



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GLOBAL DE LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PÁNCREAS
AsPC-1 MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE CÉLULA ÚNICA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. GALINDO VEGA AARÓN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. JULIO ISRAEL PÉREZ CARREÓN

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CD. MX., ENERO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1326/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de noviembre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **GALINDO VEGA AARÓN** con número de cuenta **307032773** con la tesis titulada "**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GLOBAL DE LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PÁNCREAS AsPC-1 MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE CÉLULA ÚNICA**", realizada bajo la dirección del **DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. FELIPE VACA PANIAGUA
Vocal: DR. VÍCTOR MANUEL RUÍZ LÓPEZ
Secretario: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ
Suplente: DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO
Suplente: DRA. MAGALI ESPINOSA CASTILLA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de diciembre de 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX

Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas (Biomedicina), por permitir desarrollarme como persona y formarme como profesionalista dentro de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado (No. de apoyo, 478119).

Al Dr. Jorge Meléndez Zajgla, por todo el apoyo que me brindó siempre para que este trabajo pudiera llevarse a cabo, por todo el conocimiento que me transmitió, y a que siempre se mostró solidario y de una comprensión sin igual y sobre todo por confiar en mí y haberme dejado formar parte de su gran grupo de trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Sara y el Dr. Julio, por sus valiosas aportaciones que ayudaron a enriquecer y mejorar mi trabajo.

Agradecimientos personales

A mis padres quienes me dieron la vida. Pero en especial a mi mamá, a ti te debo todo lo que soy y lo que he podido lograr hasta ahora, ya que siempre has hecho hasta lo imposible por que cumpla todas mis metas de la vida, eres una mujer sumamente trabajadora, honesta y amable, gran parte de la persona que soy lo he aprendido de ti, enseñándome con tu ejemplo que tenemos que salir todos los días a tratar de ser mejores, y a pesar de todo nunca rendirnos, no sabes lo orgulloso que me siento de poder decirte mamá. Te amo con todo mi corazón. A mi padre de quien he aprendido cosas muy buenas, como a saber ganarme la vida de manera honrada y a respetar siempre a los demás, te amo papá.

A mi hermana, de quien siempre espero ser un buen ejemplo, nos has dado uno de los mejores regalos, a Camila, a quien de igual manera espero que esto sirva de ejemplo para que algún día consiga cosas similares. Te amo hermana.

A ti Ana Victoria, que me has demostrado que vas a estar siempre en las buenas, en las malas y en las peores, te amo como no te imaginas, gracias por siempre estar para mí, por seguir siendo mi compañera de vida, espero lo sigas siendo siempre, por apoyarme e impulsarme a seguir adelante y ser mejor cada día.

A mi familia, de quien me siento profundamente afortunado de tenerlos, me han demostrado que siempre estarán ahí para mí, cuando más le necesite, pero en especial a mis tíos Antonio y Josefina, han sido figuras casi paternas y un ejemplo para que hoy este en éste punto, al igual que mis primos, toñito y Tamara que han sido como mis hermanos. A mi tía Diana, quien sé que siempre que la necesite va a estar ahí como hasta ahora y a mis primos Alan, Areli, Rachel y Jhonatan. A mi tío David y su familia que siempre han demostrado un cariño muy grande hacia mi persona.

A mis abuelos, dos de las personas que quisiera me fueran eternas, los amo con todo mi corazón, y me siento muy afortunado de tenerlos en mi vida.

A la Dra. Magali y la Dra. Gisela por apoyarme siempre en cualquier cosa que necesité.

Al M. en C. Benjamín, por ayudarme con cualquier material, reactivo o asunto administrativo que fuera de mi necesidad.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica, por permitirme desarrollar la parte experimental de mis estudios de maestría dentro de sus instalaciones.

A la vida, por haberme dado una segunda oportunidad.

Índice

Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	3
Cáncer.....	3
Tipos de cáncer.....	3
Carcinomas	3
Sarcomas	4
Leucemias y linfomas.....	4
Los “Hallmarks” del Cáncer.....	4
Autosuficiencia a señales de crecimiento.....	5
Evasión de las señales anti-proliferativas	5
Evasión de la apoptosis.....	6
Inmortalidad celular	6
Inducción de la angiogénesis	7
Invasión y metástasis	7
Inestabilidad genómica.....	9
Inflamación tumoral	9
Reprogramación del metabolismo energético	9
Evasión de la respuesta inmune	10
El genoma del cáncer.....	11
Cáncer de páncreas	12
Tipos de cáncer de páncreas	13
Adenocarcinoma ductal pancreático	14
Epidemiología del PDAC.....	14
Factores de riesgo.....	15
Clasificación histológica	16
Biología molecular del PDAC.....	16
Heterogeneidad tumoral del cáncer de páncreas	17
Células troncales tumorales	21
Antecedentes.....	24
Justificación	26
Hipótesis.....	27

Objetivos.....	28
Objetivo General.....	28
Objetivos específicos	28
Metodología	29
Cultivo celular	30
Evaluación de la calidad.....	30
Evaluación de la cantidad	30
Filtrado de la suspensión celular	30
Carga de la suspensión celular y los “beadbarcodes”	31
Encapsulamiento en ddSEQ y RT-PCR.....	32
Validación de resultados mediante citometría de flujo	32
Análisis de los datos.....	33
Resultados	34
Discusión.....	47
Conclusiones.....	50
Literatura citada	51

Resumen

El adenocarcinoma ductal pancreático, el subtipo histológico más común del cáncer de páncreas, se ubica como el décimo segundo tipo de cáncer más común a nivel mundial, y como el séptimo con mayor mortalidad, esto se debe entre otras cosas a la etapa en la cual generalmente se lleva a cabo el diagnóstico, puesto que en etapas muy avanzadas, la cirugía y la quimioterapia ya no son opciones viables, además de la alta heterogeneidad tanto inter como intra-tumoral que lo caracteriza. Para evidenciar dicha heterogeneidad en una línea celular de adenocarcinoma ductal pancreático, empleamos la técnica de secuenciación de célula única (Single-cell RNAseq), obteniendo el transcriptoma completo de 2,003 células individuales, lo cual posteriormente fue analizado con el software comercial SeqGeq v.15 de Flo Jo., mediante los diferentes algoritmos que ofrece el programa, logramos identificar las diferentes subpoblaciones dentro de la línea celular, de las cuales una de ellas fue la que mostró la mayor expresión diferencial. Además se buscó una firma genética reportada por otro grupo de investigación, con la cuál fuimos capaces de identificar dos poblaciones, una de las cuáles se encontraba en proliferación.

Con lo anterior en este trabajo pudimos concluir que la heterogeneidad intra-tumoral existe incluso dentro de una línea celular, la cuál carece de los diversos factores que aporta el microambiente tumoral, el cuál se sabe que de igual manera es responsable de la heterogeneidad en los tumores.

Abstract

The pancreatic ductal adenocarcinoma, the most common histologic subtype of pancreatic cancer, is the 12th most common type of cancer worldwide, and the 7th with the highest mortality, this is due in part to the stage in which is diagnosed, since in late stages the surgery and chemotherapy are not options, in addition to the high inter and intra-tumoral heterogeneity that is characteristic in this disease. To delineate the pancreatic cancer intra-tumoral heterogeneity in a cell line of pancreatic ductal adenocarcinoma, we have used the technique of single-cell RNAseq, obtaining the transcriptome of 2,003 single cells, the data were analyzed with the software SeqGeq v1.5 Flow Jo., and with the different algorithms that this offer we successfully identify the different subpopulations of which the cancer cell line is composed; at least one subpopulation had the highest differential gene expression. Furthermore, we have searched for a genetic signature reported by another research group, with which we were able to identify at least two subpopulations in the cell line, one of this was in proliferation.

With the above, in this work we conclude that the intra-tumoral heterogeneity exist even in a cancer cell line, wich lack of the several factors provided by the tumor microenvironment, wich are very important to mantain the tumoral heterogeneity.

Introducción

Cáncer

El cáncer es responsable de una de una de cada ocho muertes en el mundo. Este comprende más de 100 tipos diferentes con diversos factores de riesgo y epidemiológicos. El cáncer puede originarse de prácticamente cualquier tipo celular y órgano del cuerpo humano, y se caracteriza por células con una proliferación descontrolada que pueden invadir más allá de los límites del tejido normal y migrar a órganos o tejidos distantes, un proceso conocido como metástasis.

Anteriormente los tumores eran concebidos como cuerpos extraños que de alguna manera se habían establecido dentro de las personas afectadas por los mismos, hoy en día sabemos que los tumores, al igual que los tejidos normales, están compuestos por masas de células. Sin embargo, las células de las que se componen los tumores, han perdido en gran parte su arquitectura y su funcionalidad a diferencia de los tejidos normales circundantes. Esas diferencias histopatológicas, nos dieron la primera semilla de una idea que tomaría la mayor parte del siglo XX demostrar y es el hecho que los tumores se crean por células que han perdido su capacidad para formar tejidos que sean normales tanto en su función como en su forma. Dicho de una manera más simple, el cáncer es una enfermedad de células con un funcionamiento aberrante.

Los avances en la histopatología, ayudaron a establecer el vínculo entre el comportamiento clínico de un tumor, es decir el efecto que este tenía en el paciente y las características microscópicas del mismo, adicionalmente, algo muy importante que se logró con esto, fue categorizar a los tumores dependiendo del grado de agresividad que estos mostraran, dividiéndolos en dos clases, aquellos que crecían solo de manera local, sin afectar a otros órganos o tejidos, se les denominó como tumores benignos y aquellos que invadían tejidos cercanos y lograban hacer metástasis se les llamó malignos. Afortunadamente, en la gran mayoría de los casos se presentan tumores de tipo benigno, lo cual no compromete la vida de los pacientes afectados, a menos que el volumen del mismo sea tal que logre hacer presión sobre órganos vitales del cuerpo. Sin embargo, las muertes debido a tumores benignos son muy raras, la gran mayoría se deben a los tumores malignos, especialmente aquellos que logran hacer metástasis son responsables del 90% de las muertes por cáncer (Weinberg, 2014).

Tipos de cáncer

Carcinomas

La mayoría de los tumores surge de los tejidos epiteliales. Los epitelios son de gran importancia, y de ellos se derivan los tipos de cáncer humano más comunes, llamados carcinomas, responsables de cerca del 80% de las muertes por cáncer; incluidos en este grupo están los tumores del tracto gastrointestinal, como son el de estómago, colon,

esófago, y los de los intestinos grueso y delgado, adicionalmente, se encuentran los de piel, mama, hígado, pulmón, ovario, útero, próstata, páncreas, etc.

La mayoría de los carcinomas caen dentro de dos principales categorías, las cuales reflejan las funciones principales de los mismos. Algunos tejidos epiteliales tienen la función delinear las cavidades celulares, ya sea para protegerlas, o para marcar los límites entre estas, a los tumores que surgen este tipo de células epiteliales se les conoce como carcinomas de células escamosas. Por otro lado, muchos epitelios también contienen células especializadas que secretan sustancias dentro de las cavidades que estos delimitan, estas células epiteliales generan adenocarcinomas.

Sarcomas

De igual manera los tumores son capaces de surgir de otros tejidos o tipos celulares no epiteliales, como son aquellos que se derivan de tejido conectivo, como el hueso, tejido adiposo, entre otros, a estos se les conoce como sarcomas, un ejemplo de ello son los osteosarcomas, tumores derivados de los osteoblastos (células encargadas de remodelar y regenerar los huesos), este tipo de tumores se componen de células de tipo mesenquimal y representan solo el 1% de los casos de cáncer en la clínica.

Leucemias y linfomas

El segundo grupo de cáncer de células no epiteliales, tiene su origen en las células que constituyen el tejido sanguíneo (células hematopoyéticas), incluyendo a las células del sistema inmune. Este tipo de cáncer abarca a células destinadas a formar eritrocitos, linfocitos B y T y células plasmáticas. Las leucemias por ejemplo (del griego "*leukos*"=blanco), es un tipo de cáncer derivado de algunas de las células que componen dicho linaje hematopoyético, que a diferencia de los eritrocitos estas carecen de algún pigmento y son células que se mueven de manera libre por el sistema circulatorio. Los linfomas por otro lado, son malignidades que se componen exclusivamente de células del linaje linfoide (células B y T), que se van agregando para formar tumores sólidos y son más comúnmente encontrados en los nódulos linfáticos, que dispersos por el sistema circulatorio. Este tipo de tumores representan alrededor del 7% de la mortalidad asociada a cáncer en los Estados Unidos (Weinberg, 2014).

Los "Hallmarks" del Cáncer

A pesar de los diferentes tipos de tumores y su origen, las células que los componen comparten ciertos rasgos o características entre sí, los denominados "Hallmarks of Cancer" o sellos de identidad del cáncer, los cuales fueron descritos por Hanahan y Weinberg en el 2000 (Figura 1), quienes determinaron que eran 6 los rasgos que definían a las células cancerosas: la autosuficiencia a las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anti-proliferativas, invasión de tejidos y metástasis, angiogénesis sostenida, inmortalidad celular y evasión de la apoptosis. Adicionalmente, con los avances en la investigación del cáncer y la evidencia acumulada de 10 años, estos mismos autores añadieron 4 rasgos más a los sellos característicos del cáncer (Figura 2), como son la evasión de la respuesta inmune,

inflamación tumoral, inestabilidad genómica y reprogramación celular metabólica, los cuales se describirán brevemente a continuación.

Autosuficiencia a señales de crecimiento

Todas las células ya sea en un organismo o en un cultivo celular, requieren de ciertas señales mitogénicas para entrar en el proceso de división celular, el cual es un proceso que se encuentra altamente regulado, para poder mantener la función y la arquitectura tisular de los tejidos normales. Sin embargo la proliferación sostenida, es tal vez el rasgo más característico de las células tumorales y para lograrla éstas presentan diversas estrategias. Una de ellas por ejemplo es que logran producir sus propios factores de crecimiento, y después generar receptores específicos para los mismos y de esta manera conseguir una estimulación del crecimiento y proliferación celular autócrina. Adicionalmente, las células cancerosas pueden enviar señales que estimulen a las células normales que se encuentran dentro del estroma asociado al tumor, para que estas respondan de manera recíproca, dotándolas de diversos factores de crecimiento necesarios para estimular su proliferación. Otra estrategia que siguen las células cancerosas, es aumentar el número de proteínas receptoras sobre la superficie celular, consiguiendo así la activación del receptor con concentraciones del ligando que de otra manera no alcanzarían a desencadenar ningún efecto; se puede lograr el mismo resultado mediante la modificación de las moléculas del receptor, lo cual facilita su activación independiente del ligando. Su proliferación independiente de factores de crecimiento también puede derivarse de la alteración de los componentes “río abajo” del receptor para que estos se activen de forma constitutiva obviando la necesidad de la respuesta mediada por la unión receptor-ligando.

Evasión de las señales anti-proliferativas

Además de exhibir capacidades para mantener una proliferación celular de manera constante, las células tumorales también deben tener estrategias para hacerle frente a las decenas de vías que existen para regular de manera negativa dicha proliferación, muchas de esas vías, dependen de la acción de los genes supresores de tumor (GSTs). Los dos típicos GST son la proteína del retinoblastoma (RB) y TP53, estos actúan como nodos de control primario, dentro de dos circuitos regulatorios complementarios que gobiernan las decisiones de la célula para proliferar, o para activar la senescencia o apoptosis. En el caso de RB es una proteína que recibe señales inhibitorias de crecimiento y de esta manera impide que la células entre en la fase de división del ciclo celular, mientras que TP53, se encarga de funcionar como un sensor del estrés al que está siendo sometida la célula; si se genera un daño genómico excesivo, si no se tiene la cantidad de nucleótidos necesarios, o si las señales promotoras del crecimiento no son las óptimas, ésta puede ordenar que se detenga la división celular, hasta que las condiciones sean las adecuadas o el daño en el DNA haya sido reparado, sin embargo, en el caso de que el daño sea excesivo, puede ejecutar programas para enviar a la célula a apoptosis.

Evasión de la apoptosis

Se tiene bien establecido por diversos autores, que la muerte celular es una de las principales barreras contra el cáncer, ya que gracias a ésta se puede mantener la homeostasis en un tejido normal. Existen dos principales vías canónicas para activar la apoptosis, la vía extrínseca, la cual implica la unión de ligandos (Fas) con sus receptores (receptor Fas), y la vía intrínseca, mediada por factores que se originan al interior de la célula. En ambos casos, la cascada activa una de dos proteínas que normalmente se encuentran latentes, las caspasas efectoras 8 y 9 respectivamente, las cuales activan otras enzimas proteolíticas, mismas que comienzan la degradación de las proteínas que componen a la célula, culminando con la eliminación de la misma por las células que la rodean y por las células especializadas en su fagocitosis.

El circuito que controla la apoptosis, mantiene su balance gracias a proteínas tanto anti como pro-apoptóticas, ambas son miembros de la familia Bcl-2. Las proteínas que se encargan de inhibir el proceso de muerte celular (Bcl-w, Bcl-x_L, Mcl-1 y A1), funcionan uniéndose e inhibiendo a sus contrapartes (Bax y Bak), los cuales se encuentran en la membrana externa de la mitocondria, una vez que son inhibidos, provocan una alteración estructural en dicha membrana, ocasionando la liberación de diversos componentes, siendo el citocromo-c el más importante de todos, ya que éste junto con Apaf-1 forman el apoptosoma y este a su vez se encarga de activar a la pro-caspasa 9 en caspasa 9 dando lugar a toda la cascada de muerte celular.

Las células cancerosas han desarrollado múltiples estrategias para evadir los programas de muerte celular antes mencionados, entre los cuales podemos encontrar la inactivación de TP53, el cual como vimos anteriormente una de sus funciones es evaluar el daño al DNA, si el daño es irreparable puede mandar a la célula a apoptosis mediante la sobre-expresión de proteínas como son Noxa y PUMA. Otra estrategia que pueden seguir las células tumorales es aumentar los niveles de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-x_L), o de señales de supervivencia, mediante la disminución de proteínas apoptóticas (Bax, Bim, Puma) o a través de la alteración en los receptores de muerte celular.

Adicionalmente existen otros mecanismos para la eliminación de células que han sido comprometidas para los cuáles las células tumorales también han adquirido la capacidad de evadir, como la autofagia por ejemplo, en la cual las células provocan la ruptura de organelos celulares como el retículo endoplásmico o la mitocondria para utilizar sus metabolitos y reutilizarlos. En este proceso los autofagosomas envuelven al resto de organelos celulares y los fusionan con los lisosomas para su posterior degradación. En función de esto, las células tumorales han desarrollado diferentes mecanismos para inhibir o atenuar este proceso.

Inmortalidad celular

Desde el año 2000, es ampliamente aceptado que las células tumorales necesitan de un potencial proliferativo ilimitado, con el fin de generar un tumor de gran tamaño. Por el

contrario las células de manera normal no tienen la capacidad de dividirse de manera ilimitada. Esta limitación ha sido asociada con dos grandes barreras para la proliferación: la senescencia, un estado estable pero incapaz de entrar en división celular, y la crisis, la cual provoca la muerte celular. En concordancia con esto, cuando las células son propagadas en cultivo, repetidos ciclos de división celular llevan primero a una fase de senescencia celular, y posteriormente para aquellas células que logran evadir con éxito esta barrera, a una fase de crisis, en la cual la mayoría de la población muere. En algunas raras ocasiones, algunas células que emergieron de la fase de crisis, exhiben un potencial replicativo ilimitado, este es un término llamado inmortalidad.

Existe una gran cantidad de evidencia que establece que los telómeros están implicados en la adquisición de un potencial proliferativo ilimitado. Estos se componen de secuencias repetidas en tándem de hexanucleótidos, mismas que se van haciendo más cortas en las células no inmortalizadas; esto debido a que la telomerasa, la polimerasa que se encarga de añadir secuencias de DNA a los telómeros que se encuentran en los extremos de los cromosomas, está prácticamente ausente. Una vez que las dichas secuencias se vuelven demasiado cortas, son incapaces de proteger los extremos de los cromosomas, esto provoca que los telómeros de un cromosoma tiendan a fusionarse con los extremos de otros cromosomas. Esta polimerasa se encuentra prácticamente ausente en las células no inmortalizadas, pero se expresa en niveles funcionalmente significativos en la gran mayoría (~90%) de las células inmortalizadas así como en las células tumorales. Mediante la adición de DNA telomérico, esta enzima es capaz de evitar el acortamiento de los telómeros, que ocurriría en su ausencia.

Inducción de la angiogénesis

Al igual que los tejidos normales, los tumores necesitan de un suplemento de nutrientes y oxígeno, además de una manera para deshacerse de los productos de desecho. Esto lo puede lograr gracias a la formación de vasos sanguíneos mediante el proceso de angiogénesis. Sin embargo, este proceso en los humanos adultos, se encuentra de forma quiescente, activándose solamente en el caso del cierre de heridas o en el ciclo reproductivo de las mujeres, pero solo de forma transitoria. Por el contrario, durante el desarrollo tumoral, la angiogénesis se encuentra permanentemente “encendida”, ocasionando que la vasculatura normalmente quiescente, se vuelva a un estado de generación de nuevos vasos sanguíneos continua, lo que ayuda a mantener el crecimiento neoplásico en expansión.

Invasión y metástasis

Ya sea en los estadios tempranos o tardíos del desarrollo de la mayoría de los tipos de cáncer, los tumores necesitan adquirir la capacidad para poder invadir tanto tejidos sanos adyacentes, como tejidos u órganos distantes, lo cual es conocido como metástasis, esta capacidad se ha visto que está presente en gran parte de tumores con una alta agresividad y que es responsables del 90% de las muertes por cáncer. Para conseguir esto, las células tumorales necesitan ser sometidas a un programa celular conocido como transición epitelio

mesénquima (EMT por sus siglas en inglés), dicho programa le confiere las herramientas necesarias para poder diseminarse, como por ejemplo dotarlas de enzimas que degraden la matriz extracelular. Es bien sabido que las moléculas de adhesión celular (CAMs, por sus siglas en inglés), también juegan un papel importante dentro de este rasgo, ya que la E-caderina por ejemplo, se ha visto que es de vital importancia en los tejidos normales, debido a que ayuda a mantener las interacciones célula-célula, regulando de manera positiva la homeostasis celular, y funcionando como un antagonista de la invasión y metástasis, sin embargo en algunos tipos de carcinoma, esta proteína se encuentra ausente, favoreciendo tales procesos. Cabe destacar que una vez que las células se han establecido en otro órgano o tejido distantes, estas necesitan adquirir todos los rasgos del cáncer que se mencionaron anteriormente.

Los múltiples pasos en el proceso de invasión y metástasis han sido esquematizados como una secuencia de pasos discretos, algunas veces denominados la cascada de invasión-metástasis. Esta representación prevé una sucesión de cambios biológicos en las células, comenzando con una invasión local, seguido de una intravasación de las células cancerosas en los vasos sanguíneos y nódulos linfáticos cercanos, el tránsito de las células por los sistemas hematológico y linfático, para después escapar del lumen de dichos vasos hacia el parénquima de tejidos distantes (extravasación), la formación de pequeños nódulos de células tumorales (micro-metástasis), para llegar finalmente al crecimiento de dichas micro-lesiones en tumores macroscópicos, un proceso conocido como colonización (Hanahan and Weinberg, 2000).

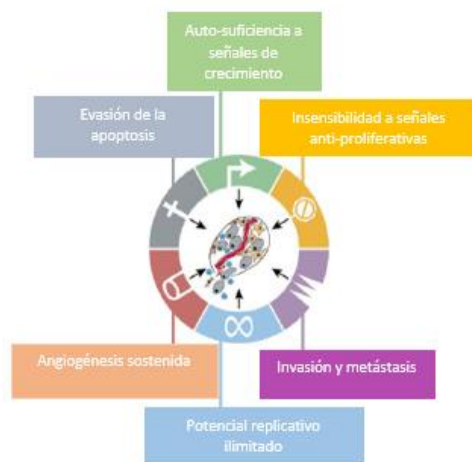


Figura 1. Se muestran los primeros 6 sellos característicos del cáncer (Hallmarks). Modificada de (Hanahan and Weinberg, 2000).

Adicionalmente, se han establecido dos rasgos más, mismos que son exhibidos por la mayoría o todos los tipos de cáncer, estos son la reprogramación metabólica y la evasión de las células del sistema inmune, sobre todo de los linfocitos B y T. De igual manera se añadieron dos rasgos que pudieran estar favoreciendo tanto estos dos últimos como los mencionados anteriormente, tal como la inestabilidad genómica y la inflamación tumoral.

Inestabilidad genómica

La estabilidad genómica es esencial para la integridad celular para prevenir errores en la replicación del DNA del estrés genotóxico endógeno tal como las especies reactivas del oxígeno (ERO) resultantes del metabolismo celular, además de los carcinógenos exógenos; por ejemplo, la luz ultravioleta, radiación ionizante o químicos que pueden dañar el DNA. Se cree que la iniciación tumoral y la progresión resultan de la adquisición de alteraciones genómicas por parte de las células normales, con la consecuente selección de clonas cada vez más agresivas (Nowell 1976). La población de células tumorales parece ser genéticamente más inestable que las células normales. Dicha inestabilidad genómica les proporciona un ciclo celular más corto así como formas para evadir los sistemas de control tanto intracelulares como inmunológicos, dando así a las células tumorales una ventaja en cuanto a su crecimiento y la posibilidad de ser seleccionadas como células transformadas malignas. La inestabilidad genómica incluye variaciones en la estructura tal como un aumento en la frecuencia de las mutaciones de bases, inestabilidad microsatelital, así como variaciones como un cambio en el número o la estructura de los cromosomas, también llamada inestabilidad cromosómica.

Inflamación tumoral

Los patólogos habían reconocido ampliamente que algunos tumores están densamente compuestos por células del sistema inmune, tanto de la respuesta innata como adaptativa, sin embargo, gracias a que ha ido mejorando la precisión de los marcadores con los que se detectan tales células, ahora sabemos que prácticamente todas las lesiones neoplásicas presentan diferentes rangos de infiltración de estas células, desde cantidades apenas detectables, hasta aquellas que son aparentes incluso con métodos de detección muy básicos. Históricamente, tales respuestas inmunes se pensaba eran el reflejo de un intento del sistema inmune para eliminar a los tumores. En el 2000, ya existían algunas pistas de que la respuesta inflamatoria asociada a los tumores tenía un efecto paradójico no anticipado de potenciar tanto la tumorigénesis como la progresión tumoral, y en efecto ayudar a las neoplasias incipientes a ir adquiriendo los sellos característicos del cáncer ya anteriormente mencionados.

Reprogramación del metabolismo energético

La proliferación celular crónica y no controlada que representa la esencia de la enfermedad neoplásica involucra no solamente una alteración en el control de la proliferación celular sino también los ajustes correspondientes del metabolismo energético con el fin de ser el combustible de la división y el crecimiento celular. Bajo condiciones aeróbicas, las células normales procesan la glucosa, a través de la glucólisis para dar lugar a piruvato en el citoplasma para después entrar en el ciclo de Krebs en la mitocondria; bajo condiciones anaeróbicas, la glucólisis se ve favorecida y la cantidad de piruvato que se utiliza hacia la mitocondria es relativamente poco. Sin embargo, Otto Warburg fue el primero en observar una característica anormal del metabolismo energético de las células tumorales (Warburg, 1956), y es que incluso en presencia de oxígeno, las células tumorales pueden reprogramar

la manera en la que metabolizan la glucosa, y su producción de energía, se encamina a la vía glucolítica, llevándola a un estado que ha sido denominado como “glucolisis aeróbica”.

Curiosamente, se ha encontrado que algunos tumores contienen dos sub-poblaciones de células tumorales que difieren en las vías metabólicas. Una de estas poblaciones es dependiente de glucosa (“Efecto Warburg”) y secretan lactato, mientras que las células de la segunda población preferencialmente importan y utilizan el lactato secretado por sus células vecinas como su principal fuente energética, empleando parte del ciclo del ácido cítrico para hacerlo, ambas poblaciones son evidentemente simbióticas, una de ellas emplea la glucosa como su principal fuente de energía y produce lactato como desecho el cual es importado y utilizado como combustible por sus hermanas.

Evasión de la respuesta inmune

Uno de los puntos que permanece todavía sin resolver alrededor de la formación tumoral involucra el papel que el sistema inmune juega en resistir o erradicar la formación y progresión de las neoplasias incipientes, los tumores avanzados y las micro-metástasis. La teoría más antigua de la vigilancia inmune propone que las células y los tejidos son constantemente monitoreados por un sistema inmune que se encuentra siempre alerta, y que tal vigilancia inmune es responsable del reconocimiento y la eliminación de la gran mayoría de células tumorales incipientes y por tanto de los tumores en formación.

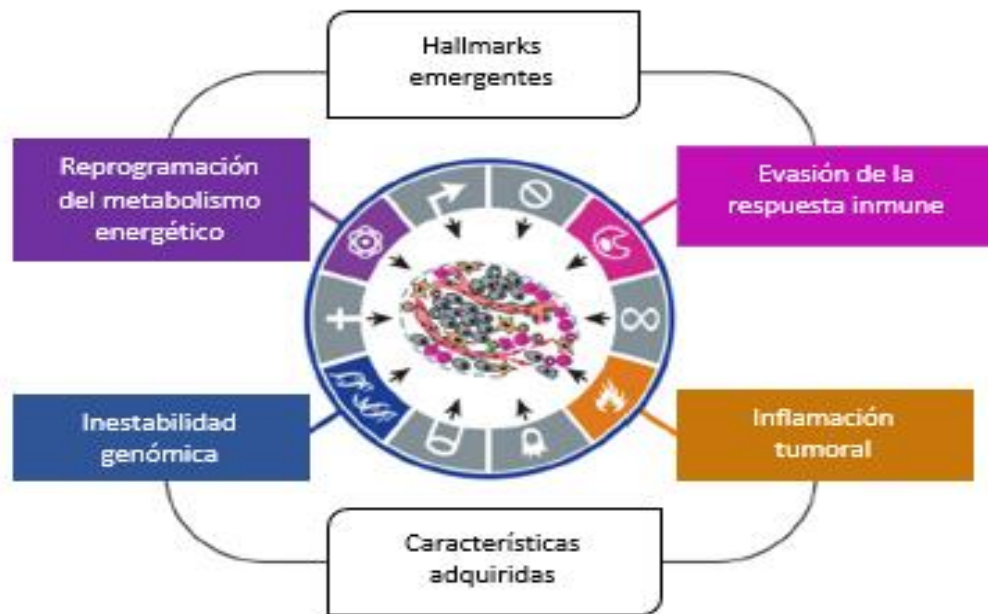


Figura 2. Los “Hallmarks” emergentes y los rasgos que los favorecen. Toda la información acumulada de la investigación en cáncer ayudó a establecer dos rasgos adicionales a los anteriormente propuestos, además de dos características adicionales que podrían facilitar la adquisición y el mantenimiento tanto de los primeros 6 rasgos como de estos dos últimos. . Modificada de (Hanahan and Weinberg, 2011).

Siguiendo esta lógica, los tumores sólidos podrían tener alguna manera de evadir la detección de las diversas defensas del sistema inmune o han obtenido la capacidad de limitar la extensa destrucción inmunológica (Hanahan and Weinberg, 2011).

El genoma del cáncer

Desde hace tiempo se sabe que la tumorigénesis tanto en humanos como en animales es el resultado de un proceso multi-etapa que se ve reflejado como cambios o alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen la progresión de la enfermedad. Evidencia de esto es el hecho de que diversos tipos de cáncer se han asociado en la población humana con una incidencia dependiente de la edad, incluso se han realizado modelos matemáticos, los cuales estiman de 4 a 7 eventos estocásticos (Hanahan y Weiberg, 2000; Renan, 1993). Un ejemplo de esto es que algunos autores consideran que no todas las células dentro de un compartimento o tejido, tienen la capacidad o el riesgo de volverse neoplásicas, en el caso de las células diferenciadas por ejemplo, no tendrían la capacidad para dividirse el suficiente tiempo como para acumular un determinado número de mutaciones en los genes con susceptibilidad al cáncer (Michor et al., 2004).

Adicionalmente, existe la noción de que conforme las células normales van evolucionando progresivamente hacia un estado neoplásico, estas adquieren los sellos característicos del cáncer y que dicho proceso multi-etapa del desarrollo tumoral es el resultado de que las incipientes células tumorales tienen la necesidad de adquirir las ventajas necesarias que les permitan volverse tumorigénicas y finalmente malignas (Hanahan and Weinberg, 2011).

Se piensa que todos los tipos de cáncer comparten una patogénesis en común. Cada uno es el resultado de un proceso de evolución Darwiniana que está ocurriendo entre las poblaciones celulares dentro del microambiente que proporciona el tejido de un organismo multicelular. Análogo a la evolución Darwiniana que ocurre en el origen de las especies, el desarrollo del cáncer está basado en dos procesos constituyentes, la continua adquisición de variaciones genéticas heredables en las células individuales por mutaciones más o menos aleatorias y la selección natural actuando sobre la diversidad fenotípica resultante. La selección puede eliminar células que han adquirido mutaciones deletéreas o esta puede fomentar que las células acarrean alteraciones que les confieran la capacidad de proliferar y sobrevivir más efectivamente que las células vecinas.

Con lo anterior podemos concluir que el cáncer es una enfermedad genética. Debido a que aunque existen factores tanto ambientales como algunos otros no genéticos que juegan cierto papel dentro de los diferentes estadios de la progresión tumoral, es ampliamente aceptado que el cáncer surge debido a mutaciones en genes que son susceptibles al cáncer. Estos genes los podemos dividir de manera general en tres clases: los guardianes, los cuidadores y los paisajistas. Los guardianes tienen la función de regular directamente las vías de crecimiento y diferenciación celular y estos se componen de oncogenes, los cuales

representan una ganancia funcional a la célula, y genes supresores de tumor (GSTs), estos representan una pérdida de función, ya que son los que evitan que las células proliferen de manera descontrolada, como es el caso de p53. Los cuidadores por otro lado, pueden promover la tumorigénesis de manera indirecta, ya que estos están encargados de mantener la integridad genómica. Las mutaciones en alguno de estos genes podría llevar a inestabilidad genómica y la célula rápidamente acumularía mutaciones en otros genes que de manera directa controlan el nacimiento y la muerte celular. Los paisajistas, si bien no tienen un efecto directo sobre el ciclo celular o la proliferación, alteraciones en estos genes llevan a la modificación anormal del microambiente estromal, lo cual contribuye a la transformación neoplásica de las células. Sin embargo, debemos de tener en cuenta que la alteración o mutación de uno solo de los genes anteriormente mencionados, no es suficiente para la aparición de un cáncer como tal, sino que se necesitan de más “hits” mutacionales que favorezcan la invasión y malignidad de las células. De este modo, el riesgo de desarrollar cáncer depende no solo de mutaciones sobre genes iniciadores de la tumorigénesis sino también de genes que la conduzcan (Michor et al., 2004).

Cáncer de páncreas

El páncreas posee dos compartimentos celulares funcionales, el endocrino y exocrino. El páncreas exocrino se compone de células centro-acinares, ductales y acinares. Un epitelio del tronco pancreático indiferenciado, llamado cordones pancreáticos, está presente durante las primeras etapas del desarrollo embrionario; las células de dichos cordones pancreáticos proliferan y se diferencian en los linajes endocrinos y exocrinos. Las células ductales, se encuentran normalmente quiescentes en el páncreas adulto, forman una intrincada red de ductos que representan los conductos para el flujo de enzimas digestivas secretadas por las células acinares. Las células acinares tienen la responsabilidad de secretar las enzimas digestivas y estas representan el tipo celular más abundante en el páncreas; estas tienen una plasticidad intrínseca con la cual ellas son capaces de someterse a una metaplasia para dar lugar a células ductales o células de tipo ductal: este proceso es conocido como metaplasia acinar-ductal y ocurre durante una pancreatitis crónica o aguda y puede representar el paso inicial hacia la neoplasia (Pelosi et al., 2017). El páncreas normal consiste de células acinares que están secretando enzimas digestivas, células ductales que secretan bicarbonato, células centro acinares que son la transición geográfica entre las células acinares y las ductales, islotes endocrinos secretores de hormona y células estelares relativamente inactivas. En general se ha aceptado que el cáncer de páncreas tiene su origen en las células ductales, sin embargo esta es una cuestión que sigue bajo investigación (Bardeesy and DePinho, 2002, Kleeff et al., 2016).

El cáncer de páncreas se encuentra en la posición 12 de los tipos de cáncer más comunes y se posiciona como la cuarta más común de muerte por cáncer a nivel mundial. En el caso de México se tienen registrado un total de 4,849 nuevos casos colocándolo de igual manera

en el lugar doce, y con casi la misma cantidad de muertes (4,475), lo colocan como la séptima causa de muerte por cáncer y este presenta una sobrevivida de más de 5 años de alrededor de 9% a nivel mundial y de 2.40% en México. Esto lo convierte en una de las neoplasias con peor pronóstico, en parte debido a que la mayoría de los pacientes no presentan síntomas en el comienzo de la enfermedad, por lo cual al momento de ser diagnosticados, ya se encuentran en un estado muy avanzado en donde es imposible la cirugía que es la única manera en que es posible curar este cáncer y las terapias convencionales como quimio y radio terapia en general no surten efecto, hecho que se cree es debido a la alta heterogeneidad intra-tumoral que muestra, de lo cual hablaremos más adelante (Bardeesy and DePinho, 2002, Tsai and Chang, 2019, Bray et al., 2018).

Tipos de cáncer de páncreas

Dentro de las neoplasias que afectan al páncreas encontramos diferentes subtipos mismos que se diferencian de acuerdo a sus características histológicas así como por las mutaciones que sufre cada uno (Figura 3). La mayoría de estas neoplasias malignas son adenocarcinomas; son escasas las neoplasias pancreáticas que incluyen tumores neuroendocrinos (los cuales pueden secretar hormonas tales como la insulina o el glucagón) o carcinomas acinares (los cuales pueden liberar enzimas digestivas dentro de la circulación). Incluso menos comunes son las neoplasias de carcinomas coloidales, pancreatoblastomas y neoplasias pseudopapilares sólidas.

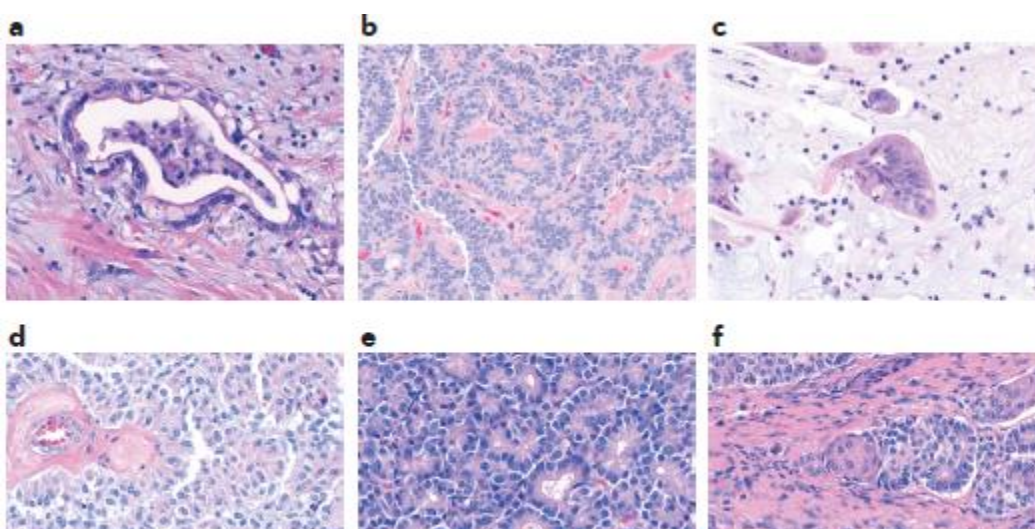


Figura 3. Las diferencias histológicas en los tipos de cáncer de páncreas. El más frecuente de todos, el adenocarcinoma (~90% de todos los casos de cáncer pancreático), se caracteriza por glándulas neoplásicas atípicas dentro de un estroma denso (a). Los segundos más comunes son los tumores neuroendocrinos (entre el 15 y 20%) caracterizados por un patrón de crecimiento en nido, además de expresar los marcadores neuroendocrinos sinaptofisina y cromogranina (b). Los carcinomas coloides (presentes en el 2% de los casos) caracterizados por la formación de grupos de mucinas en el estroma (c). Tumores pseudopapilares sólidos (con una incidencia del 2%) se caracterizan por estar formados de células pobremente cohesivas (d). Carcinomas de células acinares (tan solo se presentan en el 1% de los casos) contienen células con citoplasma granular y un solo núcleo prominente (e). Finalmente el pancreatoblastoma (0.5%) presenta células neoplásicas con diferenciación acinas y nidos escamosos (f). El resto de los tumores de páncreas incluyen variantes tales como adenoescamosos, hepatoideas, medulares, carcinomas indiferenciados.

Adenocarcinoma ductal pancreático

De los mencionados anteriormente, el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC por sus siglas en inglés) es el más común de todos, presentándose entre el 85 y 90% de los casos de cáncer pancreático. Esta neoplasia ha sido asociada con un muy pobre pronóstico debido a diferentes razones. Una de ellas es que su detección generalmente se da en estados muy avanzados de la enfermedad, momento en el que la cirugía o las terapias son ineficientes, y esto se debe en gran parte a que carece de síntomas o estos no son del todo específicos, además de la falta de marcadores tumorales específicos o la carencia de sensibilidad en los mismos. Este es un tipo de cáncer muy agresivo además de que presenta resistencia a la mayoría de terapias convencionales como la quimioterapia y radioterapia, la terapia inmunológica, estos factores ocasionan que la tasa de supervivencia de 5 años sea menor al 7% (He et al., 2014).

Epidemiología del PDAC

En el 2018 se diagnosticaron un estimado de 459,000 nuevos casos de PDAC en todo el mundo, y casi el mismo número de defunciones (432,000), esta incidencia lo convierten en la séptima causa de muerte por cáncer pancreático tanto en hombres como en mujeres, y

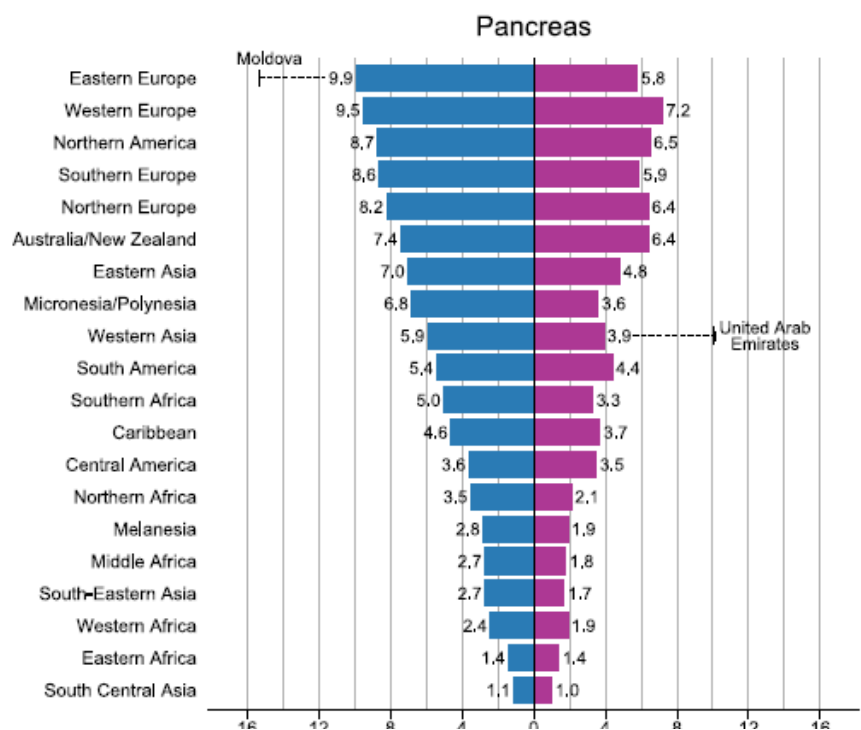


Figura 4. Mortalidad del adenocarcinoma ductal pancreático a nivel mundial tanto en hombres como en mujeres. Tomado de (Bray et al., 2018)

estas cifras son de 3 a 4 veces más altas en las ciudades desarrolladas, las tasas más altas las presentan Europa, Norteamérica y Australia/Nueva Zelanda (Figura 4) (Bray et al., 2018). Se tiene previsto que esta neoplasia se coloque como la segunda causa de muerte por cáncer en la próxima década si las cifras continúan aumentando como hasta ahora (recientemente superó al cáncer de mama como la tercera causa de muerte en los Estados Unidos).

Factores de riesgo

Se han asociado diversos factores de riesgo a esta enfermedad, sin embargo pocos de ellos son modificables, siendo la edad el mayor determinante en la aparición de cáncer pancreático, ya que la mayoría de los pacientes son diagnosticados después de los 50 años de edad, observándose un pico de incidencia en la séptima y octava década de la vida. En términos de prevención el cigarrillo es el más importante y uno de los más estudiados puesto que incrementa en más del doble el riesgo en un individuo, a diferencia de los no fumadores, y la incidencia atribuible al humo del tabaco ha sido estimada entre un 15 y 30%, no obstante a diferencia de otras enfermedades relacionadas con el cigarro, no se han encontrado firmas mutacionales relacionadas con carcinógenos que afecten al DNA (Alexandrov et al., 2013, Bosetti et al., 2012). La historia familiar tiene un papel bien establecido en la probabilidad de desarrollar PDAC, ya que el 10% de los pacientes tiene antecedentes familiares de la enfermedad (Petersen, 2016). Mutaciones en la línea germinal de igual manera han sido asociadas con un aumento en el riesgo del PDAC, como el caso de algunos genes relacionados con el cáncer de mama y de ovario (*BRCA1* y *BRCA2* o *PALB2*). Por otro lado mutaciones en los genes de reparación del DNA como *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* también son asociados con aumento en el riesgo de desarrollar esta enfermedad (Hu et al., 2018).

La obesidad y la poca actividad física también han sido asociadas con el PDAC. Algunos factores nutricionales y dietéticos, incluyendo la alta ingesta de grasas saturadas, combinado con la poca ingesta de frutas y verduras y el consumo de carnes rojas y procesadas han sido catalogados como factores de riesgo. Además el consumo excesivo de alcohol ha mostrado una asociación positiva con el desarrollo de esta enfermedad, ya que se le ha relacionado con pancreatitis crónica, misma que aumenta el riesgo de cáncer pancreático en más de 10 veces, por el contrario tal asociación no se ha mostrado en la ingesta moderada del mismo. La diabetes tipo 2 (diabetes mellitus) es tanto un riesgo como una consecuencia de la aparición temprana de cáncer pancreático; esta enfermedad puede ser ocasionada por la aparición del cáncer (diabetes tipo 3c) y, como consecuencia, la aparición de la diabetes mellitus puede ser el primer indicio de un diagnóstico de cáncer pancreático en pacientes de edad avanzada (Bosetti et al., 2014, Chari et al., 2008).

Clasificación histológica

En la inspección bruta, el PDAC se presenta como una masa firme de color amarillento, pobremente demarcada, con la parte no maligna del páncreas que lo rodea típicamente mostrando atrofia, fibrosis y los ductos dilatados debido a los efectos obstructivos del carcinoma en expansión. Microscópicamente, esas neoplasias varían de carcinomas formando glándulas bien diferenciadas a “sarcomatoides” pobremente diferenciados diagnosticados solamente después de realizarle una inmunotinción debido a las características predominantemente mesenquimales (Hruban et al., 2007). Esta enfermedad evoluciona de lesiones precursoras bien definidas que, en el contexto de sus características genéticas, definen el modelo de progresión genética de la carcinogénesis pancreática (Yachida et al., 2010). La histología temprana de la enfermedad se puede manifestar como distintos tipos de lesiones precursoras, las más comunes son las neoplasias intraepiteliales pancreáticas microscópicas (PanIN), seguidas por los quistes macroscópicos; denominados como neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN) y la neoplasia quística mucinosa (MCN) (Matthaei et al., 2011). Debido a que el PDAC se vuelve evidente en estados avanzados, las oportunidades de reducir la mortalidad o mejorar la supervivencia de los pacientes recae en el diagnóstico oportuno y en el tratamiento, esto permitiría la identificación de lesiones precursoras de alto riesgo y de esta manera poder comenzar con un tratamiento oportuno en etapas tempranas u optar por la cirugía del mismo.

Biología molecular del PDAC

La patología molecular del cáncer pancreático está caracterizado por la presencia de los cuatro genes más comúnmente mutados: *KRAS* (90%), *CDKN2A* (*p16*, 90%), *TP53* (70%) y *SMAD4* (55%). La transcripción del gen mutado *KRAS* determina la producción de una proteína RAS anormal y que se encuentra activada de manera constitutiva, ocasionando en consecuencia la activación descontrolada de vías relacionadas con la proliferación y supervivencia. Por otro lado, la activación frecuente del gen *CDKN2A* resulta en la pérdida de la proteína p16, un regulador negativo maestro de la transición de la fase G1 a S en el ciclo celular, lo que desencadena la estimulación de la actividad proliferativa. La inactivación del gen *TP53* le permite a la célula omitir algunos de los puntos de control más importantes del ciclo celular que tienen que ver con la reparación del daño al DNA o con la muerte celular programada. Finalmente, la inhibición del gen *SMAD4* una vía de señalización aberrante en TGF- β . También podemos encontrar algunos otros genes alterados, incluyendo *ARID1A*, *MLL3* y *TGFBR2*, en el 10% de los casos (Pelosi et al., 2017, Chang et al., 2014).

Otro gen que se encuentra comúnmente sobre-expresado en este tipo de cáncer es *AKT2*, además la actividad de su regulador “río arriba”, *PI3K* algunas veces se encuentra elevada, lo cual lleva a un aumento en la supervivencia del tumor (Altomare et al., 2002)

Heterogeneidad tumoral del cáncer de páncreas

Un factor clave que contribuye al resultado letal del cáncer, al fracaso terapéutico, y la resistencia a fármacos, es la heterogeneidad intra-tumoral (HIT) (Greaves, 2015). La HIT puede proporcionar materiales genéticos y epigenéticos sobre los cuales la selección y la evolución Darwiniana pueden actuar (McGranahan and Swanton, 2017).

Un tumor es una entidad heterogénea compuesta de diversos tipos de células entre las cuales podemos encontrar, células tumorales transformadas, células de soporte y células invasivas tumorales. Esta heterogeneidad intra-tumoral es además potenciada por la variación clonal y las influencias que el micro-ambiente tiene sobre las células tumorales, que tampoco representan un grupo homogéneo de células. Estudios anteriores han demostrado que los tumores contienen subclonas mismas que difieren entre ellas con respecto al cariotipo y la sensibilidad a la quimioterapia (Prasetyanti and Medema, 2017). Es importante destacar que la naturaleza de dicha heterogeneidad no se limita a la población de células cancerosas malignas, ya que un tumor es un ecosistema complejo que alberga células tumorales y otros tipos celulares, tales como células endoteliales, células del sistema inmune que se encuentran infiltradas, células estromales así como una compleja red de matriz extracelular (MEC), lo cual define las diferencias espacio-temporales dentro del micro-ambiente tumoral (Junttila and de Sauvage, 2013, Lu et al., 2012). Se ha propuesto que la heterogeneidad del micro-ambiente tumoral, puede estar determinando las capacidades del tumor y como tal, es probable que sean factores clave en el éxito del tratamiento.

Dicha heterogeneidad maligna está sustentada por la naturaleza misma de los tejidos, por ejemplo el páncreas está formado por células de carácter exocrino (acinares), epiteliales (ductales), y endocrinas (β , α , δ , ϵ) entre las cuales las células acinares son bien conocidas por su alto grado de plasticidad. Se ha considerado que dicha plasticidad es la responsable de mantener la homeostasis y la regeneración ya que – en contraste con otros órganos del sistema gastro-intestinal –, el páncreas al parecer carece de un compartimento bien definido de células troncales (Puri et al., 2015). Mediante un proceso denominado metaplasia de acinar a ductal (ADM por sus siglas en inglés), las células acinares pueden transdiferenciarse hacia un fenotipo epitelial (de tipo ductal) en el momento en que se experimenten ciertos estímulos macro y micro-ambientales, como por ejemplo un daño en el tejido, inflamación o condiciones de estrés (Kopp et al., 2012). Durante el proceso de ADM, las células acinares adquieren características de “células de tipo progenitor” lo que las hace más susceptibles a la transformación oncogénica, como la presencia de mutaciones activadoras en el proto-oncogen *KRAS*, lo que eventualmente las transforma en PanINs. Dicha transformación generalmente se ha considerado como el paso inicial en el desarrollo del adenocarcinoma ductal pancreático seguido por una progresión secuencial que involucra “hits” genéticos en diversos genes supresores de tumor (Figura 5) (Kanda et al., 2012). Diversos estudios han revelado que la heterogeneidad en esta enfermedad existe

tanto entre los individuos que la padecen (heterogeneidad inter-tumoral) como dentro del mismo tumor (heterogeneidad intra-tumoral) (Cros et al., 2018).

La heterogeneidad intra-tumoral del cáncer pancreático juega un papel de suma importancia, tanto en la progresión tumoral como en la resistencia a las diferentes terapias. Dicha heterogeneidad puede ser espacial, dentro del tumor primario, en la metástasis y el tumor primario, e incluso entre las metástasis mismas. La heterogeneidad temporal añade otro nivel de complejidad y se vuelve crucial cuando la selección clonal es inducida por las terapias. Reflejando la heterogeneidad intra-tumoral histológica, estudios anteriores han demostrado que el perfil transcripcional puede diferir (en más de 1000 genes) entre el centro del tumor y su periferia. Las firmas genéticas relacionadas con el citoesqueleto y la motilidad celular han sido halladas en la zona más lejana al centro del tumor, mientras que las relacionadas con la transcripción, la respuesta al estrés, y el metabolismo de carbohidratos han destacado en el centro del mismo (Kopp et al., 2012). En un trabajo de investigación se compararon las glándulas adyacentes de 4 diferentes tumores primarios de PDAC, y se encontró que la mayoría de las anomalías genéticas eran compartidas por todos los tumores, sin embargo, hubo algunas excepciones que fueron específicas de cada uno, lo cual demuestra los alcances que tiene la heterogeneidad tumoral (Gidekel Friedlander et al., 2009).

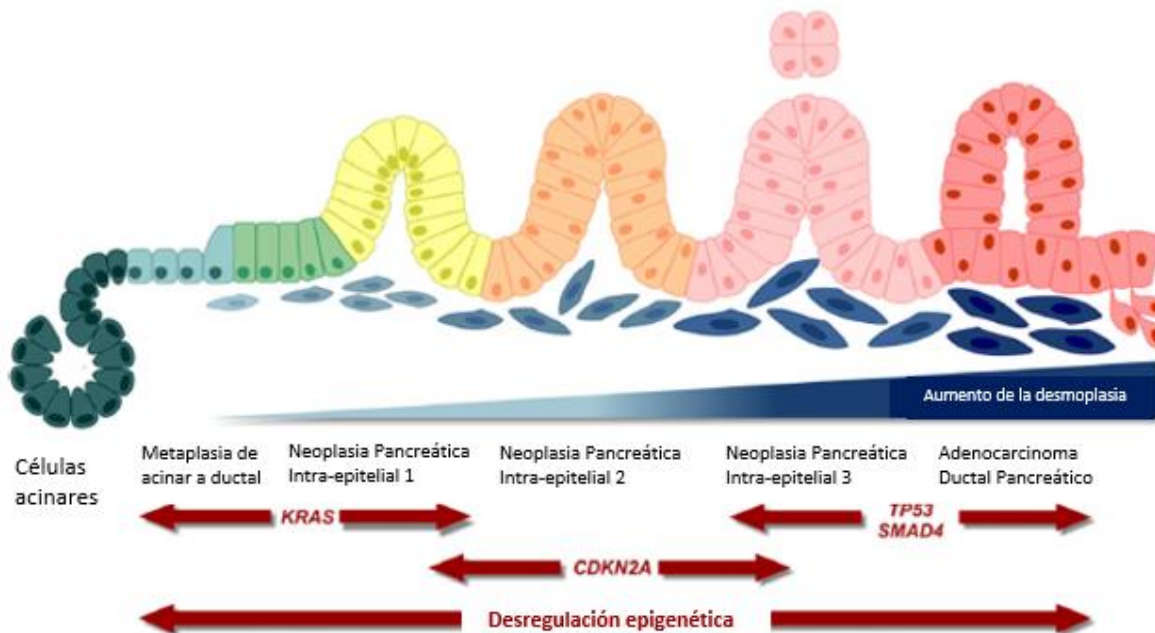


Figura 5. Esquema de las diferentes etapas de la carcinogénesis del Adenocarcinoma Ductal Pancreático (PDAC). Modificado de (Orth et al., 2019).

La heterogeneidad no solo se ha visto presente en las células tumorales sino en las células asociadas al tumor (Figura 6), como son los fibroblastos asociados a tumor (CAFs), de los

que algunos autores han demostrado la existencia de hasta cuatro subtipos diferentes de estas células, los cuales han sido asociados con características fenotípicas específicas además de su impacto en el pronóstico de la enfermedad (Neuzillet et al., 2019).

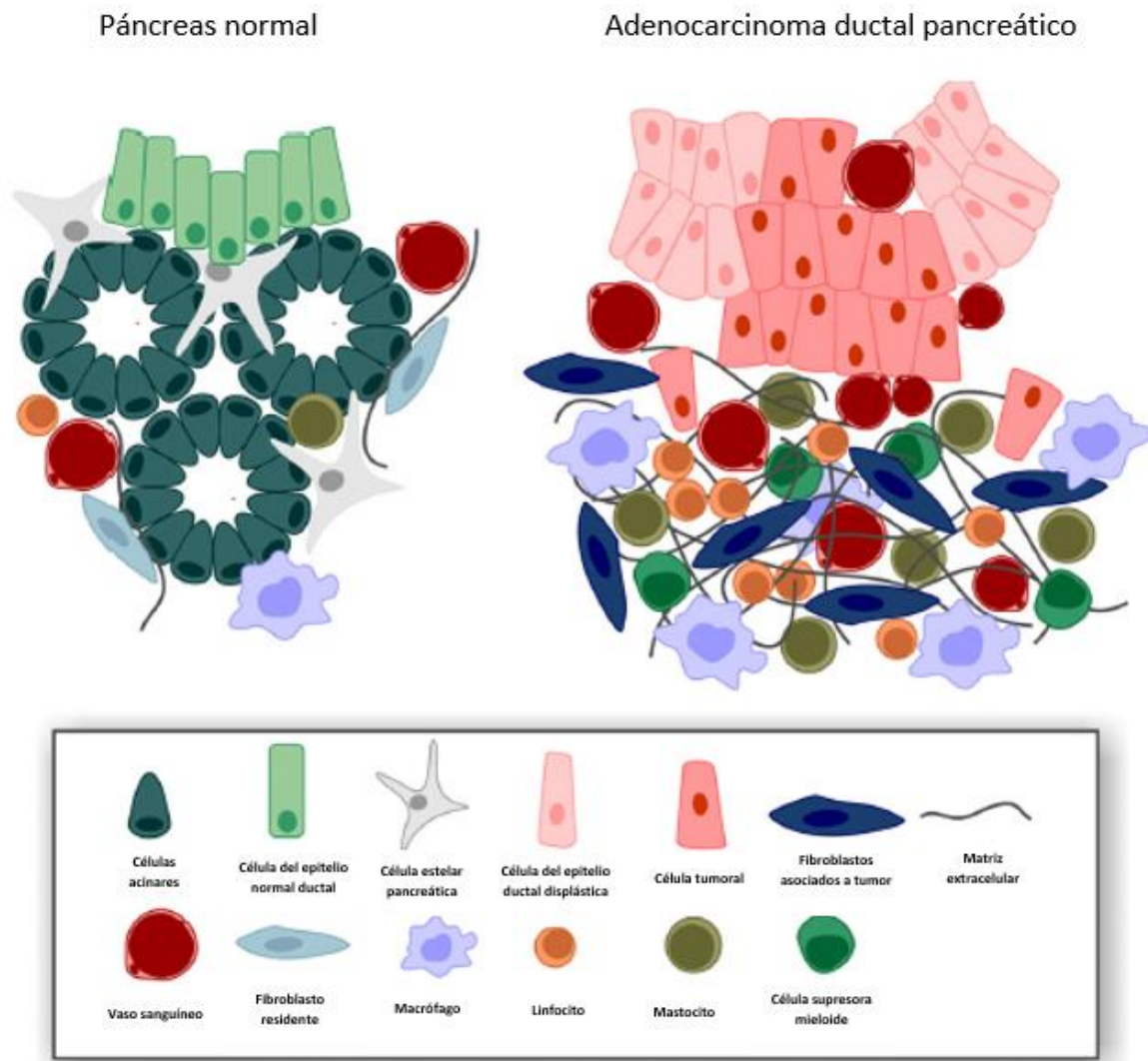


Figura 6. Panorama de los diferentes linajes celulares que componen tanto el tejido normal del páncreas como a su transición a desmoplasia. Modificado de (Orth et al., 2019).

Se han propuesto dos modelos para tratar de explicar la heterogeneidad dentro de un tumor. En el modelo de evolución clonal, propuesto por Peter Nowell en 1976, se establece que ocurren mutaciones estocásticas en células tumorales individuales y estas mismas pueden servir como una especie de plataforma para la adaptación y selección de las mejores clonas de un tumor. Como tal, este modelo explica la heterogeneidad tumoral como resultado de la selección natural. De esta manera, las clonas que adquieran ventajas en

función de su crecimiento se irán expandiendo mientras que las clonas con menos ventajas se irán eliminando hasta eventualmente quedar extintas. En el proceso, la iniciación del cáncer tiene lugar una vez que ocurren múltiples mutaciones en una célula de manera aleatoria, a la cual se le conoce como “célula transformada”. Esa célula transformada posee las ventajas de crecimiento y supervivencia selectivas antes mencionadas sobre las células normales adyacentes. Es importante destacar que, dichas ventajas pueden variar en tiempo y espacio dependiendo de los diferentes requerimientos que se encuentren en diferentes áreas del tumor. Algunas zonas tumorales pueden seleccionar clonas que respondan mejor a la hipoxia, mientras que otras regiones más densas en nutrientes pudieran seleccionar clonas de crecimiento rápido. Conforme la enfermedad avanza, dichas clonas pueden ir cambiando tanto espacial como temporalmente lo cual resulta en una arquitectura subclonal muy compleja, misma que a su vez puede ser potenciada por la terapia (Anderson et al., 2006, Sottoriva et al., 2010). A medida que el cáncer va progresando, nuevas alteraciones genéticas y epigenéticas llevan a la proliferación descontrolada y permiten la adquisición de un fenotipo más agresivo. En la proliferación subsecuente, la descendencia de esas células adquiere cambios genéticos y epigenéticos adicionales, los cuales a su vez promueven el crecimiento y la agresividad biológica de las células. Las células resultantes de esas divisiones subsecuentes continuarán dividiéndose hasta eventualmente superar en número a la población de células no agresivas. Con forme continúan las divisiones, las células irán adquiriendo mutaciones adicionales, creando poblaciones clonales genéticamente diversas, dando lugar a la heterogeneidad tumoral (Nowell, 1976). Dentro de este modelo, todas las células que componen al tumor, tienen la misma capacidad tumorigénica, son capaces de formar nuevos tumores, y de mantenerlos, y pueden producir la malignidad letal (Figura 7).

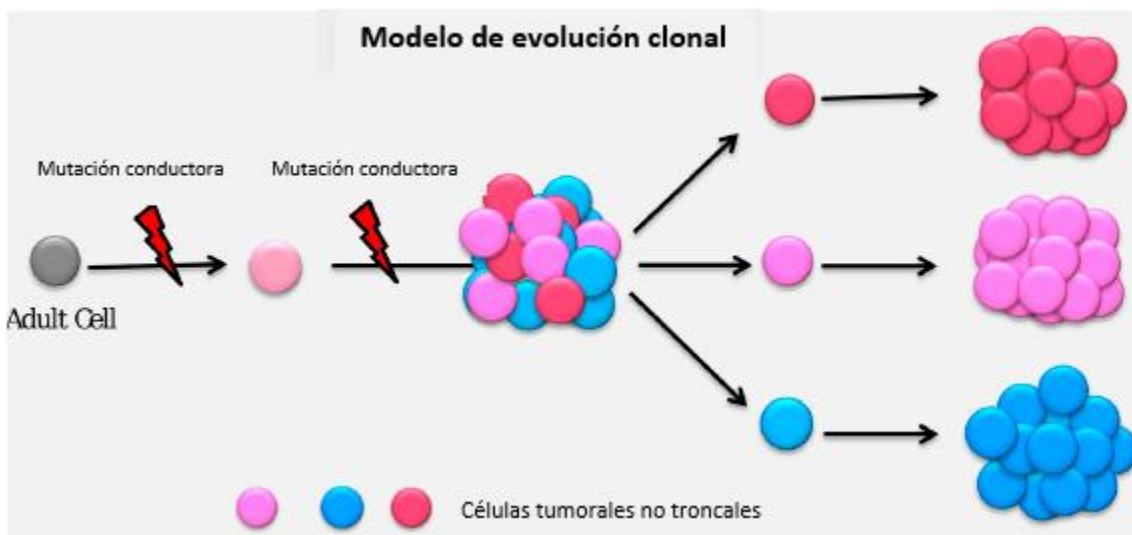


Figura 7. Modelo de evolución clonal que explica la formación de un tumor. Modificado de (Afify and Seno, 2019)

El segundo modelo que se ha propuesto para explicar la heterogeneidad intra-tumoral es el modelo de las células troncales cancerosas. Esta teoría sugiere que solo una pequeña población de células dentro del tumor es capaz de iniciar y mantener los tumores.

Células troncales tumorales

Las células troncales normales han sido descritas como células inmaduras que poseen una doble capacidad, la de auto-renovarse y el potencial de diferenciación. Las células troncales no fueron descubiertas por un científico o grupo de investigación en específico sino que este concepto fue el resultado de los esfuerzos realizados durante décadas por tratar de comprender su biología. Sin embargo la primera vez que se utilizó el término de “célula troncal” fue por un histólogo ruso llamado Alexander Maksimov, quien desarrolló e introdujo una teoría de la hematopoyesis a principios del siglo XX. En un principio se creía que las células troncales estaban presentes solo en ciertos tejidos, tales como el hígado, la sangre, y el epitelio intestinal, sin embargo, hoy en día sabemos que estas se encuentran en todos los tejidos que conforman al cuerpo humano (Afify and Seno, 2019).

Esta población de células troncales se encarga de mantener los tejidos mediante un continuo reemplazo de las células que los componen, además de asegurar la regeneración de los mismos en caso de emergencia, como por ejemplo por una lesión o herida. Además, esta población celular exhibe un alto grado de ventajas evolutivas, conferidos entre otros, por mecanismos sofisticados de detoxificación, además de que residen en microambientes protectores (nichos de células troncales). Se ha propuesto que una población celular con características muy parecidas a las células troncales humanas normales, pueden existir en una entidad tumoral pero con características malignas, es lo que se conoce como el modelo de células troncales tumorales.

Las observaciones que datan de hace más de 50 años han evidenciado algunas similitudes entre el cáncer y el desarrollo embrionario, lo que ha llevado a la hipótesis de la existencia de lo que se conoce como células troncales tumorales (CSC, por sus siglas en inglés). Se piensa que las CSCs comienzan y mantienen el crecimiento tumoral, además de la formación y propagación de focos metastásicos a sitios distantes (Reya et al., 2001, Di et al., 2013). De acuerdo con este paradigma, solo esta clase de células son capaces de auto-renovarse de manera ilimitada y diferenciarse en diferentes tipos celulares, mientras que otras células que componen al tumor no pueden hacerlo (Lobo et al., 2007). Las CSCs tienen tres propiedades principales: 1) la capacidad para iniciar los tumores y conducir la proliferación neoplásica 2) la capacidad de producir copias ilimitadas de si mismas a través de la auto-renovación 3) el potencial para dar lugar a células hijas más diferenciadas. Se ha propuesto que este linaje celular surge de las células troncales normales, ya que estas al poseer una vida media mucho más larga, son propensas a la acumulación de mutaciones. Estas células troncales también pueden originarse de progenitores restringidos o de células diferenciadas que sufrieron de alteraciones genéticas o epigenéticas activando sus

mecanismos de auto-renovación lo que les confiere un fenotipo de células troncales tumorales (Bjerkvig et al., 2005). Un aspecto de la heterogeneidad intra-tumoral se ve reflejado por la estructura de pirámide de los tumores, con las células troncales tumorales en el ápice de la jerarquía maligna (Figura 8). Conservadas en la mayoría de los tumores, las CSCs, también conocidas como células iniciadoras de tumores, están dotadas con propiedades funcionales únicas las cuales dictan el curso completo de la evolución tumoral. Son estas características lo que ha vuelto a las células troncales tumorales el objetivo para la fabricación de nuevos tratamientos contra el cáncer y a desarrollar nuevas estrategias que sean efectivas para eliminar esta población (Figura 9).

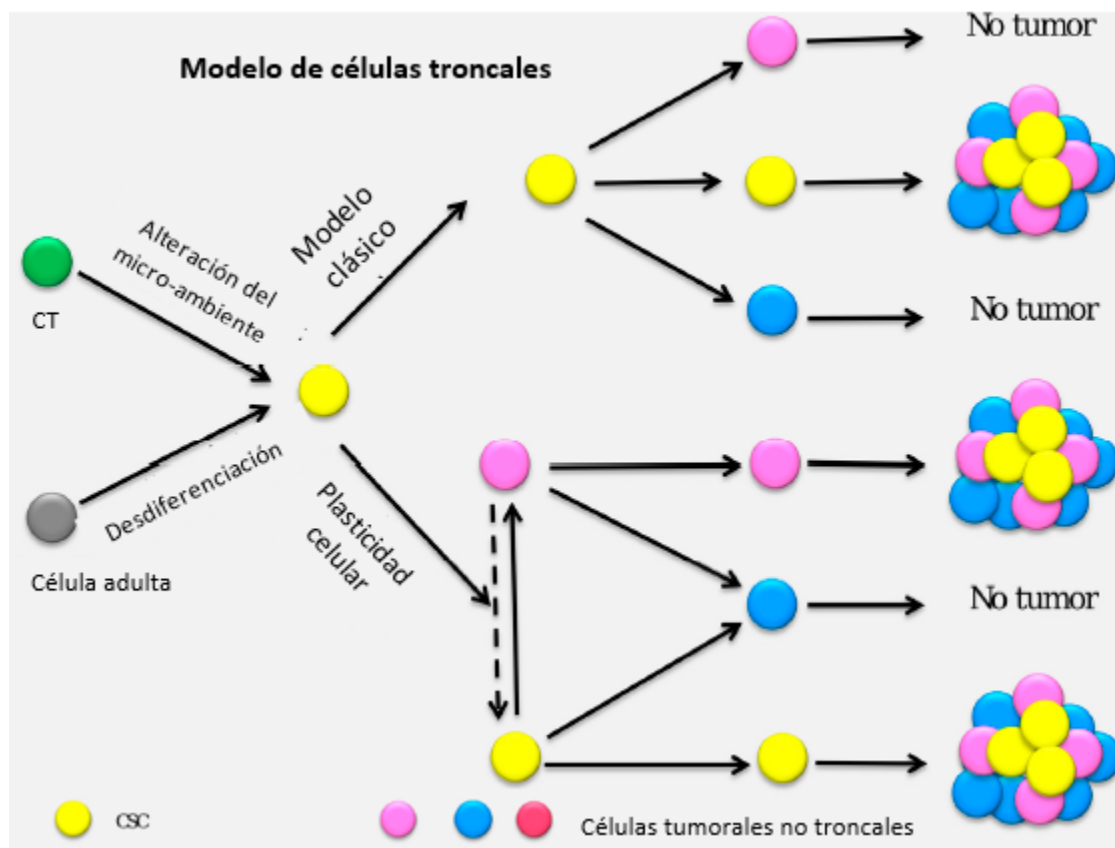


Figura 8. Modelo jerárquico de la progresión tumoral basado en las células troncales tumorales. Modificado de (Afify and Seno, 2019).

Algunos grupos de investigación han identificado a esta población de CSCs en diferentes tipos de cáncer tanto sólidos como no sólidos (leucemias), con la ayuda de diferentes marcadores de diferenciación celular (Tabla 1). El primer tipo de cáncer en el que se identificaron fue en la leucemia mieloide aguda en el año de 1994 con la combinación de los marcadores CD34⁺ y CD38⁻ lo cual era muy parecido al fenotipo de células troncales hematopoyéticas (Lapidot et al., 1994). El primer tumor sólido en el que se identificaron estas células fue en cáncer de mama en el año 2003 empleando un triple marcaje (CD44⁺

CD24^{-/low} ESA⁺) y lo que notaron fue que esta población celular presentaba un fenotipo mucho más agresivo que su contraparte cuando eran inyectadas en ratones inmunocomprometidos (Al-Hajj et al., 2003), desde entonces estas fueron descritas en diferentes tipos de tumores sólidos incluido el cáncer de páncreas (Li et al., 2007).

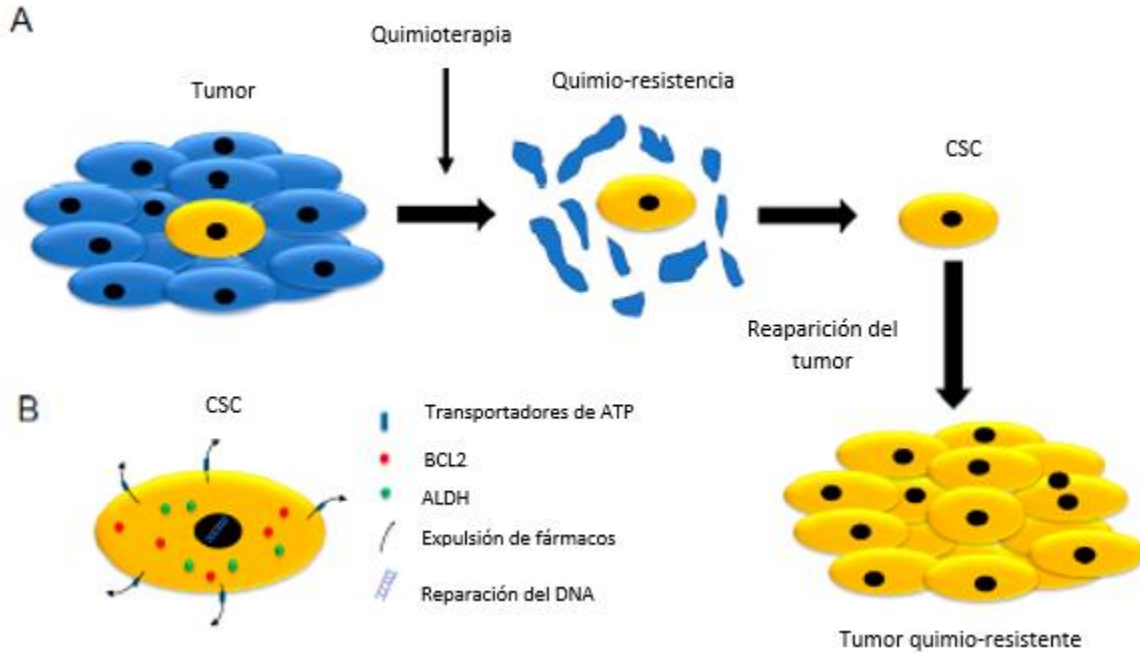


Figura 9. Representación gráfica de las CSCs y su papel en la resistencia a la terapia. Los diferentes tratamientos contra el cáncer actúan sobre la mayor parte de las células que conforman al tumor eliminándolas, sin embargo la población de células troncales es capaz de sobrevivir a esta ocasionando que reaparezca el tumor (A). Las células troncales tumorales poseen diferentes mecanismos para lidiar con los fármacos, tales como transportadores de ATP, una alta expresión de proteínas anti-apoptóticas (BCL2), así como poderosos mecanismos de reparación del DNA, entre otros (B). Modificado de (Barbato et al., 2019).

Tabla 1. Marcadores celulares de superficie (de tumores sólidos) usados para el aislamiento y la identificación de las células troncales tumorales. Modificada de (Barbato et al., 2019).

Tumor	Biomarcadores	Referencias
Cáncer de mama	CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} /ESA ⁺	(Al-Hajj et al., 2003)
Cáncer de próstata	CD44 ⁺ /a2b1 ⁺ / ALDH ⁺	(Chen et al., 2016)
Melanoma	ABCB5 ⁺ CD20 ⁺ CD271 ⁺	(Schatton et al., 2008) (Kumar et al., 2017)
Glioblastoma	CD133 ⁺	(Singh et al., 2003)
Cáncer de colon	CD133 ⁺ /CD44 ⁺ /CD166 ⁺ ESA ⁺ /CD44 ⁺ /CD166 ⁺ CD44 ⁺ /CD24 ⁺ CD133 ⁺ /CD24 ⁺	(Ricci-Vitiani et al., 2007) (Dalerba et al., 2007) (Yeung et al., 2010) (Vermeulen et al., 2008)

Cáncer de pulmón	CD133 ⁺ CD44 ⁺ ALDH ⁺ CD177 ⁺	(MacDonagh et al., 2016, Curtis et al., 2010)
Cáncer gástrico	CD133 ⁺ CD44 ⁺ /CD24 ⁺ CD90 ⁺ CD44 ⁺ /CD54 ⁺	(Bekaii-Saab and El-Rayes, 2017) (Singh, 2013)
Cáncer de cabeza y cuello	CD44 ⁺ /ALDH ⁺ CD44 ⁺ /CD66 ⁻	(Chinn et al., 2015)
Cáncer de ovario	CD133 ⁺ CD44 ⁺ ALDH ⁺ CD117 ⁺	(Foster et al., 2013)
Cáncer de páncreas	CD44 ⁺ /CD24 ⁺ /ESA ⁺	(Li et al., 2007)
Cáncer de hígado	CD133 ⁺ /CD44 ⁺ CD90 ⁺ ESA ⁺ CD133 ⁺	(Hou et al., 2012) (Yang et al., 2008) (Kimura et al., 2010) (Haraguchi et al., 2010)

Antecedentes

Como hemos visto anteriormente, una de las principales razones del fracaso de las diferentes terapias contra el cáncer (tanto quimio como radio-terapia), es la alta heterogeneidad tanto inter como intra-tumoral que presentan diferentes tipos de cáncer. Dentro de esta heterogeneidad, encontramos una población celular en específico a la que se le atribuyen diferentes características del curso clínico del cáncer, que son las células troncales tumorales, debido a esta hipótesis es que diferentes grupos de investigación se han dado a la tarea de estudiarlas. Tal es el caso del grupo de Li, quienes fueron los primeros en caracterizarlas en cáncer de páncreas, ellos tomaron muestras de tumores primarios de pacientes con cáncer de páncreas, de los cuales mediante citometría de flujo aislaron a una supuesta población troncal, basándose en los marcadores que habían sido utilizados para caracterizar a las células troncales de cáncer de mama (CD44⁺/CD24^{low}/ESA⁺), las cuales posteriormente fueron implantadas mediante ensayos de dilución limitante, en ratones inmunodeficientes, probaron inyectando células con diferentes combinaciones de esos marcadores y llegaron a la conclusión de que las células que mostraban el mayor potencial tumorigénico eran aquellas con el triple marcaje (CD44⁺/CD24⁺/ESA⁺), ya que solo 100 células con este fenotipo eran suficientes para iniciar de nueva cuenta el tumor, además de que histológicamente hablando eran capaces de recapitular la enfermedad (Li et al., 2007). Además de ellos, existen más investigadores que han determinado posibles poblaciones troncales usando otros marcadores de superficie, como CD133⁺ (Hermann et al., 2007), las

cuales de acuerdo a sus autores, presentan un potencial incluso más agresivo que las células con el triple marcaje descrito anteriormente, además de ALDH, c-Met, entre otros. Todos estos estudios aseguran que las células aisladas mediante dichos marcadores, presentan un potencial tumorigénico mayor al resto de las poblaciones, lo cual nos habla de la alta heterogeneidad que podemos encontrar en este tipo de cáncer (Li et al., 2011).

Con el fin de develar dicha heterogeneidad y encontrar biomarcadores de detección temprana, existen estudios que se han enfocado en las células circulantes tumorales (CTC por sus siglas en inglés), esto debido a que son capaces de reflejar las características del tumor del que provienen, además al diseminarse a sitios distantes del tumor nos pueden decir mucho acerca del proceso metastásico, en uno de estos estudios se tomaron muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer pancreático, y se aislaron a las CTCs, además de células de dos diferentes líneas celulares de cáncer de páncreas (AsPC-1 y PANC1) y posteriormente fueron analizadas mediante secuenciación de célula única, los resultados mostraron la presencia de al menos dos poblaciones diferentes, en las muestras de pacientes, una con características de tipo epitelial y otra mesenquimal, ambas incluso resultaron ser diferentes de las células de las líneas celulares (Lapin et al., 2017).

La heterogeneidad intra-tumoral, puede ser determinada por las células que componen el microambiente tumoral, los CAFs, hacen que los tumores aparezcan como “islas”, rodeadas de un “mar” de fibroblastos, esto según un estudio en el cual realizaron co-cultivos de células de PDAC positivas a GFP⁺, con una línea celular de CAFs (CAF-1), con lo cual ellos determinaron dos firmas genéticas, una para células en proliferación (PRO) y otra para células en EMT, y observaron que conforme aumentaban la proporción de CAFs, cambiaban las poblaciones positivas a una u otra, además de aumentar la población de células que eran dobles positivas a ambas firmas (DP) (Ligorio et al., 2019).

Justificación

El cáncer de páncreas, con una supervivencia a 5 años menor al 5%, es uno de los tumores más letales que existen. La principal causa de muerte por esta neoplasia es la resistencia a los agentes quimio y radioterapéuticos usados. Este fenómeno se debe a la heterogeneidad celular, la cual permite que clonas tumorales sobrevivan al efecto de la terapia. Entre estas clonas se destacan las células troncales cancerosas, las cuales son capaces de regenerar un tumor, además de presentar resistencia a quimio y radioterapia. Es por ello importante conocer con mayor profundidad este fenómeno, con el fin de establecer bio-marcadores de detección temprana, y desarrollar nuevas terapias en contra de las sub-poblaciones que resulten ser clave en su curso clínico.

Hipótesis

El análisis de la expresión global a nivel de célula única de la línea celular de cáncer de páncreas AsPC-1 revelará diferentes subpoblaciones celulares incluyendo a las CSCs.

Objetivos

Objetivo General

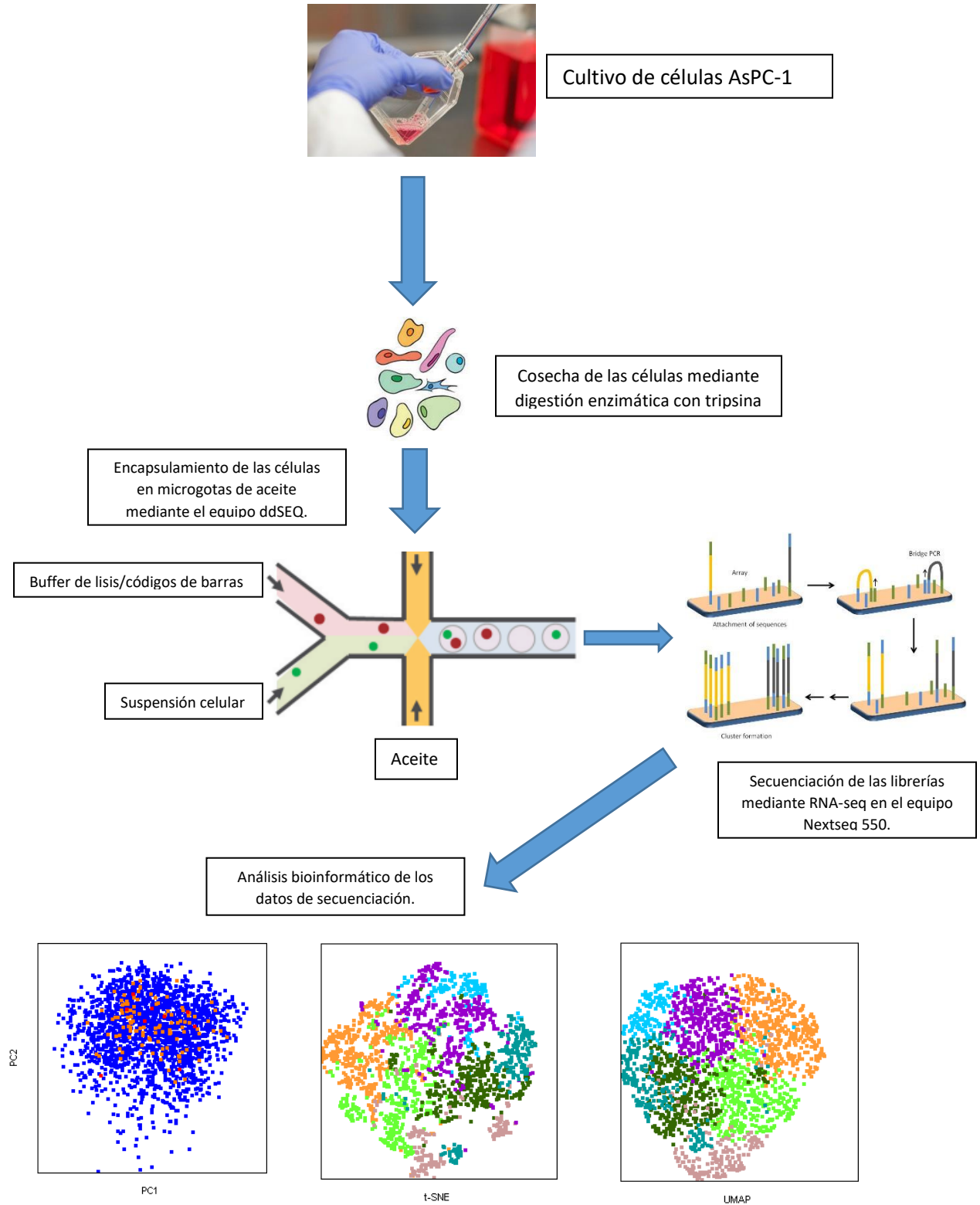
Evaluar el perfil transcripcional a nivel de célula única de la línea celular de cáncer de páncreas AsPC-1.

Objetivos específicos

1. Estandarizar las condiciones óptimas para el adecuado encapsulamiento de células individuales de la línea celular.
2. Caracterizar a las diferentes subpoblaciones que resulten de la línea celular.
3. Evaluar las vías y procesos celulares en los que están involucrados los genes regulados de las diferentes poblaciones.
4. Validar los genes que presenten una expresión diferencial.

Metodología

Representación gráfica de la metodología general seguida en este trabajo.



Cultivo celular

Se utilizó una línea celular de adenocarcinoma ductal pancreático, AsPC-1 (ATCC® CRL-1682), la cual fue cultivada en medio RPMI-1640, suplementada con 10% de suero fetal bovino, una vez que las células llegaron a una confluencia de alrededor del 80%, se procedió a la digestión enzimática con tripsina, seguido de lavados con PBS 1X estéril, para su posterior encapsulamiento. La muestra se mantuvo en PBS 1X y en hielo hasta su procesamiento.

Evaluación de la calidad

Lo ideal es que la confluencia de la muestra sea de entre el 60 y 90%, ya que una confluencia demasiado baja podría suponer una disminución en el rendimiento de las librerías, y una confluencia alta podría provocar que se observaran patrones apoptóticos en la secuenciación. La medición de este parámetro puede ser de manera automatizada o de manera manual, en nuestro caso la medición se realizó de manera manual con un microscopio óptico.

Evaluación de la cantidad

Una vez que se tuvieron a las células en suspensión, se procedió a determinar la densidad celular, esto se efectuó con el equipo TC20™ Automated Cell Counter (Bio-Rad), el cual es un equipo automatizado que incorpora una tecnología auto-focus y un algoritmo de conteo con lo cual logra entregar conteos precisos en cuanto al número total de células en menos de 30 segundos. Se realizó una dilución de las células 1:1 con azul tripano y se colocaron 10 microlitros de la misma en una laminilla especial, con lo cual adicionalmente pudimos obtener datos sobre la viabilidad celular, la cual es de suma importancia para los pasos posteriores ya que no debe de caer a menos del 95%.

Filtrado de la suspensión celular

Previo al encapsulamiento de las células en microgotas, se debió realizar un filtrado de las mismas a través de un filtro de 35 μm , esto para evitar que las células formen dobletes o agregados (Figura 10) que pudieran interferir en el encapsulamiento, posterior al filtrado se evaluó nuevamente la viabilidad de la misma forma que se mencionó anteriormente, esto

para confirmar que los pasos realizados con anterioridad y el que las células sean mantenidas en hielo no alteraron este parámetro.

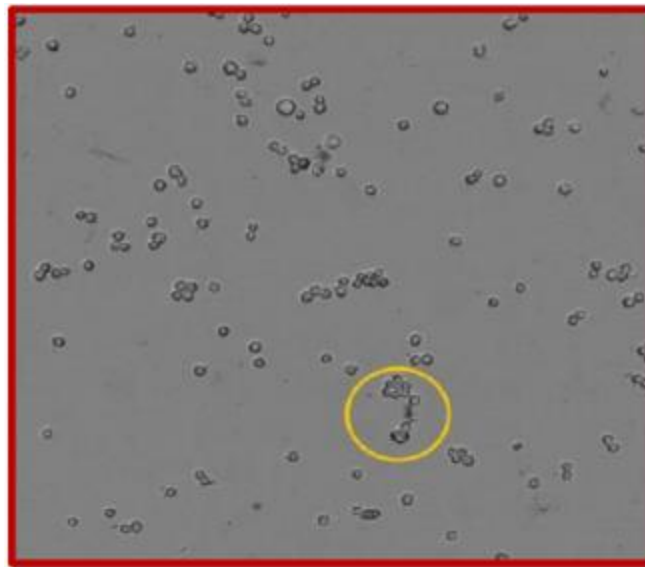
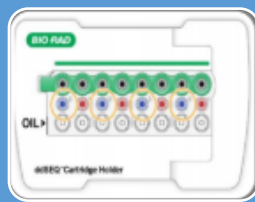


Figura 10. Se muestra una disociación incompleta de la muestra, puesto que se están formando agregados celulares (circulo amarillo)

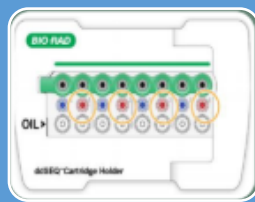
Carga de la suspensión celular y los “beadbarcodes”

En el siguiente diagrama se muestra el flujo de trabajo para cargar el cartucho que posteriormente se colocó en el ddSEQ para el encapsulamiento de las células.



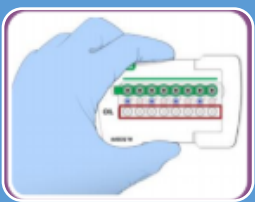
CARGA DE LA MEZCLA DE LOS BARCODES

- Se agitó la solución en el vortex por 1 segundo, 3 veces, para asegurarnos de que se mezclaron adecuadamente los componentes.
- Posteriormente se procedió a cargar 20 μL en los pozos de color azul de la segunda fila.



CARGA DE LA SUSPENSIÓN CELULAR

- La muestra se agitó en el vortex durante 1 segundo y se repitió 3 veces para asegurar una correcta mezcla de la misma.
- Se añadieron 20 μL de la muestra en los pozos de color rojo de la segunda fila.



CARGA DEL ACEITE PARA ENCAPSULAMIENTO

- Se vertió el aceite de encapsulamiento en un reservorio pequeño.
- Se agregaron 80 μL del aceite con ayuda de una pipera multicanal en cada uno de los pozos de la tercera fila.

Encapsulamiento en ddSEQ y RT-PCR

Una vez que se cargó el cartucho, se llevó a cabo el encapsulamiento de las células individuales, éste se colocó en el reservorio del equipo ddSEQ y se realizó el encapsulamiento de 12,500 células en 5 minutos. Posterior a esto, se colectaron las células en micro-gotas y se transfirieron a una placa de 96 pozos, para realizar la síntesis de la primera cadena de cDNA en un termociclador bajo los siguientes parámetros:

- 30 minutos a 37 °C
- 1 hora a 50 °C
- 5 minutos a 85 °C
- Toda la noche a 4 °C

Una vez que se llevó a cabo la primera síntesis del cDNA, se procedió a la ruptura de las gotas. La muestra se purificó mediante el empleo de perlas magnéticas, las cuales se unen únicamente a los fragmentos de cDNA. Posteriormente mediante una placa magnética, se realizaron lavados con etanol para desechar los primers que no se unieron con el RNA, mientras que los fragmentos de cDNA, fueron retenidos. La placa de 96 pozos se centrifugó a 280 g durante 10 segundos y se volvió a colocar en el magneto por 2 minutos más. Pasado este tiempo, las muestras se transfirieron a una placa nueva de 96 pozos para llevar a cabo la síntesis de la segunda cadena de cDNA siguiendo el siguiente protocolo:

- 2 horas a 16 °C
- Toda la noche a 4 °C

Una vez que obtuvimos el cDNA de doble cadena se procedió a la limpieza de la muestra siguiendo el mismo protocolo que en el apartado anterior. Ya con la muestra purificada se llevó a cabo una evaluación de su concentración así como de su calidad con el equipo TapeStation. Una vez que pasó este filtro de calidad se llevó a cabo la fragmentación, este proceso realiza un corte en el DNA con el fin de añadir los adaptadores al cDNA de doble cadena para la secuenciación.

Validación de resultados mediante citometría de flujo

Con el fin de validar algunas de las subpoblaciones celulares encontradas con base en su perfil de expresión diferencial, se realizó un análisis por citometría de flujo de una población que se encontraba regulando de manera positiva la vía apoptótica. Para lo cual fue necesario generar una población que fuera positiva a la tinción con Anexina V ya que esta molécula se une a la fosfatidilserina, un lípido membranal que se encuentra en altas proporciones en la parte exterior de las membranas de las células en apoptosis temprana. Los controles positivos fueron generados de la siguiente manera: el primer fármaco que se decidió utilizar fue la gemcitabina, a concentraciones de 10 y 100 μM , estas fueron determinadas con base en los trabajos realizados por (Cao et al., 2015), sin embargo, la utilización de gemcitabina por si sola no fue capaz de desarrollar ningún efecto sobre esta línea celular (datos no mostrados), por lo cual se decidió añadir cloruro de litio, ya que a

este se le ha relacionado con efectos positivos sobre los pacientes que presentan este tipo de cáncer, se utilizó en concentraciones de 20 y 40 mM. Una vez generados los controles positivos, se procedió a realizar la tinción para citometría de flujo con el kit Anexina V de Thermo (No. catalogo: V13242) con base en lo establecido por el fabricante con algunas modificaciones:

1. Se generaron los controles positivos con los fármacos de elección.
2. Se cosecharon las células mediante digestión enzimática con tripsina y se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X.
3. Se preparó la solución amortiguadora de unión a Anexina 1X. Para este ensayo se diluyeron 1.6 mL de la solución amortiguadora 5X en 6.4 mL de agua desionizada.
4. Se preparó la solución de trabajo de ioduro de propidio (IP) a una concentración de 100 mg/mL, diluyendo 0.5 μ L de la solución stock de IP [1 mg/mL] en 4.5 μ L de la solución preparada en el paso 3.
5. Una vez lavadas las células del paso 2, se volvieron a centrifugar a 1300 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se re-suspendieron en la solución amortiguadora 1X de anexina (paso 3).
6. Se procedió a determinar la densidad celular de la muestra, mediante un hemocitómetro, esto con el fin de determinar el volumen necesario de la solución stock para obtener 100,000 células en cada condición, este volumen fue llevado a 100 μ L con la solución del paso 3.
7. A este se le adicionaron 5 μ L de FITC-Anexina V y 1 μ L de la solución de IP 100 mg/mL por cada 100 μ L de suspensión celular.
8. Las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
9. Posterior al periodo de incubación, se agregaron 400 μ L de la solución del paso 3, se mezcló suavemente y se mantuvieron en hielo.

Análisis de los datos

Los datos obtenidos de la secuenciación se analizaron con el software comercial SegGeq de Flow Jo versión 1.5.0 así como con el Sure Cell WTA 3' de BaseSpace.

Una vez obtenidos los datos de secuenciación, se llevó a cabo su procesamiento mediante la aplicación SureCell RNA single cell de BaseSpace. En breve, las lecturas fueron alineadas contra un genoma de referencia utilizando el algoritmo "Spliced Transcripts Alignment to a Reference" (STAR). Dentro de esta misma herramienta, se analizan los controles de calidad que deben de pasar los datos de cada célula para poder ser tomadas en cuenta en los análisis posteriores.

Resultados

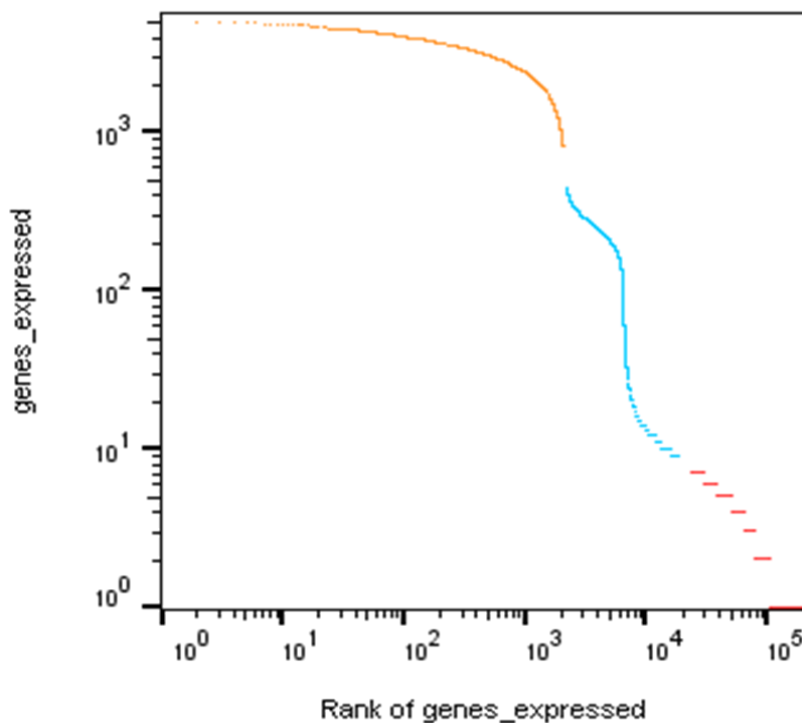
Una vez obtenidos los datos de la secuenciación masiva, debido a la gran cantidad y complejidad de los mismos, es necesario contar con las herramientas adecuadas para su procesamiento y análisis, por lo cual ya que los datos fueron alineados con base en un genoma de referencia (*Homo sapiens*), mediante un algoritmo matemático conocido como STAR, el cual es específico para el alineamiento de datos obtenidos a partir de RNA, se creó la matriz de datos, en la cual tenemos por un lado los identificadores únicos de cada célula (barcodes) y por el otro los identificadores moleculares únicos, los cuales son específicos de cada transcrito de RNA, lo cual nos permite saber con exactitud que gen o genes están siendo expresados por una célula en específico, sin embargo, debido a la gran cantidad de información que se tiene, se han creado diferentes softwares especializados en el análisis de este tipo de datos.

SegGeq v1.5.0, es un software de la compañía FlowJo, el cual fue diseñado especialmente para el análisis de datos de secuenciación de célula única, cuenta con todas las herramientas necesarias para poder sacar el mayor provecho de los datos obtenidos, ya que este realiza desde reducciones de la dimensionalidad, hasta poderosos pipelines que realizan todos los análisis de manera automática, como es el caso de Seurat de Satija Lab.

Una vez que cargamos los datos dentro de este software, uno de los primeros pasos que debemos tener en cuenta para el análisis de los mismos, es el control de calidad de las células secuenciadas, para ello contamos con un gráfico conocido como gráfico de rodilla (Figura 11), llamado así debido a la forma que describe. Este nos sirve para delimitar a la población de células que cuenta con la calidad necesaria para los análisis posteriores ya que nos permite delimitar a las células en tres categorías, la primera de ellas se encuentran en la parte superior del gráfico, aquí encontramos a la población que cuenta con la mejor calidad, es decir son las células que una vez encapsuladas permanecieron viables, que no fueron encapsuladas en dobletes, etc., la segunda la encontramos en la parte media del gráfico, aquí podemos encontrar a la población catalogada como células muertas y en este caso ya no es recomendable utilizarla en los demás análisis, la última se encuentra en la parte baja, y es catalogada como debris celular y es muy posible que corresponda a datos que provienen de fragmentos cortos de las bibliotecas que no fueron desechados con los lavados. De tal modo que la muestra registra un total de 194,350 eventos, sin embargo al aplicar este control de calidad, obtenemos que solo 2,003 células cumplen con los criterios de calidad necesarios para continuar con los análisis, las cuales se encuentran en la parte superior del gráfico, 15,874 corresponden a células muertas en la parte media y finalmente el de mayor proporción corresponde a debris celular, la parte baja del gráfico, con 171,639 eventos.

Una vez que delimitamos a la población que cuenta con los estándares de calidad adecuados, podemos proceder a realizar la reducción de la dimensionalidad, el cual es un aspecto muy importante en este tipo de análisis ya que contamos con una cantidad masiva

de datos y necesitamos una manera de simplificarlos sin que exista una pérdida de la información. Antes de llevar a cabo esto se realiza la normalización de los datos, comúnmente se hace con base en los genes denominados como “housekeeping” o genes constitutivos, ya que estos genes se expresan en todas las células de la misma manera independientemente de la condición o el tipo celular, no obstante, este no es el método más recomendable, ya que realmente no existen genes que se expresen de manera constitutiva en todos los tipos celulares, por lo que la normalización fue realizada con base en todos los genes no diferencialmente expresados. La reducción dimensional, puede ser dividida de manera muy general en dos tipos de análisis, los que son de tipo lineal y no lineal. El primero que se llevó a cabo es un análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés), que cae dentro de la primera categoría. Para llevarlo a cabo, se seleccionaron los parámetros o genes sobre los que deseamos realizar el análisis, debido a que nuestra intención fue llevar a cabo un análisis no supervisado, se seleccionaron el total de genes expresados por la muestra, este algoritmo agrupó a las células basado en sus perfiles de expresión génica, una vez hecho esto, fusionó la información de los genes correlacionados dentro de un



	Sample Name	Subset Name	Count
Orange	Pancreatic_S1.counts.readCounts.csv	Quality cells	2003
Cyan	Pancreatic_S1.counts.readCounts.csv	Dead cells	15874
Red	Pancreatic_S1.counts.readCounts.csv	Debris	171639

Figura 11. El control de calidad de realizado a la muestra representado mediante un gráfico de rodilla, en el que se observa que las muestras con una buena calidad se encuentran en la parte superior, seguida por las muertas y el debris celular.

“metagen” o componente principal (PC), por definición, el PC1 es el que contiene a los datos con la mayor varianza y la desviación estándar más grande, que en este caso fue de 2.28%, a partir del PC6 prácticamente no se veían diferencias en cuanto a la varianza acumulada, por lo que se decidió solamente tomar en cuenta estos primeros 6 componentes para graficarlos (Figura 12). Con este primer análisis podríamos inferir que las diferencias a nivel intra-poblacional no existen, sin embargo, es necesario llevar a cabo otros tipos de análisis más finos y con mayor profundidad para llegar a esa conclusión.

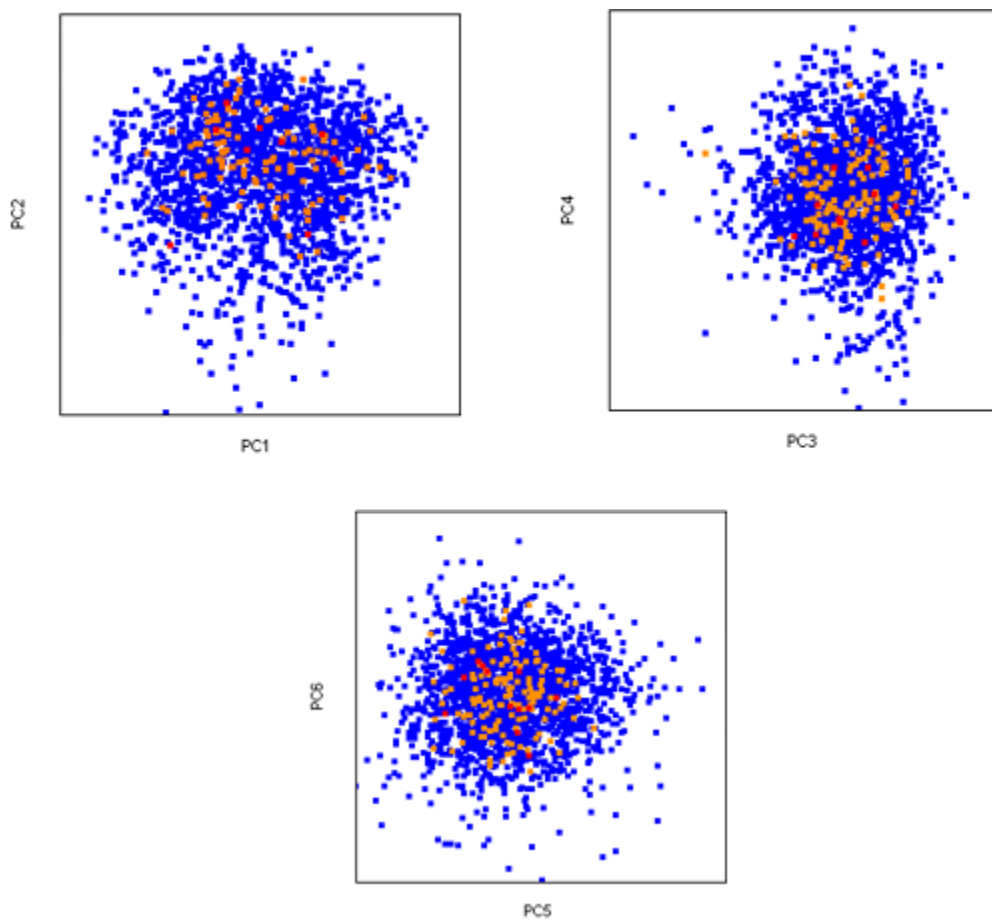
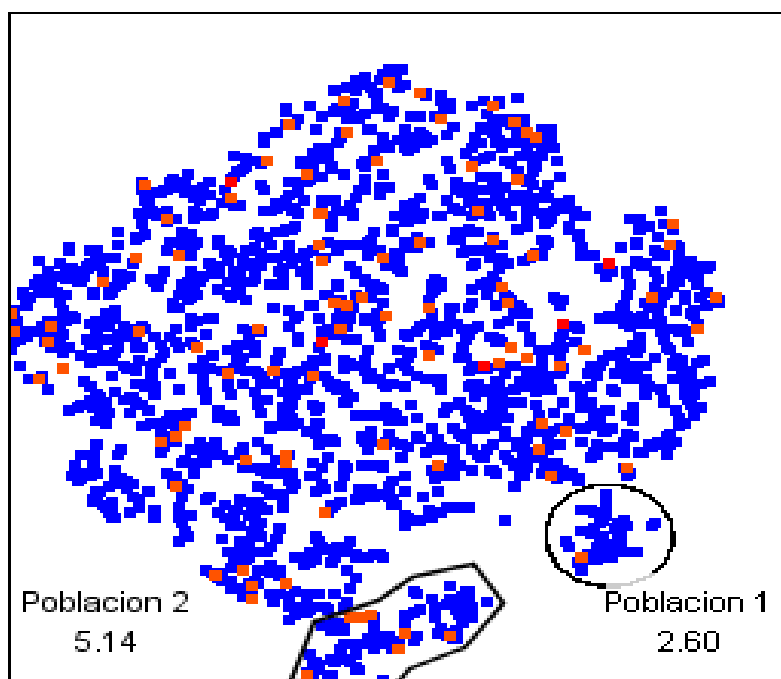


Figura 12. Análisis de componentes principales. Se muestran los 3 gráficos necesarios para poder apreciar en su totalidad la distribución de las células con este algoritmo, aunque en ninguno se observan diferencias poblacionales evidentes.

Es debido a lo anterior y a que el análisis de componentes principales es una herramienta de reducción dimensional de tipo lineal que necesita al menos seis gráficos o dimensiones para observar el panorama completo de las agrupaciones de los datos, que se procedió a realizar un análisis de t-SNE (Figura 13), el cual puede representar esos seis ejes en un gráfico de dos o máximo tres, sin la pérdida de información. Para la construcción de este gráfico, se emplearon los datos obtenidos del análisis de PCA. En este análisis pudimos observar que parecieran estar formándose dos poblaciones diferentes (círculos), las cuales corresponderían al 2.60 y 5.14% del total de la población, no obstante, se requieren de análisis adicionales para confirmar que estas supuestas poblaciones realmente sean diferentes del resto, como por ejemplo ver sus patrones de expresión diferencial.



t-SNE

Figura 13. Análisis de la distribución t (t-SNE). Este análisis revela la posibilidad de que existan al menos dos poblaciones diferentes mostrando el porcentaje que ocupan del total de la muestra.

Para lo cual se generaron los gráficos de volcán (Figura 14), en los cuales podemos observar que la población 1, presenta 17 genes sobre-expresados, siendo la uridina fosforilasa 1 (*UPP1*) la de mayor expresión (4.96 veces más respecto a todo lo demás), el cual codifica para una enzima que cataliza la fosforilación reversible de la uridina a uracilo y ribosa 1 fosfato, el resto de los genes son la subunidad del factor de transcripción AP-1 (*FOSL1*), el miembro 2 de la familia 3 de los acarreadores de solutos (*SLC3A2*), un RNA pequeño nucleolar (*SNHG15*), entre otros, y 36 genes sub-expresados, siendo un activador de plasminógeno (*PLAT*) el que presenta la mayor sub-expresión, seguido por el factor de

proliferación y diferenciación de células progenitoras pancreáticas (PPDPF), la proteína rica en cisteína 1 (CRIP1), el efector de la apoptosis P53 relacionado a PMP22 (PERP), etc. En el caso de la población 2, fueron 15 los genes que se encontraron sobre-expresados, siendo NEAT1 y MALAT1 dos RNAs largos no codificantes como los genes que presentaron los valores más altos con 5.16 y 5.06 veces más expresión respectivamente que el resto de la muestra, y 6 sub-expresados en donde encontramos a el inhibidor de unión al diazepam (DBI) y a la proteína mitocondrial CHCHD10 como los que presentan las mayores diferencias.

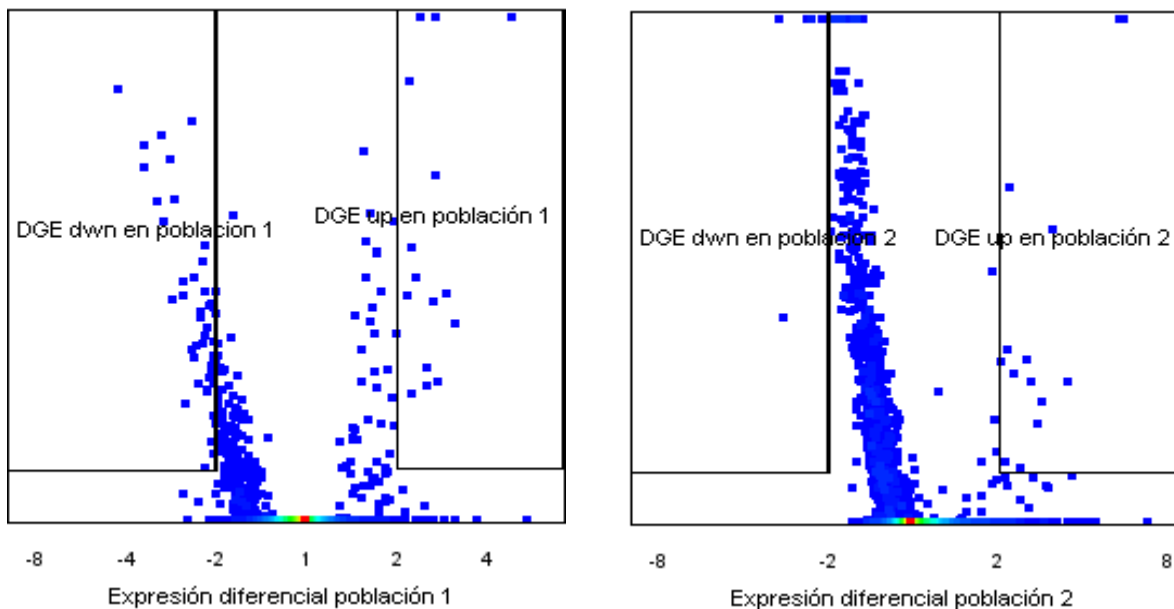
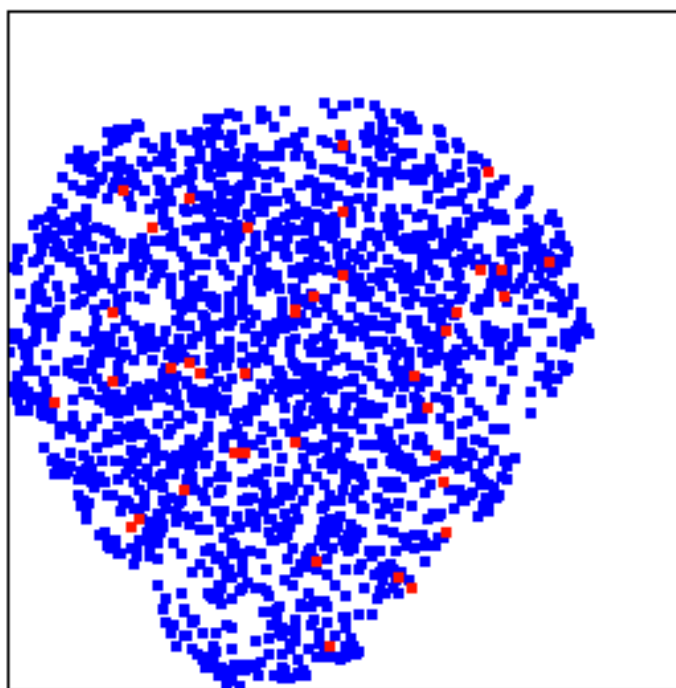


Figura 14. Los gráficos de volcán muestran a los genes diferencialmente expresados de cada una de las poblaciones comparados contra todo lo demás.

Además de los análisis convencionales y más comúnmente utilizados como son el PCA y el t-SNE, el software de SeqGeq cuenta con otros algoritmos de *machine learning* adicionales que pueden resultar de mucha utilidad, uno de los que fueron utilizados en este estudio fue el de Aproximación y proyección múltiple uniforme para reducción dimensional (mejor conocido como UMAP, por sus siglas en inglés), el cual según sus desarrolladores McInnes *et al.*, es capaz de competir con el análisis de t-SNE en cuanto a la calidad de la visualización, y es probable que preserve de mejor manera la estructura global, además de mejorar el tiempo que toma realizar el análisis, lo cual sería muy útil si hablamos de cantidades masivas de datos. De igual manera que con el t-SNE, los componentes obtenidos del PCA fueron utilizados como precursores de este algoritmo. El gráfico resultante muestra aparentemente una sola población, homogénea a diferencia de lo que observamos con el

gráfico de t-SNE (Figura 15), no obstante, los resultados obtenidos en el análisis, este resultado no es concluyente de que no exista heterogeneidad dentro de la línea celular.



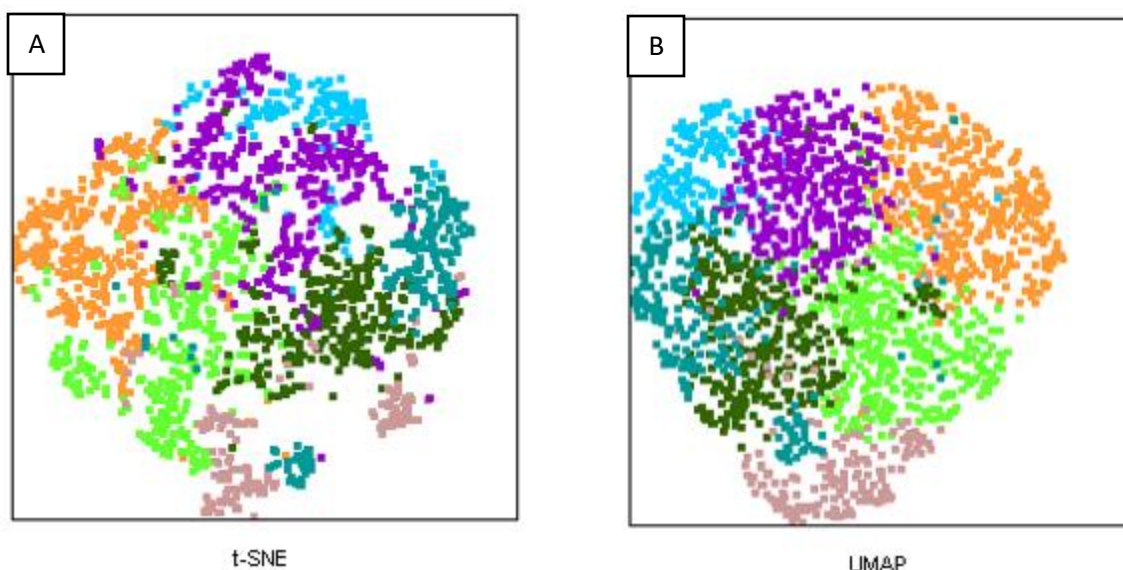
UMAP

Figura 15. La aproximación y proyección múltiple uniforme para reducción dimensional (UMAP), muestra una distribución de las células un tanto homogénea a diferencia del análisis de t-SNE.

Debido a que los dos gráficos generados anteriormente resultaron ser muy diferentes y contrastan uno con el otro, mostrando si bien una mínima heterogeneidad en uno, y solamente una población homogénea en el otro, se emplearon algunos otros algoritmos, como es el caso de una herramienta de *machine learning* conocida como Phenograph, la cual crea subpoblaciones de manera automática, es decir sin el sesgo que se puede ocasionar al seleccionar nosotros mismos los parámetros o genes de manera manual, ya que en esta solo se cargaron los datos y en automático el programa generó las poblaciones de las que aparentemente está compuesta la muestra, que en este caso fueron siete, y para poder visualizarlas, estas fueron plasmadas tanto en los gráficos de t-SNE como UMAP (Figura 16 a y b).

En estos podemos observar la manera en que se distribuyen las poblaciones en los gráficos, cabe resaltar que a pesar de que los dos gráficos son diferentes en cuanto a la manera de representar gráficamente los datos, la distribución de las poblaciones encontradas

mediante el análisis con Phenograph se comporta de manera muy similar en ambos, con lo que podemos comprobar que efectivamente UMAP hace un trabajo muy similar al t-SNE, sin embargo, nosotros notamos que a diferencia de lo que mencionan sus desarrolladores, el análisis fue más tardado empleando este método, no obstante la forma de agrupar los datos se observa mucho más limpia y mejor distribuida. Adicionalmente, las dos poblaciones que anteriormente manejamos como diferentes entre sí, mediante este algoritmo vemos que en realidad son parte de una misma población, y que además de eso están compuestas por una pequeña parte de una población diferente, y eso es algo que mediante un análisis convencional, no nos habría sido posible visualizar, causando un posible falso positivo. Para verificar esto, se realizó el ajuste al momento de seleccionar a dichas poblaciones, y se ejecutó un análisis de sus perfiles de expresión génica, lo que arrojó que no hay diferencias en cuanto a genes sobre-expresados, y solo se encontraron algunos genes sub-expresados, sin embargo esto puede deberse a que es algo complicado delimitarlas de manera manual, ya que como podemos observar se encuentran mezcladas con algunas otras.



Población	Número de células	Porcentaje
Cluster 1	153	7.64
Cluster 2	415	20.7
Cluster 3	372	18.6
Cluster 4	337	16.8
Cluster 5	171	8.54
Cluster 6	351	17.5
Cluster 7	204	10.2

Figura 16. Representación gráfica de las poblaciones encontradas de manera automática mediante la herramienta Phenogran en un gráfico de t-SNE (a) y en uno de UMAP (b), y las diferentes poblaciones encontradas resumidas (c) se muestran tanto el número de células del que está formado cada una como el porcentaje que estas ocupan.

Para comprobar que los resultados que había encontrado el programa realmente fueran subpoblaciones, fue necesario evaluar sus perfiles de expresión (Figura 16c), cabe destacar que gracias a este, ya no fue necesario delimitar a las poblaciones de manera manual, lo que evita que pudiésemos estar dejando fuera del análisis a cierta cantidad de células, o que estemos tomando en cuenta a algunas de otra población diferente. Todas las poblaciones evaluadas muestran diferencias en cuanto a sus perfiles de expresión diferencial, a excepción de la población 7 que no muestra genes ni sobre ni sub-expresados, por otro lado es de resaltar que la población que presentó mayores cambios en su perfil de expresión diferencial fue la población 5, con 33 genes sobre-expresados y 18 genes sub-expresados (Tabla 2).

Tabla 2. Perfiles de expresión diferencial de las 7 poblaciones encontradas por Phenograph.

Población	Genes sobre-expresados	Genes sub-expresados
Cluster 1	0	13
Cluster 2	3	0
Cluster 3	1	5
Cluster 4	5	14
Cluster 5	33	18
Cluster 6	2	2
Cluster 7	0	0

El análisis de enriquecimiento funcional de los 33 genes sobre-expresados, mostró principalmente un enriquecimiento en los procesos que regulan de manera positiva la apoptosis (Figura 17a), por lo que en primera instancia sugeriría que esta población celular presentó los mayores cambios en cuanto a su expresión diferencial debido a que era una población que estaba entrando en un proceso apoptótico, sin embargo, es necesario validar esto. En cuanto al enriquecimiento funcional que presentaron los genes sub-expresados (Figura 17b) encontramos procesos tales como organización de la matriz extracelular, fosforilación pos-traducciona de proteínas, entre otros.

Con el fin de validar el resultado obtenido en el análisis de enriquecimiento y verificar si la población que observamos se encuentra en un proceso apoptótico, se realizó la tinción con un kit de Anexina V mediante citometría de flujo, la cual es una molécula capaz de unirse a

la fosfatidilserina de la membrana de las células en apoptosis temprana. Adicionalmente, previo a la medición por citometría, se cuantificó la viabilidad de las células, para verificar que los resultados obtenidos no presentaran alguna variación debido al tratamiento que recibieron las células, la cual fue del 95%. La evaluación de Anexina V en la línea celular fue de alrededor del 7% (Figura 18a), y el porcentaje de células que componen a esta población es de 8.54%, esto sugeriría que las diferencias en los perfiles de expresión de esta población es de debe únicamente a que eran células entrando en el proceso de apoptosis.

Existen diferentes grupos de investigación que de igual manera estudiaron la heterogeneidad intra-tumoral del cáncer de páncreas, tal es el caso del grupo de trabajo de

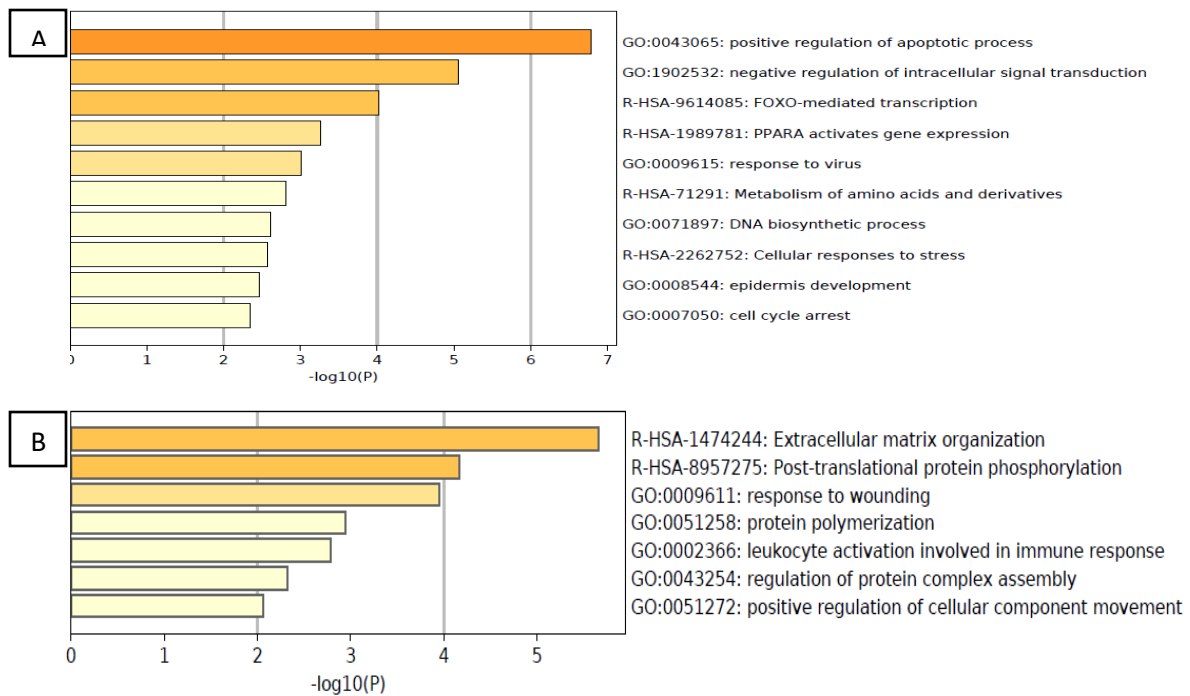


Figura 17. Enriquecimiento funcional de los genes sobre-expresados en la población 5 (a) y de los genes sub-expresados en la misma población (b).

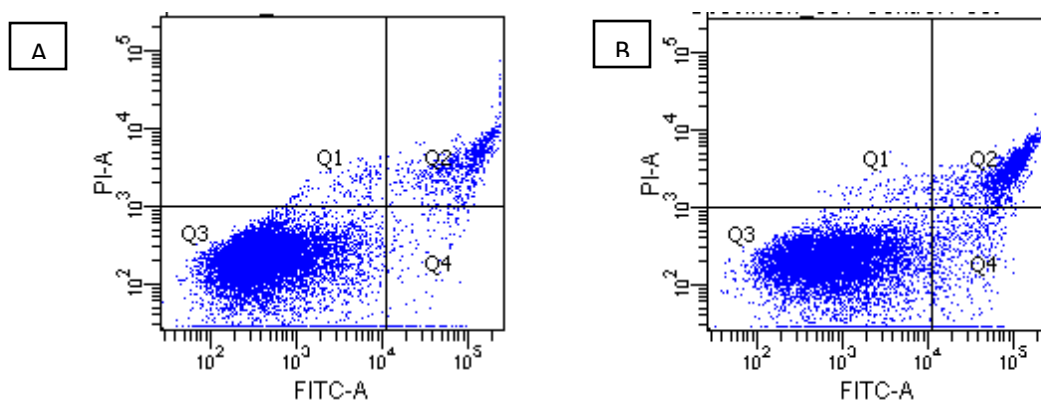


Figura 18. Gráficos de cuadrantes de la citometría de flujo que muestra los resultados de la apoptosis basal de la línea celular (a) y del control positivo generado (Gem + LiCl) (b).

Ligorio, quienes realizaron un estudio sobre secuenciación de célula única en líneas celulares de cáncer de páncreas co-cultivadas con una línea celular de células estromales, ellos encontraron que dentro de estas líneas celulares existían dos poblaciones diferentes, una de ellas corresponde a células que se encuentran en proliferación, a la cual denominaron como PRO, y otra al programa celular de transición epitelio mesénquima a la que llamaron EMT, de igual manera establecieron dos firmas genéticas con las que se podría identificar a dichas subpoblaciones, y estas fueron utilizadas para realizar un análisis supervisado de los datos de secuenciación (Ligorio et al., 2019). Con lo anterior se generaron los gráficos de reducción dimensional vistos anteriormente, como son PCA, t-SNE y UMAP (Figura 19), de los cuales el único con el que logramos observar la diferencia más evidente fue con UMAP.

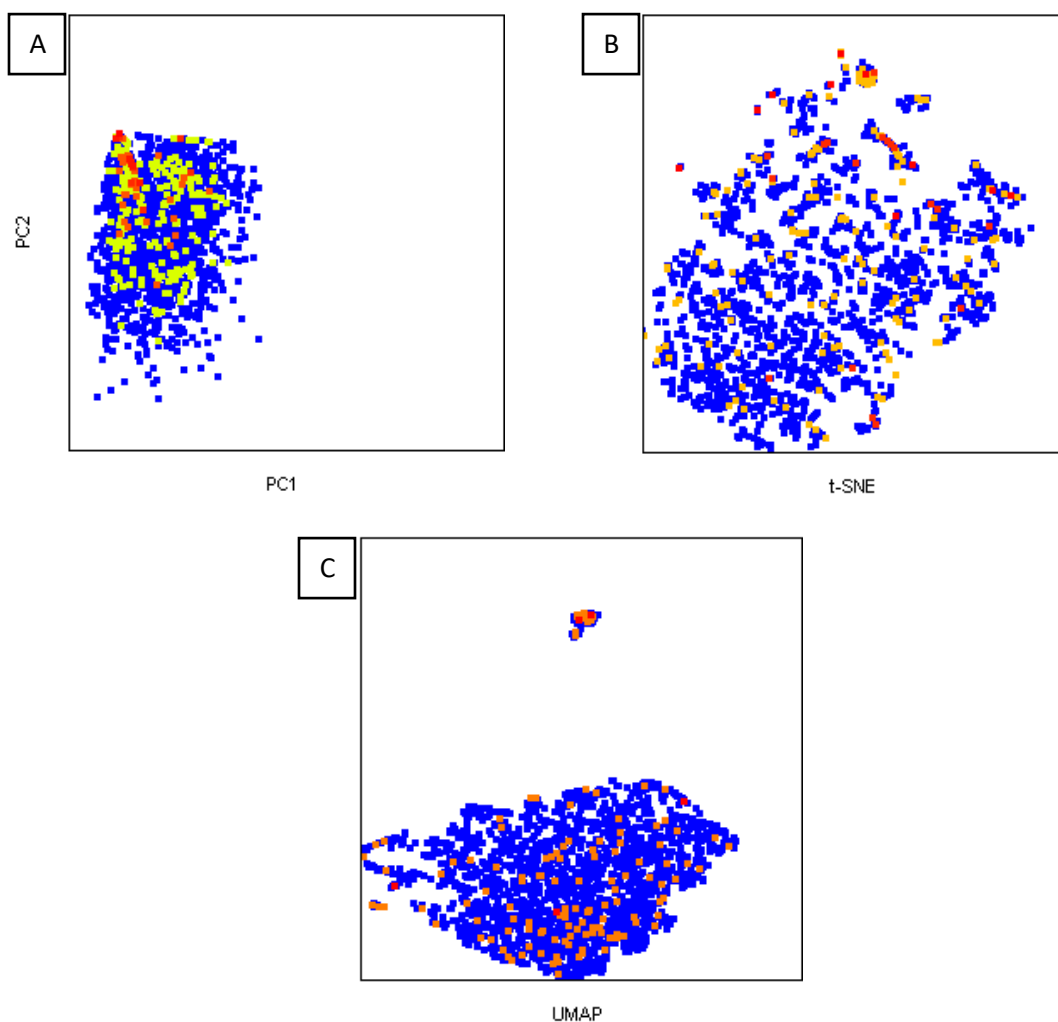


Figura 19. Análisis supervisado generado con la firma genética que determina a las células que se encuentran en proliferación (Ligorio et al, 2019), representado mediante un gráfico de componentes principales (a), un gráfico de la distribución de t (b) y uno de UMAP (c).

Es por lo anterior que este algoritmo fue el elegido para continuar con los demás análisis. Lo que obtuvimos fue una separación significativa de la muestra que con base en la firma genética, la dividió en aparentemente 3 subpoblaciones diferentes (Figura 20 a y b), obteniendo una significativamente más pequeña que las otras. Para determinar cuál de estas correspondía a la población en proliferación, se investigaron los productos de los genes más representativos de esta, como son MKI67 y CDK1 (Figura 20 c y d), con lo que observamos un enriquecimiento de estos transcritos en la población de la parte inferior del gráfico (figura 20d). El análisis funcional de la expresión diferencial de esta población, mostró un enriquecimiento en procesos relacionados con la división celular (Figura 20e), lo cual confirma lo observado anteriormente.

Por otro lado, cuando se analizó a las otras dos poblaciones, solo se obtuvieron 4 genes sub-expresados en la población 2 y 10 en la población 3, y en ambos casos no se encontraron genes sobre-expresados. El análisis sobre la función de estos transcritos sub-expresados, mostró que estaban relacionados con los procesos que favorecen el ciclo celular, con lo cual serían poblaciones opuestas a la población 1. De los cuales destacan algunos genes involucrados con la malignidad o progresión tumoral, como son HMGB2, RRM2, y CDK1 los cuales presentaron una mayor sub-expresión

Con base en lo observado tanto en los gráficos como en el enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados, parece ser que las poblaciones 1 y 3 son totalmente opuestas, por lo cual se decidió hacer un análisis de la expresión diferencial de genes entre ambas poblaciones. Lo cual dio como resultado 58 genes sobre-expresados en la población 1 respecto de la 3 y 48 genes regulados a la baja en la población 3 respecto de la 1, cabe resaltar que no se encontraron genes regulados a la baja en el caso de la población 1 ni con una sobre-expresión en la población 3. Sin embargo, en ambos casos se les practicó un análisis de enriquecimiento funcional, obteniendo casi los mismos resultados en ambos casos (Figura 21), no obstante siendo favorecidos en el caso de la primera y ausentes en la segunda.

En conjunto, estos resultados contrastan con los obtenidos anteriormente de manera no supervisada, en los cuales las diferencias poblacionales no eran evidentes de manera visual, sino que había que realizar análisis adicionales además de conocer sus perfiles de expresión diferencial, por el contrario al hacerlo de manera supervisada con una firma genética ya probada por otro grupo de investigación, las diferencias se hicieron visualmente notables, mostrando una población que se encuentran en proliferación, sin embargo los procesos que se encontraban favorecidos en las otras poblaciones no fueron del todo contundentes, puesto que en algunas de las subpoblaciones encontradas, no se presentaban genes regulados a la alta como en las otras genes regulados a la baja, lo cual deja abierta la posibilidad de emplear análisis o herramientas adicionales para confirmarlo.

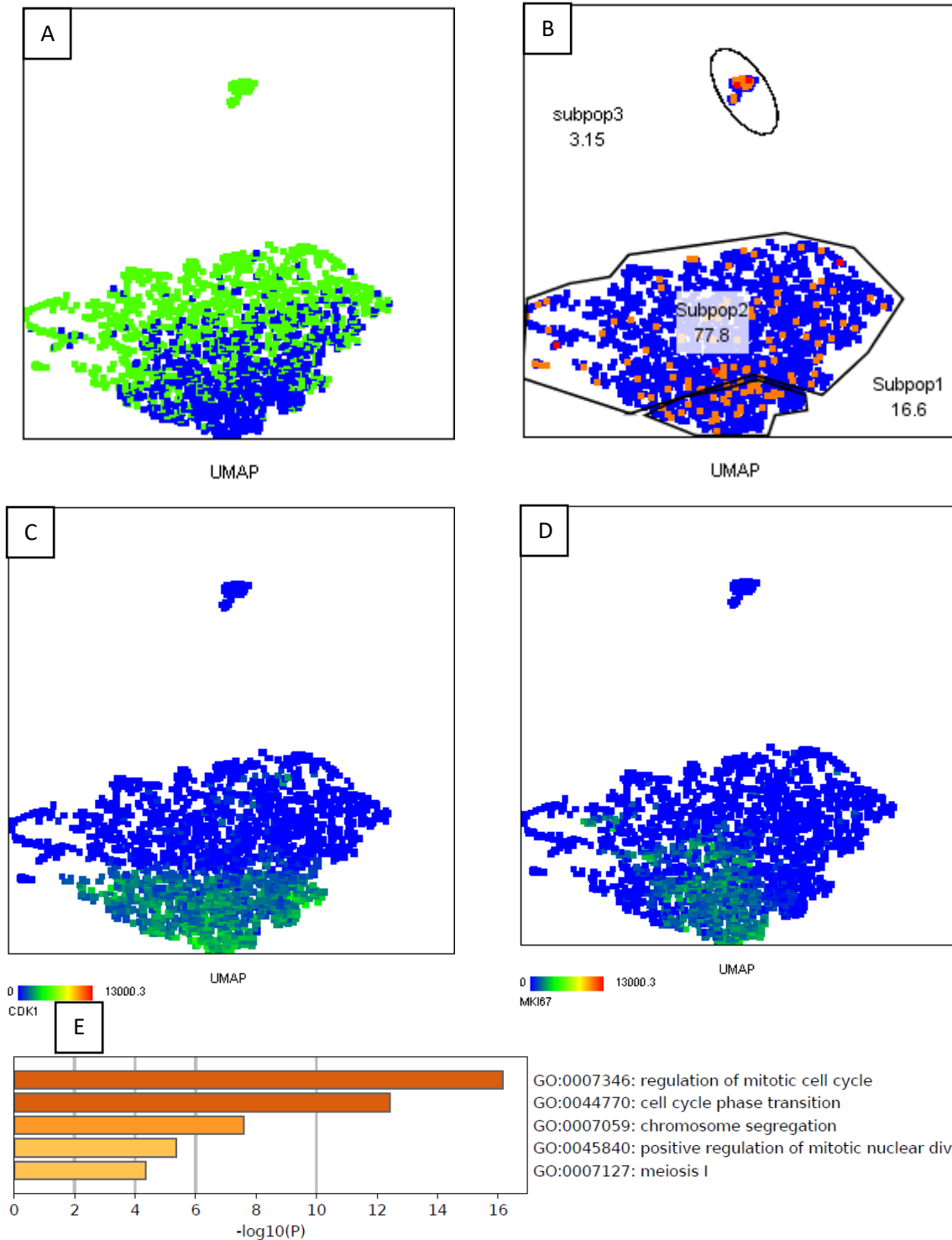


Figura 20. El análisis supervisado con la firma genética reveló que existe un enriquecimiento de ésta en la línea celular (a), con lo que se encontraron al menos 3 poblaciones aparentemente diferentes (b), y para corroborar que parte de la población se encontraba en proliferación se usaron los marcadores de esta como CDK1 (c) y MKI67 (d). Se muestra el análisis de enriquecimiento funcional de la población que de acuerdo con los marcadores anteriormente mencionados se encuentra en proliferación (e).

Cabe destacar que la firma genética que utilizaron estos autores (Ligorio et al., 2019) para el proceso celular de transición epitelio mesénquima, no fue utilizada en este análisis debido a que solo unos pocos genes de esta se encontraban dentro de los expresados por nuestra muestra, con lo cual los resultados del análisis no habrían sido del todo confiables.

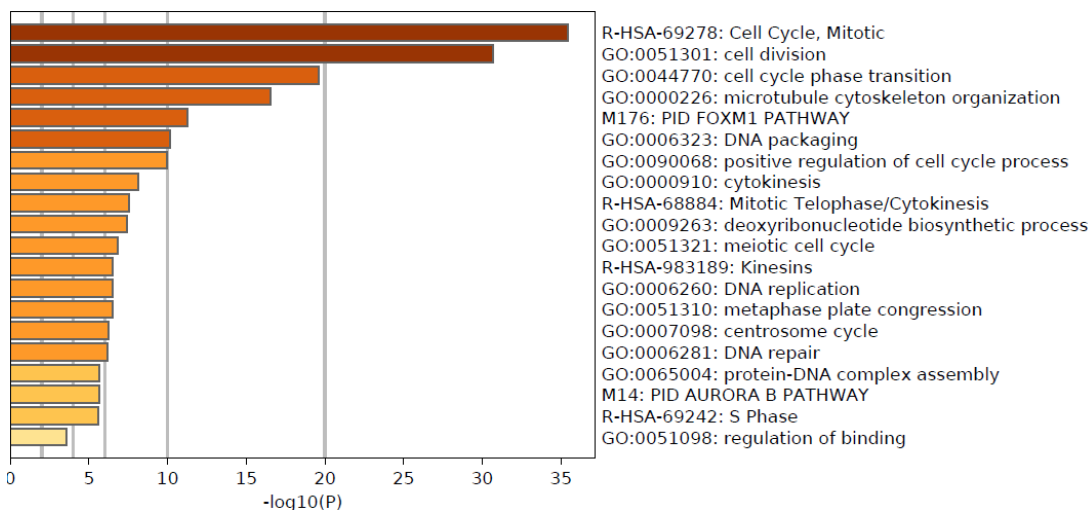


Figura 21. Análisis de enriquecimiento funcional obtenido de la comparación entre las poblaciones encontradas. La población 3 vs la población 1.

Discusión

El adenocarcinoma ductal pancreático es una de las enfermedades neoplásicas más agresivas y con peor pronóstico, esto en gran parte debido a la alta heterogeneidad intratumoral que presenta, lo cual es el principal obstáculo para el tratamiento de esta enfermedad. Es por esto que queda de manifiesto la importancia de enfocar los esfuerzos en desenmascararla. Sin embargo, los esfuerzos que se han hecho tratando de estudiar dicha heterogeneidad se habían visto limitados por las herramientas tecnológicas de las que disponíamos y gracias a la implementación de la secuenciación de célula única es que se le está haciendo frente estas limitantes. Por lo tanto en este trabajo nos enfocamos en analizar las poblaciones que pudieran estar componiendo al cáncer de páncreas pero en un modelo de línea celular utilizando la metodología de secuenciación de célula única mediante la técnica de microfluidos. Además se analizó la funcionalidad de los perfiles de expresión de cada tipo celular. Nuestros primeros resultados mediante un análisis de componentes principales no fueron capaces de evidenciar la presencia de diferentes subpoblaciones dentro de la línea celular, lo cual es algo lógico de pensar, ya que al tratarse de una línea celular controlada, la cual carece de las ventajas y alteraciones que le proporcionaría el micro-ambiente tumoral pudiesemos pensar que su composición debería ser mucho más homogénea. No obstante sabiendo que: a) está reportado en la literatura como una enfermedad altamente heterogénea, b) existe resistencia a las terapias contra el cáncer convencionales (quimio y radio terapia), c) hay constante recurrencia en los pacientes, d) se ha visto que las líneas celulares son capaces de reflejar de una manera muy adecuada lo que ocurre de manera *in vivo*, decidimos continuar haciendo más análisis. Cambiamos el tipo de análisis de uno lineal a uno no lineal (t-SNE), lo cuál nos dio los primeros indicios de al menos dos probables sub-poblaciones, y mediante un enriquecimiento funcional de sus perfiles de expresión, encontramos que los genes expresados en la subpoblación 2 estaban relacionados con procesos posiblemente involucrados en la progresión tumoral como son la respuesta celular a estímulos por factores de crecimiento, desarrollo mesenquimal, división celular (Witsch et al., 2010, Tsubakihara and Moustakas, 2018, Hanahan and Weinberg, 2011), entre otros, sin embargo, al tratarse de genes sub-expresados, dichos procesos estarían siendo favorecidos en alguna parte del resto de la población.

Los algoritmos usados comúnmente para analizar cantidades masivas de datos como en este caso, suelen ser de gran utilidad, sin embargo, existen ciertos inconvenientes como lo es el hecho de seleccionar a las poblaciones de manera manual, ya que si las diferencias fenotípicas entre las poblaciones son muy pequeñas, puede darse un solapamiento entre las mismas, que fue lo que ocurrió en este caso, en el que pensamos que las poblaciones que estábamos seleccionando en el primer gráfico de t-SNE, eran diferentes lo cual no era verdad sino que eran la misma población e incluso estaban mezcladas con dos poblaciones más que eran diferentes, este problema puede ser solucionado con esta herramienta conocida como Phenograph, la cual ha sido probada por diferentes grupos de

investigación con resultados muy alentadores, ya que confirman que se obtienen resultados muy similares cuando realizan todo de manera manual, pero con la ventaja de no tener que delimitar a las poblaciones, sino que se analizan de manera automática con este algoritmo. Este fue utilizado de manera conjunta con UMAP y t-SNE, para visualizar la manera en la que dichas poblaciones se distribuían a lo largo de la muestra, lo que pudimos observar era que el primero de ellos tal vez no evidenciaba la presencia de subpoblaciones como lo hizo el segundo, no obstante dichas poblaciones en realidad no eran diferentes según lo que pudimos observar posteriormente, además de que ofrecía una mejor manera en la que se distribuían los datos, ya que evitaba el traslape, y mostraba un mejor rendimiento en cuanto al tiempo que le toma hacer el análisis de los datos, algo que se hace aún más evidente con el aumento en la cantidad de datos, hechos que también han sido evidenciados por otros investigadores (Becht et al., 2018).

Se encontraron siete poblaciones mediante los análisis antes mencionados, hubo una que destacó por presentar la mayor cantidad de genes tanto sobre como sub-expresados, y el análisis de enriquecimiento funcional evidenció que el proceso que se veía más favorecido era el de la vía apoptótica, lo cual fue apoyado por los análisis de citometría de flujo, esto puede deberse a que se ha visto que la fosfatidil serina (PS) es relativamente abundante tanto en los tejidos como en las células cancerosas (Ran and Thorpe, 2002), además ha sido confirmado en líneas celulares de cáncer de páncreas, que muestran una expresión basal de este fosfolípido relativamente alta (Chu et al., 2013), cuyos resultados son muy similares a los obtenidos en este estudio, pues reportaron una apoptosis basal para la línea celular AsPC-1 de alrededor de 10% lo cual podría explicar por que se diferenció esta población. No obstante, se sabe que los genes ligados a un proceso apoptótico no necesariamente terminan en muerte celular, ya que existen estudios que han sugerido funciones adicionales para los genes normalmente asociados con apoptosis que pueden implicar replicación y transcripción. Diferentes autores hablan sobre los eventos apoptóticos que ocurren dentro de una población de células tumorales, y coinciden en que este proceso se encuentra aumentado en este tipo de células que en cualquiera otro tejido bajo condiciones fisiológicas algo que en parte podría explicar el por qué encontramos a esta población en el análisis. Otro de los procesos que se encontraban favorecidos era el de la vía FoxO la cual corresponde a una familia de factores de transcripción (FTs) como FoxO1, FoxO3, FoxO4 y FoxO6 que han emergido como reguladores clave de la proliferación y el crecimiento celular, además de ser considerados como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. Esta familia de FTs esta involucrada en la regulación de los procesos apoptóticos ya que en algunos estudios se ha encontrado disminuida su expresión, evitando así que los mecanismos que controlan el ciclo celular como p53 ejecuten sus funciones (You et al., 2006), la inducción de apoptosis mediante las proteínas FoxO requiere de un alineamiento con condiciones de estrés oxidante, la cual es otra de las vías que esta enriquecida en esta población. En conjunto estos resultados sugieren que esta es una población que se encuentra muriendo y debido a eso se diferenció del resto, sin embargo, hay evidencia de

que las células tumorales al igual que un patógeno evade la respuesta inmune, utilizando “disfraces” inteligentes para camuflarse de las defensas del hospedero. Con relación a esto, hay estudios que hablan sobre las consecuencias que genera la muerte celular dentro del micro-ambiente tumoral, ya que afecta a diferentes funciones celulares tales como supervivencia, proliferación, migración, metabolismo y diferenciación. Es debido a estos efectos extrínsecos postmortem, que las células que se encuentran muriendo pueden actuar para promover más que retrasar la progresión tumoral. La vía FoxO además ha sido relacionada de manera positiva con las células troncales tumorales, ya que se ha visto que la delección de estos factores de transcripción puede ocasionar que no se generen más células troncales y que las ya existentes entren en apoptosis (Ucker and Levine, 2018, Tothova et al., 2007). Estos hallazgos de igual manera sugieren que la población de células troncales tumorales de esta línea celular se encuentra dentro del cluster 5 encontrado gracias a Phenograph.

Gracias a los trabajos hechos por otros grupos de investigación en los cuales encontraron la presencia de sub-poblaciones en líneas celulares de cáncer de páncreas fue que decidimos utilizar una de las firmas genéticas determinadas por estos para realizar un análisis supervisado de los datos, con lo cual obtuvimos una clara separación de la muestra hasta en tres sub-poblaciones diferentes, estos resultados son similares a los obtenidos por el grupo de investigación del que tomamos la firma genética (Ligorio et al., 2019), quienes delimitan las poblaciones con base en los marcadores que estas expresan, tomando a Ki67 como un marcador específico de las células denominadas como PRO, adicionalmente tomamos a CDK1, otro de los genes expresados por esta población, ambos mostraron un enriquecimiento en la misma zona del gráfico, con todo esto se determinó a la población 1 como la que se encontraba en proliferación. Todo esto apoyado por el enriquecimiento funcional el cual mostró que los genes expresados por esta población estaban relacionados con el ciclo y la división celular, mismas vías que corresponden enteramente con las reportadas por Ligorio. Por el contrario, no fue posible determinar la presencia de la población correspondiente a EMT como lo hacen ellos, esto probablemente se debe al hecho de que nuestro modelo carece de las ventajas y modificaciones que ejerce el micro-ambiente sobre las células tumorales, puesto que ellos observan diferencias en cuanto a la cantidad de células que conforman cada población y se lo atribuyen a las diferentes proporciones en que co-cultivan a las células tumorales con una línea celular de fibroblastos asociados a tumor.

Solo para verificar que las poblaciones identificadas fueran diferentes entre sí, se analizaron sus perfiles de expresión entre las muestras, con lo cual confirmamos que existían las diferencias entre las poblaciones.

En conjunto todos estos resultados, nos llevan a una afirmación, la heterogeneidad intra-tumoral en el cáncer de páncreas existe, claro que se trata solo de una línea celular, pero es un hecho que concuerda con lo encontrado en otro estudio en el cual se analizaron

muestras de tumores primarios de pacientes, a las cuales se les practicó la secuenciación de RNA a nivel de célula única, ellos fueron capaces de encontrar al menos diez poblaciones diferentes mediante un algoritmo de t-SNE, dentro de las que destaca el que hallaron dos tipos de células ductales, de las cuales una de ellas mostraba características relacionadas al funcionamiento normal del páncreas y la otra relacionadas con la agresividad. Además de esto encontraron que las células ductales de tipo 2 se sub-dividían en 6 poblaciones más, dentro de las cuales encontraron una que mostraba un enriquecimiento en funciones relacionadas con la proliferación y el ciclo celular y otra con la regulación positiva de la vía apoptótica, resultados que concuerdan con los encontrados en este estudio, con lo cual podemos asumir que esta línea celular estaría más relacionada a las células ductales tipo 2, sin embargo, sería necesario confirmarlo. Es esperable que las diferencias no sean tan marcadas debido a que no se trata de una muestra de un tumor en donde encontramos células endoteliales, células de la respuesta inmune, células acinares, fibroblastos, etc., no obstante pudimos recapitular la heterogeneidad intra-tumoral observada de manera *in vivo* en una línea celular (Peng et al., 2019).

Conclusiones

Conseguimos estandarizar las condiciones adecuadas para el encapsulamiento de las células individuales de la línea celular de cáncer de páncreas AsPC-1, con lo cual conseguimos realizar el primer estudio de este tipo en México. Los datos obtenidos fueron analizados con éxito mediante diferentes algoritmos para la reducción de la dimensionalidad, de estos podemos concluir que el análisis de PCA debe ser más efectivo en muestras cuyas diferencias transcripcionales sean mucho más evidentes, debido a que se trata de un algoritmo de tipo lineal, no obstante los datos de este pueden ser usados en los otros algoritmos de tipo no lineal como los que fueron utilizados aquí. De los dos algoritmos de este tipo podemos concluir que UMAP preserva de una mejor manera la estructura global de los datos, puesto que el traslape entre las poblaciones era menos evidente en un gráfico de este tipo en comparación con el de t-SNE que se mantiene como el estándar de oro para la reducción dimensional. Phenograph resultó de gran utilidad, puesto que fue capaz de identificar poblaciones de manera automatizada, evitado los sesgos realizando un análisis no supervisado de los datos, que eliminó el problema de la selección manual de las poblaciones, consiguiendo resultados más confiables al momento de analizar la expresión diferencial.

Con base en los resultados obtenidos y los análisis realizados en este estudio podemos evidenciar que la heterogeneidad intra-tumoral del cáncer de páncreas es evidente en la línea celular que se utilizó, lo cual coincide con los resultados del grupo de investigación de Peng y cols., obtenidos de muestras provenientes de tumores primarios de pacientes.

Literatura citada

- AFIFY, S. M. & SENO, M. 2019. Conversion of Stem Cells to Cancer Stem Cells: Undercurrent of Cancer Initiation. *Cancers (Basel)*, 11.
- AL-HAJJ, M., WICHA, M. S., BENITO-HERNANDEZ, A., MORRISON, S. J. & CLARKE, M. F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3983-8.
- ALEXANDROV, L. B., NIK-ZAINAL, S., WEDGE, D. C., APARICIO, S. A., BEHJATI, S., BIANKIN, A. V., BIGNELL, G. R., BOLLI, N., BORG, A., BORRESEN-DALE, A. L., BOYVAULT, S., BURKHARDT, B., BUTLER, A. P., CALDAS, C., DAVIES, H. R., DESMEDT, C., EILS, R., EYFJORD, J. E., FOEKENS, J. A., GREAVES, M., HOSODA, F., HUTTER, B., ILICIC, T., IMBEAUD, S., IMIELINSKI, M., JAGER, N., JONES, D. T., JONES, D., KNAPPSKOG, S., KOOL, M., LAKHANI, S. R., LOPEZ-OTIN, C., MARTIN, S., MUNSHI, N. C., NAKAMURA, H., NORTHCOTT, P. A., PAJIC, M., PAPAEMMANUIL, E., PARADISO, A., PEARSON, J. V., PUENTE, X. S., RAINE, K., RAMAKRISHNA, M., RICHARDSON, A. L., RICHTER, J., ROSENSTIEL, P., SCHLESNER, M., SCHUMACHER, T. N., SPAN, P. N., TEAGUE, J. W., TOTOKI, Y., TUTT, A. N., VALDES-MAS, R., VAN BUUREN, M. M., VAN 'T VEER, L., VINCENT-SALOMON, A., WADDELL, N., YATES, L. R., AUSTRALIAN PANCREATIC CANCER GENOME, I., CONSORTIUM, I. B. C., CONSORTIUM, I. M.-S., PEDBRAIN, I., ZUCMAN-ROSSI, J., FUTREAL, P. A., MCDERMOTT, U., LICHTER, P., MEYERSON, M., GRIMMOND, S. M., SIEBERT, R., CAMPO, E., SHIBATA, T., PFISTER, S. M., CAMPBELL, P. J. & STRATTON, M. R. 2013. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500, 415-21.
- ALDOMARE, D. A., TANNO, S., DE RIENZO, A., KLEIN-SZANTO, A. J., TANNO, S., SKELE, K. L., HOFFMAN, J. P. & TESTA, J. R. 2002. Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *J Cell Biochem*, 87, 470-6.
- ANDERSON, A. R., WEAVER, A. M., CUMMINGS, P. T. & QUARANTA, V. 2006. Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. *Cell*, 127, 905-15.
- BARBATO, L., BOCCHETTI, M., DI BIASE, A. & REGAD, T. 2019. Cancer Stem Cells and Targeting Strategies. *Cells*, 8.
- BARDEESY, N. & DEPINHO, R. A. 2002. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer*, 2, 897-909.
- BECHT, E., MCINNES, L., HEALY, J., DUTERTRE, C. A., KWOK, I. W. H., NG, L. G., GINHOUX, F. & NEWELL, E. W. 2018. Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat Biotechnol*.
- BEKAI-SAAB, T. & EL-RAYES, B. 2017. Identifying and targeting cancer stem cells in the treatment of gastric cancer. *Cancer*, 123, 1303-1312.
- BJERKVIG, R., TYSNES, B. B., ABOODY, K. S., NAJBAUER, J. & TERZIS, A. J. 2005. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer*, 5, 899-904.
- BOSETTI, C., LUCENTEFORTE, E., SILVERMAN, D. T., PETERSEN, G., BRACCI, P. M., JI, B. T., NEGRI, E., LI, D., RISCH, H. A., OLSON, S. H., GALLINGER, S., MILLER, A. B., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., TALAMINI, R., POLESEL, J., GHADIRIAN, P., BAGHURST, P. A., ZATONSKI, W., FONTHAM, E., BAMLET, W. R., HOLLY, E. A., BERTUCCIO, P., GAO, Y. T., HASSAN, M., YU, H., KURTZ, R. C., COTTERCHIO, M., SU, J., MAISONNEUVE, P., DUELL, E. J., BOFFETTA, P. & LA VECCHIA, C. 2012. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Ann Oncol*, 23, 1880-8.
- BOSETTI, C., ROSATO, V., LI, D., SILVERMAN, D., PETERSEN, G. M., BRACCI, P. M., NEALE, R. E., MUSCAT, J., ANDERSON, K., GALLINGER, S., OLSON, S. H., MILLER, A. B., BAS BUENO-DE-MESQUITA, H., SCELO, G., JANOUT, V., HOLCATOVA, I., LAGIOU, P., SERRAINO, D., LUCENTEFORTE, E., FABIANOVA, E., GHADIRIAN, P., BAGHURST, P. A., ZATONSKI, W., FORETOVA, L., FONTHAM, E., BAMLET, W. R., HOLLY, E. A., NEGRI, E., HASSAN, M., PRIZMENT, A., COTTERCHIO, M., CLEARY, S., KURTZ, R. C., MAISONNEUVE, P., TRICHOPOULOS, D., POLESEL, J., DUELL, E. J., BOFFETTA, P. & LA VECCHIA, C. 2014. Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. *Ann Oncol*, 25, 2065-72.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A. & JEMAL, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68, 394-424.

- CAO, J., YANG, J., RAMACHANDRAN, V., ARUMUGAM, T., DENG, D., LI, Z., XU, L. & LOGSDON, C. D. 2015. TM4SF1 Promotes Gemcitabine Resistance of Pancreatic Cancer In Vitro and In Vivo. *PLoS One*, 10, e0144969.
- CROS, J., RAFFENNE, J., COUVELARD, A. & POTE, N. 2018. Tumor Heterogeneity in Pancreatic Adenocarcinoma. *Pathobiology*, 85, 64-71.
- CURTIS, S. J., SINKEVICIUS, K. W., LI, D., LAU, A. N., ROACH, R. R., ZAMPONI, R., WOOLFENDEN, A. E., KIRSCH, D. G., WONG, K. K. & KIM, C. F. 2010. Primary tumor genotype is an important determinant in identification of lung cancer propagating cells. *Cell Stem Cell*, 7, 127-33.
- CHANG, D. K., GRIMMOND, S. M. & BIANKIN, A. V. 2014. Pancreatic cancer genomics. *Curr Opin Genet Dev*, 24, 74-81.
- CHARI, S. T., LEIBSON, C. L., RABE, K. G., TIMMONS, L. J., RANSOM, J., DE ANDRADE, M. & PETERSEN, G. M. 2008. Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer. *Gastroenterology*, 134, 95-101.
- CHEN, X., LI, Q., LIU, X., LIU, C., LIU, R., RYCAJ, K., ZHANG, D., LIU, B., JETER, C., CALHOUN-DAVIS, T., LIN, K., LU, Y., CHAO, H. P., SHEN, J. & TANG, D. G. 2016. Defining a Population of Stem-like Human Prostate Cancer Cells That Can Generate and Propagate Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*, 22, 4505-16.
- CHINN, S. B., DARR, O. A., OWEN, J. H., BELLILE, E., MCHUGH, J. B., SPECTOR, M. E., PAPAGERAKIS, S. M., CHEPEHA, D. B., BRADFORD, C. R., CAREY, T. E. & PRINCE, M. E. 2015. Cancer stem cells: mediators of tumorigenesis and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 37, 317-26.
- CHU, Z., ABU-BAKER, S., PALASCAK, M. B., AHMAD, S. A., FRANCO, R. S. & QI, X. 2013. Targeting and cytotoxicity of SapC-DOPS nanovesicles in pancreatic cancer. *PLoS One*, 8, e75507.
- DALERBA, P., DYLLA, S. J., PARK, I. K., LIU, R., WANG, X., CHO, R. W., HOEY, T., GURNEY, A., HUANG, E. H., SIMEONE, D. M., SHELTON, A. A., PARMIANI, G., CASTELLI, C. & CLARKE, M. F. 2007. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 10158-63.
- DI, J., DUIVEMAN-DE BOER, T., ZUSTERZEEL, P. L., FIGDOR, C. G., MASSUGER, L. F. & TORENSMA, R. 2013. The stem cell markers Oct4A, Nanog and c-Myc are expressed in ascites cells and tumor tissue of ovarian cancer patients. *Cell Oncol (Dordr)*, 36, 363-74.
- FOSTER, R., BUCKANOVICH, R. J. & RUEDA, B. R. 2013. Ovarian cancer stem cells: working towards the root of stemness. *Cancer Lett*, 338, 147-57.
- GIDEKEL FRIEDLANDER, S. Y., CHU, G. C., SNYDER, E. L., GIRNIUS, N., DIBELIUS, G., CROWLEY, D., VASILE, E., DEPINHO, R. A. & JACKS, T. 2009. Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. *Cancer Cell*, 16, 379-89.
- GREAVES, M. 2015. Cancer's Darwinian dilemma: an evolutionary tale in three acts. *BMJ*, 351, h6581.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HARAGUCHI, N., ISHII, H., MIMORI, K., TANAKA, F., OHKUMA, M., KIM, H. M., AKITA, H., TAKIUCHI, D., HATANO, H., NAGANO, H., BARNARD, G. F., DOKI, Y. & MORI, M. 2010. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest*, 120, 3326-39.
- HE, J., AHUJA, N., MAKARY, M. A., CAMERON, J. L., ECKHAUSER, F. E., CHOTI, M. A., HRUBAN, R. H., PAWLIK, T. M. & WOLFGANG, C. L. 2014. 2564 resected periampullary adenocarcinomas at a single institution: trends over three decades. *HPB (Oxford)*, 16, 83-90.
- HERMANN, P. C., HUBER, S. L., HERRLER, T., AICHER, A., ELLWART, J. W., GUBA, M., BRUNS, C. J. & HEESCHEN, C. 2007. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 1, 313-23.
- HOU, Y., ZOU, Q., GE, R., SHEN, F. & WANG, Y. 2012. The critical role of CD133(+)/CD44(+)/high tumor cells in hematogenous metastasis of liver cancers. *Cell Res*, 22, 259-72.
- HRUBAN, R. H., MAITRA, A., KERN, S. E. & GOGGINS, M. 2007. Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am*, 36, 831-49, vi.
- HU, Z. I., SHIA, J., STADLER, Z. K., VARGHESE, A. M., CAPANU, M., SALO-MULLEN, E., LOWERY, M. A., DIAZ, L. A., JR., MANDELKER, D., YU, K. H., ZERVOUDAKIS, A., KELSEN, D. P., IACOBUZIO-DONAHUE, C. A., KLIMSTRA, D. S., SALTZ, L. B., SAHIN, I. H. & O'REILLY, E. M. 2018. Evaluating Mismatch Repair

- Deficiency in Pancreatic Adenocarcinoma: Challenges and Recommendations. *Clin Cancer Res*, 24, 1326-1336.
- JUNTTILA, M. R. & DE SAUVAGE, F. J. 2013. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 501, 346-54.
- KANDA, M., MATTHAEI, H., WU, J., HONG, S. M., YU, J., BORGES, M., HRUBAN, R. H., MAITRA, A., KINZLER, K., VOGELSTEIN, B. & GOGGINS, M. 2012. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*, 142, 730-733 e9.
- KIMURA, O., TAKAHASHI, T., ISHII, N., INOUE, Y., UENO, Y., KOGURE, T., FUKUSHIMA, K., SHIINA, M., YAMAGIWA, Y., KONDO, Y., INOUE, J., KAKAZU, E., IWASAKI, T., KAWAGISHI, N., SHIMOSEGAWA, T. & SUGAMURA, K. 2010. Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpcAM)+ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Sci*, 101, 2145-55.
- KLEEFF, J., KORC, M., APTE, M., LA VECCHIA, C., JOHNSON, C. D., BIANKIN, A. V., NEALE, R. E., TEMPERO, M., TUVESON, D. A., HRUBAN, R. H. & NEOPTOLEMOS, J. P. 2016. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16022.
- KOPP, J. L., VON FIGURA, G., MAYES, E., LIU, F. F., DUBOIS, C. L., MORRIS, J. P. T., PAN, F. C., AKIYAMA, H., WRIGHT, C. V., JENSEN, K., HEBROK, M. & SANDER, M. 2012. Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 22, 737-50.
- KUMAR, D., GORAIN, M., KUNDU, G. & KUNDU, G. C. 2017. Therapeutic implications of cellular and molecular biology of cancer stem cells in melanoma. *Mol Cancer*, 16, 7.
- LAPIDOT, T., SIRARD, C., VORMOOR, J., MURDOCH, B., HOANG, T., CACERES-CORTES, J., MINDEN, M., PATERSON, B., CALIGIURI, M. A. & DICK, J. E. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367, 645-8.
- LAPIN, M., TJENSVOLL, K., OLTEDAL, S., JAVLE, M., SMAALAND, R., GILJE, B. & NORDGARD, O. 2017. Single-cell mRNA profiling reveals transcriptional heterogeneity among pancreatic circulating tumour cells. *BMC Cancer*, 17, 390.
- LI, C., HEIDT, D. G., DALERBA, P., BURANT, C. F., ZHANG, L., ADSAY, V., WICHA, M., CLARKE, M. F. & SIMEONE, D. M. 2007. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 67, 1030-7.
- LI, C., WU, J. J., HYNES, M., DOSCH, J., SARKAR, B., WELLING, T. H., PASCA DI MAGLIANO, M. & SIMEONE, D. M. 2011. c-Met is a marker of pancreatic cancer stem cells and therapeutic target. *Gastroenterology*, 141, 2218-2227 e5.
- LIGORIO, M., SIL, S., MALAGON-LOPEZ, J., NIEMAN, L. T., MISALE, S., DI PILATO, M., EBRIGHT, R. Y., KARABACAK, M. N., KULKARNI, A. S., LIU, A., VINCENT JORDAN, N., FRANCES, J. W., PHILIPP, J., KREUZER, J., DESAI, N., ARORA, K. S., RAJURKAR, M., HORWITZ, E., NEYAZ, A., TAI, E., MAGNUS, N. K. C., VO, K. D., YASHASWINI, C. N., MARANGONI, F., BOUKHALI, M., FATHERREE, J. P., DAMON, L. J., XEGA, K., DESAI, R., CHOZ, M., BERSANI, F., LANGENBUCHER, A., THAPAR, V., MORRIS, R., WELLNER, U. F., SCHILLING, O., LAWRENCE, M. S., LISS, A. S., RIVERA, M. N., DESHPANDE, V., BENES, C. H., MAHESWARAN, S., HABER, D. A., FERNANDEZ-DEL-CASTILLO, C., FERRONE, C. R., HAAS, W., ARYEE, M. J. & TING, D. T. 2019. Stromal Microenvironment Shapes the Intratumoral Architecture of Pancreatic Cancer. *Cell*, 178, 160-175 e27.
- LOBO, N. A., SHIMONO, Y., QIAN, D. & CLARKE, M. F. 2007. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 675-99.
- LU, P., WEAVER, V. M. & WERB, Z. 2012. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*, 196, 395-406.
- MACDONAGH, L., GRAY, S. G., BREEN, E., CUFFE, S., FINN, S. P., O'BYRNE, K. J. & BARR, M. P. 2016. Lung cancer stem cells: The root of resistance. *Cancer Lett*, 372, 147-56.
- MATTHAEI, H., SCHULICK, R. D., HRUBAN, R. H. & MAITRA, A. 2011. Cystic precursors to invasive pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 8, 141-50.
- MCGRANAHAN, N. & SWANTON, C. 2017. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*, 168, 613-628.
- MICHOR, F., IWASA, Y. & NOWAK, M. A. 2004. Dynamics of cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 4, 197-205.
- NEUZILLET, C., TIJERAS-RABALLAND, A., RAGULAN, C., CROS, J., PATIL, Y., MARTINET, M., ERKAN, M., KLEEFF, J., WILSON, J., APTE, M., TOSOLINI, M., WILSON, A. S., DELVECCHIO, F. R., BOUSQUET, C., PARADIS,

- V., HAMMEL, P., SADANANDAM, A. & KOCHER, H. M. 2019. Inter- and intra-tumoural heterogeneity in cancer-associated fibroblasts of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol*, 248, 51-65.
- ORTH, M., METZGER, P., GERUM, S., MAYERLE, J., SCHNEIDER, G., BELKA, C., SCHNURR, M. & LAUBER, K. 2019. Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. *Radiat Oncol*, 14, 141.
- PELOSI, E., CASTELLI, G. & TESTA, U. 2017. Pancreatic Cancer: Molecular Characterization, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Biomedicines*, 5.
- PENG, J., SUN, B. F., CHEN, C. Y., ZHOU, J. Y., CHEN, Y. S., CHEN, H., LIU, L., HUANG, D., JIANG, J., CUI, G. S., YANG, Y., WANG, W., GUO, D., DAI, M., GUO, J., ZHANG, T., LIAO, Q., LIU, Y., ZHAO, Y. L., HAN, D. L., ZHAO, Y., YANG, Y. G. & WU, W. 2019. Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Res*, 29, 725-738.
- PETERSEN, G. M. 2016. Familial pancreatic cancer. *Semin Oncol*, 43, 548-553.
- PRASETYANTI, P. R. & MEDEMA, J. P. 2017. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol Cancer*, 16, 41.
- PURI, S., FOLIAS, A. E. & HEBROK, M. 2015. Plasticity and dedifferentiation within the pancreas: development, homeostasis, and disease. *Cell Stem Cell*, 16, 18-31.
- RAN, S. & THORPE, P. E. 2002. Phosphatidylserine is a marker of tumor vasculature and a potential target for cancer imaging and therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 54, 1479-84.
- REYA, T., MORRISON, S. J., CLARKE, M. F. & WEISSMAN, I. L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, 105-11.
- RICCI-VITIANI, L., LOMBARDI, D. G., PILOZZI, E., BIFFONI, M., TODARO, M., PESCHLE, C. & DE MARIA, R. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445, 111-5.
- SCHATTON, T., MURPHY, G. F., FRANK, N. Y., YAMAURA, K., WAAGA-GASSER, A. M., GASSER, M., ZHAN, Q., JORDAN, S., DUNCAN, L. M., WEISHAUP, C., FUHLBRIGGE, R. C., KUPPER, T. S., SAYEGH, M. H. & FRANK, M. H. 2008. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, 451, 345-9.
- SINGH, S. K., CLARKE, I. D., TERASAKI, M., BONN, V. E., HAWKINS, C., SQUIRE, J. & DIRKS, P. B. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63, 5821-8.
- SINGH, S. R. 2013. Gastric cancer stem cells: a novel therapeutic target. *Cancer Lett*, 338, 110-9.
- SOTTORIVA, A., VERHOEFF, J. J., BOROVSKI, T., MCWEENEY, S. K., NAUMOV, L., MEDEMA, J. P., SLOOT, P. M. & VERMEULEN, L. 2010. Cancer stem cell tumor model reveals invasive morphology and increased phenotypical heterogeneity. *Cancer Res*, 70, 46-56.
- TOTHOVA, Z., KOLLIPARA, R., HUNTLY, B. J., LEE, B. H., CASTRILLON, D. H., CULLEN, D. E., MCDOWELL, E. P., LAZO-KALLANIAN, S., WILLIAMS, I. R., SEARS, C., ARMSTRONG, S. A., PASSEGUE, E., DEPINHO, R. A. & GILLILAND, D. G. 2007. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*, 128, 325-39.
- TSAI, H. J. & CHANG, J. S. 2019. Environmental Risk Factors of Pancreatic Cancer. *J Clin Med*, 8.
- TSUBAKIHARA, Y. & MOUSTAKAS, A. 2018. Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis under the Control of Transforming Growth Factor beta. *Int J Mol Sci*, 19.
- UCKER, D. S. & LEVINE, J. S. 2018. Exploitation of Apoptotic Regulation in Cancer. *Front Immunol*, 9, 241.
- VERMEULEN, L., TODARO, M., DE SOUSA MELLO, F., SPRICK, M. R., KEMPER, K., PEREZ ALEA, M., RICHEL, D. J., STASSI, G. & MEDEMA, J. P. 2008. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 13427-32.
- WARBURG, O. 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124, 269-70.
- WEINBERG, R. A. 2014. *The biology of Cancer* New York, United States of America, Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC.
- WITSCH, E., SELA, M. & YARDEN, Y. 2010. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*, 25, 85-101.
- YACHIDA, S., JONES, S., BOZIC, I., ANTAL, T., LEARY, R., FU, B., KAMIYAMA, M., HRUBAN, R. H., ESHLEMAN, J. R., NOWAK, M. A., VELCULESCU, V. E., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. & IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. 2010. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, 467, 1114-7.
- YANG, Z. F., HO, D. W., NG, M. N., LAU, C. K., YU, W. C., NGAI, P., CHU, P. W., LAM, C. T., POON, R. T. & FAN, S. T. 2008. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell*, 13, 153-66.

- YEUNG, T. M., GANDHI, S. C., WILDING, J. L., MUSCHEL, R. & BODMER, W. F. 2010. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3722-7.
- YOU, H., YAMAMOTO, K. & MAK, T. W. 2006. Regulation of transactivation-independent proapoptotic activity of p53 by FOXO3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 9051-6.