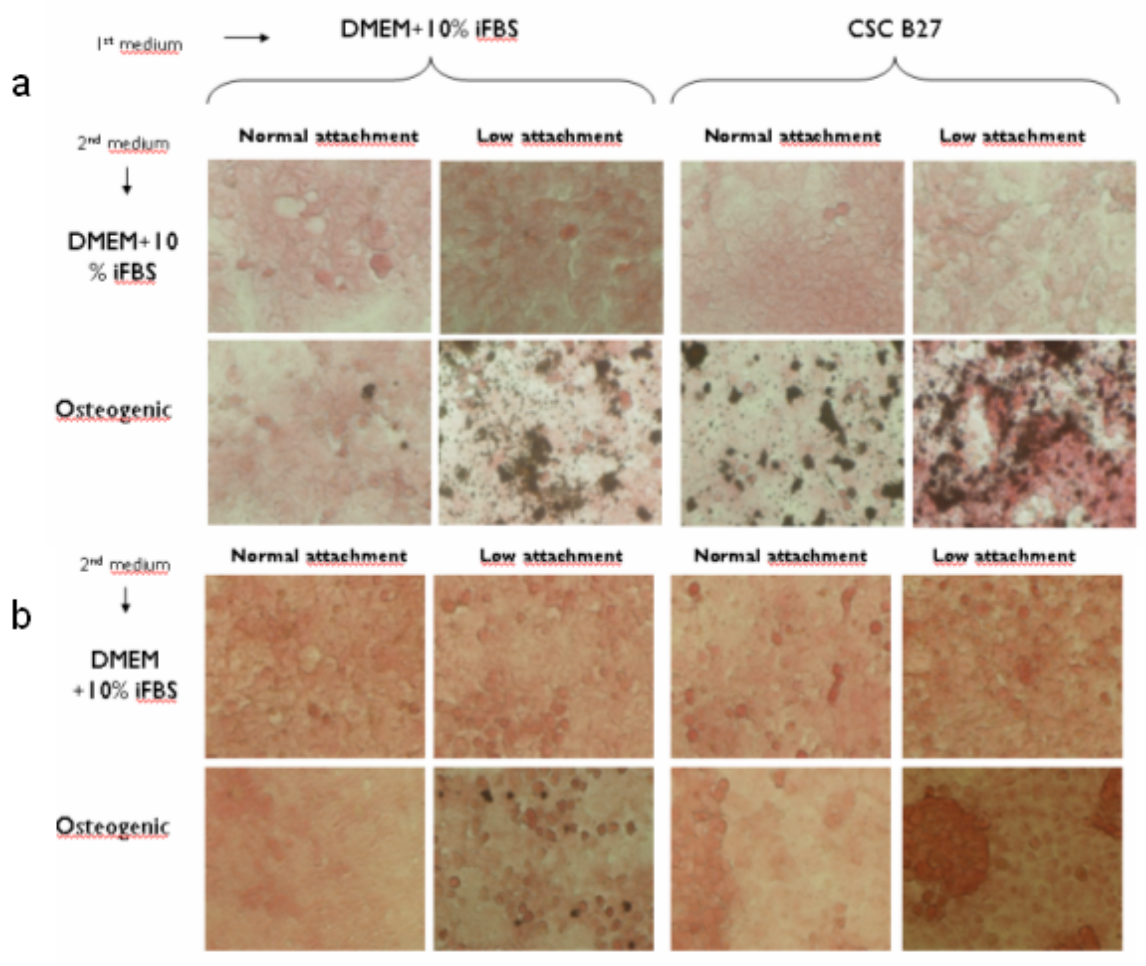

Figura 6. Resultados de la tinción de Von Kossa en Ishikawa (A) y Hec-1ª (B). Los depósitos de calcio se identifican de color negro.

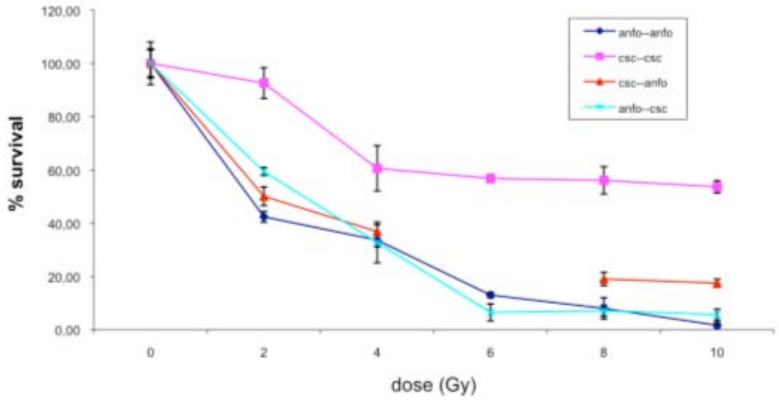

Figura 7. La población de Ishikawa crecida y mantenida en forma de esferas es resistente a radioterapia
Anfo: medio con suero; CSC: medio de crecimiento de esferas.

Conclusiones

Aunque el estudio no está finalizado, los resultados presentados y obtenidos hasta el momento, nos incitan a pensar que la línea celular Ishikawa puede ser un buen modelo para el estudio de las CSC en el endometrio. La expresión del marcador de membrana CD133 no parece ser definitivo para aislar dicha población, aunque no descartamos que sea de utilidad en caso de complementarse con otros marcadores de membrana. Este es, por ejemplo, el caso de las CSC de mama, cuyo fenotipo de membrana incluye más de una proteína.

La utilidad de esta línea celular también se refleja en su capacidad de crecimiento en forma de esfera y cabe destacar el carácter radiorresistente de las mismas.

Durante el periodo de vigencia de la beca, podemos afirmar que se han conseguido los objetivos propuestos, aunque no totalmente. La caracterización de las tumoresferas ha de ampliarse a más marcadores y se han de evaluar otras características de célula indiferenciada en ellas.

De este modo, los planes futuros para la conclusión del proyecto incluyen:

1-Identificación, aislamiento y establecimiento de cultivos de la población de CMS y CSC a partir de cultivos primarios humanos y murinos.

2-Conclusión de la caracterización inmunofenotípica de las CMS y CSC endometriales en los modelos humano y murino.

3- Diferenciación "*in vitro*" de CMS y CSC a células endometriales epiteliales y a otros tejidos si es posible, demostrando su potencialidad. Concretamente se realizaran ensayos de osteogénesis, adipogénesis, condrogénesis y formación de músculo o tejido nervioso.

4- Evaluación de la capacidad tumorigénica de las CSC en ratones SCID.

5- Caracterización de los mecanismos de resistencia a radioterapia de las CSC.

6- Estudio de las CMS como label retaining cells en ratones PTEN+/+ y PTEN+/- a través de estudios de retención de BrdU.

Bibliografía

[1] Ward, R. J. & Dirks, P. B. Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development. *Annu Rev Pathol* **2**, 175-189, doi:10.1146/annurev.pathol.2.010506.091847 (2007).

[2] Lobo, N. A., Shimono, Y., Qian, D. & Clarke, M. F. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 675-699, doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154 (2007).

[3] Gargett, C. E. & Masuda, H. Adult Stem Cells in the Endometrium. *Mol Hum Reprod*, doi:gaq061 [pii]
10.1093/molehr/gaq061.

[4] Rutella, S. *et al.* Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. *Clin Cancer Res* **15**, 4299-4311, doi:1078-0432.CCR-08-1883 [pii]
10.1158/1078-0432.CCR-08-1883 (2009).

[5] Nakamura, M. *et al.* Prognostic impact of CD133 expression as a tumor-initiating cell marker in endometrial cancer. *Hum Pathol*, doi:S0046-8177(10)00184-X [pii]
10.1016/j.humpath.2010.05.006.

[6] Vermeulen, L., Sprick, M. R., Kemper, K., Stassi, G. & Medema, J. P. Cancer stem cells--old concepts, new insights. *Cell Death Differ* **15**, 947-958, doi:cdd200820 [pii]
10.1038/cdd.2008.20 (2008).

[7] Jordan, C. T., Guzman, M. L. & Noble, M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* **355**, 1253-1261, doi:355/12/1253 [pii]
10.1056/NEJMra061808 (2006).