

Tesi doctoral presentada per En/Na

Albert SANTAMARIA MARTÍNEZ

amb el títol

**"Identificació, aïllament i caracterització de
cèl.lules mare en models de càncer de pròstata"**

per a l'obtenció del títol de
Doctor per la Universitat de Barcelona

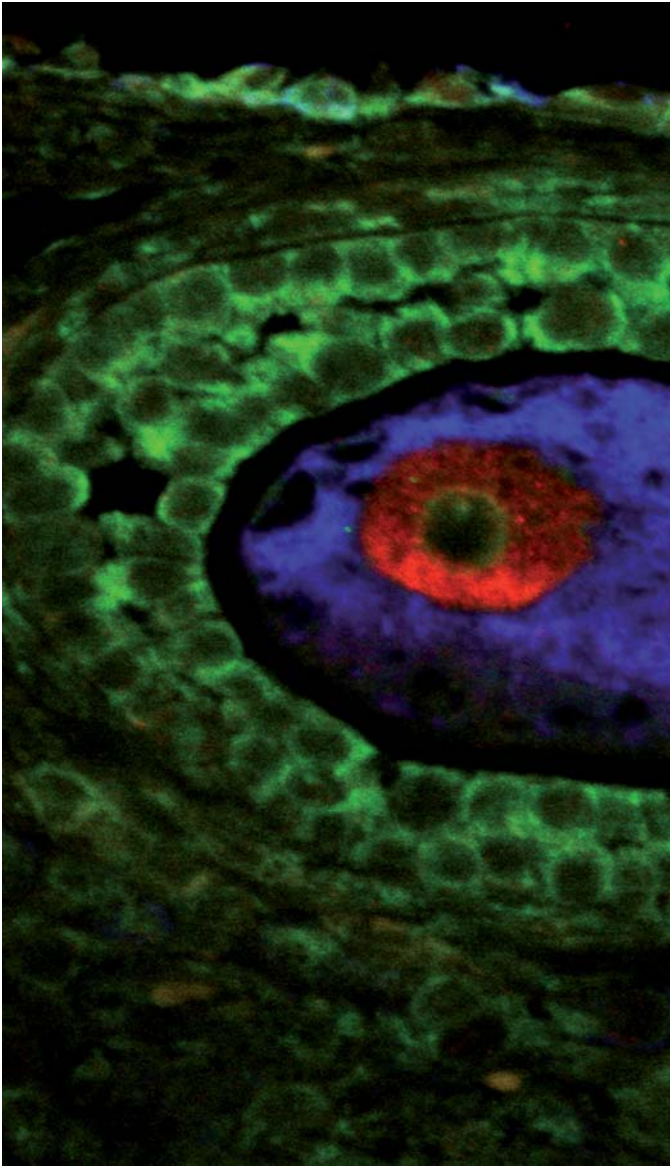
Barcelona, 11 de juny de 2009.

**Facultat de Medicina
Departament de de Biologia Cel.lular,
Immunologia i Neurociències**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



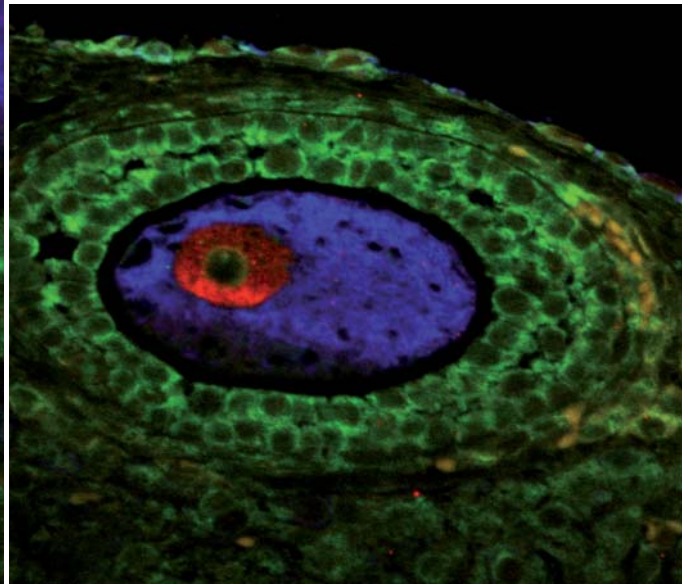


No one will remember if we were good men or bad, why we fought or how we died, no. All that matters is that two stood against many. That's what's important.

Conan, the Barbarian

I leave this ode, splendid victorious through the carnage. I wanted to touch them all. I wanted to touch them all.

MDB, Turn loose the swans



5. DISCUSSIÓ

L'ull de la serp (Immunohistofluorescència sobre un tall d'ovari murí realitzada per ASM i captada per na MVS, 2005)

5. Discussió

5.1. El model *PAC-120*

5.1.1 Anàlisi dels tumors. Presència de cèl·lules multipotents estromals amb fenotip SP i els seus rols.

Amb l'objectiu d'estudiar la possible presència de cèl·lules progenitores als tumors del *PAC-120*, es va procedir a analitzar la SP dels mateixos (algunes anàlisis prèvies realitzades a la tardor del 2004 ja havien mostrat l'existència d'una població SP a mostres de pròstata hiperplàsica humana). Aquestes anàlisis van demostrar que els tumors del *PAC-120* presenten una població SP. Malauradament, la composició mucinosa i heterogènia del tumor, així com la seva consistència en dificulten considerablement l'anàlisi i resulta complicat obtenir suspensions cel·lulars prou abundants (i cèl·lules prou viables) com per fer una anàlisi —i encara més una separació cel·lular per extreure'n l'RNA. Val a dir que, així com en cèl·lules en cultiu no presenta unes dificultats tècniques massa especials, en el present estudi s'ha remarcat que l'extracció d'un RNA de qualitat acceptable en mostres de teixit fresc de moll d'os i de pròstata marcades per l'assaig SP és més complicat. S'havia especulat sobre la possibilitat que aquestes cèl·lules SP fossin transcripcionalment menys actives, i per això s'obtinguessin concentracions més baixes d'RNA en les fraccions SP que en les no SP tot i partir del mateix nombre de cèl·lules. Aquesta hipòtesi no va ser recolzada per l'estadística, que no permet establir que hi hagin diferències significatives quant a les concentracions d'RNA obtingudes de les dues fraccions. De totes maneres sí que és cert que de les SP del moll d'os, probablement per les característiques pròpies del teixit —teixit hipòxic, molt macrofàgic i de condicions microambientals particulars—, ha estat difícil extreure un RNA abundant i de qualitat òptima.

Malgrat que es va demostrar la presència de cèl·lules de la *side population* al *PAC-120*, no es va resoldre si alguna de les cèl·lules trobades als assaigs de citometria fets en fragments del tumor fresc corresponien a la part humana epitelial del tumor. S'ha pogut descriure la presència de trànscrips humans d'*ABCG2* i la presència de la proteïna per transferència *western* als tumors però també la metilació pràcticament total del promotor d'*ABCG2* als tumors en els clons analitzats. És evident que la seqüenciació d'uns pocs clons —cada un dels quals correspon a una molècula de DNA, és a dir a una cèl·lula— pot no ser representativa del total del tumor. Tanmateix l'anàlisi de l'estat de metilació del promotor d'*ABCG2* de tres tumors independents ha donat dades molt semblants, per la qual cosa hom pot inclinar-se a pensar que els resultats són significatius i que, en conjunt, el promotor d'*ABCG2* està metilat al *PAC-120*. Aquests resultats, si bé indirectament, explicaven en part per què es trobaven relativament poques *SP* als tumors, i feien pensar que una bona part d'aquestes podien ser murines. Ara bé, això no implica que en unes poques cèl·lules no ho estigui, de metilat. I si hom pensés que l'expressió de l'*ABCG2* lligada al fenotip *SP* és una característica de les cèl·lules mare canceroses, podrien ser aquestes les cèl·lules responsables del manteniment del tumor. En el present estudi s'han obtingut alguns indicis que apunten a aquest fet. Per exemple en 4 ocasions en què s'ha realitzat l'exèresi del tumor, un temps després s'ha produït un recreixement del mateix —cal remarcar que el tumor presenta una certa encapsulació (observi's la Figura R2) que en permet la seva extirpació de manera neta. Aquesta recidiva podria ser conseqüència que unes poques cèl·lules circulants o disseminades romanguessin al lloc del tumor fruit d'una exèresi imperfecta o de la seva presència fora de la regió tumoral encapsulada. Sigui com sigui, és indiscutible que, atès que són molt poques en nombre, aquestes cèl·lules restants han de tenir una capacitat proliferativa i tumorigènica molt elevada, pròpia de les cèl·lules mare canceroses. Altrament, és probable que aquestes poques cèl·lules tinguin un avantatge, que és que tenen facilitada l'angiogènesi pel tumor. En aquest sentit també hi podria ajudar força el fet que l'extirpació implica que la ferida generada ha de cicatritzar i aquest fet implica un procés inflamatori. Tant els processos de tancament de ferides com els inflamatoris estan relacionats amb càncer i són processos els paral·lelismes dels quals són estudiats,²⁰⁷ i en tot cas implica la infiltració de cèl·lules que poden ajudar al creixement de tumor. L'estudi d'aquests tumors en els seus diferents estadis de creixement podria ajudar a aclarir aquest punt.

Tenint en compte els resultats anteriorment comentats, es va procedir a fer cultius dels tumors. Malgrat tot, les cèl·lules epitelials requereixen uns factors i unes condicions de cultiu particulars i, de fet, en els cultius obtinguts s'observava que les cèl·lules epitelials romanien en un estat quiescent fins que acabaven degenerant en

qüestió de pocs dies. En canvi, les cèl·lules murines amb aspecte fibroblàstic proliferaven i acabaven envaint el cultiu, fet gens sorprenent tenint en compte que els fibroblasts creixen amb facilitat en condicions no específiques (Figura D1).

En aquest treball es van purificar successivament els cultius enriquint-los progressivament en població SP fins arribar a fer una separació de cèl·lula única per obtenir clons de SP. Prèviament a aquesta separació es va investigar l'origen d'aquestes cèl·lules i es va determinar que era murí. Això va permetre excloure una possible transició epiteli-mesènquima, fenomen que causa la transdiferenciació de cèl·lules epitelials

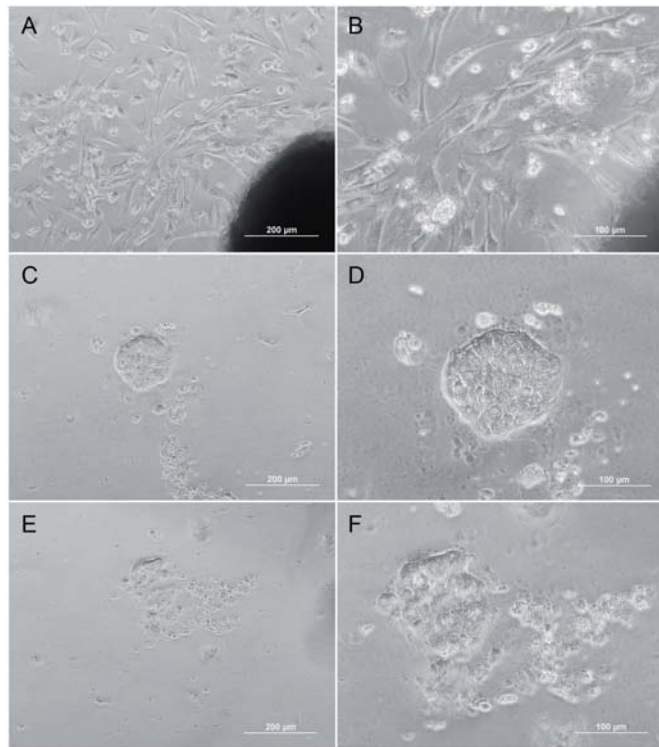


Figura D1: Imatges dels cultius primaris del PAC-120 quatre dies després de sembrar el tumor. Les imatges A i B mostren a diferents augments (escales 200 µm i 100 µm) cèl·lules de morfologia fibroblastoide que creixen a partir d'un fragment de teixit. Les imatges C i D mostren una colònia epitelial i a E i F es mostra la degeneració d'una de les colònies.

cap a cèl·lules amb un fenotip fibroblastoide i que s'associa amb la potenciació de la progressió tumoral maligna.²⁰⁸ Així doncs, aquests clons, un cop reanaltzats quant al seu fenotip SP, presentaven perfils de *side population* diferents entre ells, amb un coeficient de variació interclonal del 26,78%. Aquestes diferències demostren que la població SP és heterogènia, tal i com s'havia descrit, però l'explicació de les susdites pot ser diversa. En primer lloc val la pena remarcar que, tot i que en alguns casos en els clons no s'obtenia una població no SP ben definida, és a dir, una població que permetés afirmar que l'assaig ha arribat a un punt de saturació —cal recordar que l'assaig SP pot veure's com un assaig de saturació—, l'addició de verapamil saturava millor l'assaig, i inhibia la població SP entre un 11% i pràcticament un 100% en funció del clon, i definia una població no SP clara. Això indica que la *side population* obtinguda és real i no artefactual. Per explicar les diferències entre els clons, d'una banda, podria ser que el fenotip SP estigués reflectint un estat de diferenciació determinat i que les diferències entre els clons fossin degudes a diferències en l'estat general de diferenciació de les cèl·lules dels mateixos. Aquesta hipòtesi estaria recolzada d'una banda, pel fet que aquests clons perdien la SP a mesura que s'anaven diferenciant i a més es va comprovar que la

inducció de la diferenciació dels clons els feia perdre el fenotip SP, i per l'altra, i relacionada amb aquesta, perquè les diferenciacions costaven més temps d'assolir en alguns clons que en altres. Una altra possible explicació per les diferències percentuals de la SP entre els clons podria ser l'activitat del transportador. El transportador *Abcg2* podria estar funcionant d'una manera diferent als diferents clons i això es veuria reflectit en diferències en la SP dels mateixos. De fet, les variacions de la SP en relació amb l'activitat del transportador és un fenomen que ja s'ha descrit.¹⁸⁸ No obstant, podria ser que altres proteïnes estiguessin participant de l'extrusió, ja que com van demostrar els *microarrays*, hi ha altres transportadors ABC amb valors elevats, i això també podria suposar una diferència interclonal quant a llurs *side populations*, atès que hi podrien haver altres transportadors relacionats amb el fenotip SP, ja que el ratolí triple *knock-out* per *Bcrp1/Mdr1a/b* encara presenta una població SP²⁰⁹ i per exemple, mentre que tant el clon 1 com el 2 als xips presentaven valors de *Mdr1a* per sota del llindar fixat per considerar-los “expressats”, el clon 10 presentava un valor superior, i també hi havien diferències per *Abca4*, *Abcb6*, *Abcc1*, *Abcc4*, *Abcd1* i *Abcf3*. En certa manera podria sorprendre que el valor d'*Abcg2* als *microarrays* sigui relativament baix tenint en compte que els clons presenten una població SP abundant —malgrat tot cal recordar que es van detectar trànscrips d'*Abcg2* (isoformes 1a i 1c) per PCR als clons. Certament, com s'ha anat veient al llarg del treball, els valors d'RNA i fins i tot els de proteïna podrien no tenir una relació directa amb l'activitat del transportador *Abcg2* i el fenotip SP. No obstant, el fet que l'addició de verapamil inhibeixi la *side population* d'aquests clons indica que el fenotip SP és degut a l'acció d'un transportador. Ara bé, el verapamil no és un inhibidor totalment específic, ja que també inhibeix el transportador Mdr. Una prova a favor d'aquesta hipòtesi sobre les diferències percentuals d'SP als clons és que, com s'ha comentat, el clon 10 presentava uns nivells de *Mdr1a* majors que els dels altres clons (que es pot dir que no l'expressaven) i quan es tractava amb verapamil, el clon 10 perdia pràcticament tota la població SP, cosa que no passava amb els altres clons (Figures R32 i R33). L'ús d'inhibidors més específics com la reserpina podria ajudar a esclarir aquest dubte. Una darrera explicació per aquest fet és que podria ser que tota la població dels clons fos SP i les diferències entre el que s'ha anomenat cèl·lules Ho^{baix} i Ho^{elevat} fossin degudes al fet que estan en moments del cycle cel·lular diferents —ja que el citograma de les SP també reflexa el cycle cel·lular tal i com es mostra a la figura I15. Tanmateix, aquesta hipòtesi no es va investigar en profunditat.

Atesa l'expectació i la utilitat a l'hora d'identificar poblacions enriquides en cèl·lules progenitores dins d'aquesta població SP —si més no en alguns casos com el de moll d'os—, diversos grups han perseguit i aconseguit els perfils genètics de les cèl·lules de la *side population* en diferents teixits estudiats.^{210,211} No obstant, presa com a conjunt, la *side population* és una població heterogènia. Per exemple, en els carcinomes, la *side*

population pot comprendre diversos tipus cel·lulars, com epitelials, estromals, etc —tal i com es demostra també en aquest treball. En aquest sentit, els xenotrasplantaments com el *PAC-120* presenten un avantatge: els tipus cel·lulars epitelials poden distingir-se fàcilment de l'estroma perquè són humans, i per tant, a priori es pot dir que tot allò que és murí és estromal i el que és humà o bé és epitelial o bé ha patit una transició espitelimesènquima. Malgrat això, també presenta un inconvenient, i és que, per tal de realitzar l'assaig de la *side population* amb teixits frescos amb l'objectiu de separar cèl·lules, extreure'ls l'RNA i fer microxips, hom hauria de determinar primer l'origen de les cèl·lules i separar-les en els dos grups segons l'espècie —per triar el tipus de xip (humà o murí) amb què hibridar l'RNA i no tenir una barreja de RNAs que no permetria fer una valoració comparativa entre dues mostres, ja que es desconixerien les proporcions d'RNA de cada espècie presents a la mostra. Per tal com aquesta discriminació no es va poder fer *a priori* —no hi havia prou material ni marcadors de membrana que ho permetessin—, i atès que ja s'ha esmentat que l'assaig SP amb tumors *PAC-120* frescos presentava unes complicacions tècniques importants, es va decidir fer els assajos amb els cultius cel·lulars. És evident que un cultiu cel·lular presenta unes condicions molt allunyades de les fisiològiques: des del medi en què es troben les cèl·lules, el contacte i les relacions amb altres cèl·lules en el seu ambient fisiològic, la concentració de gasos (als incubadors corrents les cèl·lules es troben en una situació d'hiperòxia), i tants altres factors que poden afectar el comportament i l'expressió gènica d'aquestes cèl·lules. Tanmateix, com en els models animals, els cultius busquen reproduir si més no certes característiques en un medi artificial —entenent medi com el conjunt de condicions i l'entorn en què viuen aquestes cèl·lules. En el cas d'aquest treball, sempre s'ha buscat que aquelles característiques trobades en els treballs fets en cultiu amb les cèl·lules procedents del tumor, es reproduïssin en el mateix tumor (fresc o congelat, en funció del que es volgués analitzar). I en aquest sentit, es van trobar cèl·lules de la *SP* tant al tumor fresc com als cultius.

Reprement el tema de l'heterogeneïtat de la *SP*, aquest va ser un dels motius principals pels quals es va plantejar realitzar microxips de les fraccions H_0^{baix} i H_0^{elevat} dels clons cel·lulars. Evidentment, *a priori* presenta un dubte important: ¿hi haurà moltes diferències entre aquests grups de cèl·lules en una població clonal? Lògicament hom s'inclina a creure que no moltes, però tanmateix, l'experiment era doblement interessant: d'una banda permetia comprovar aquest punt sobre les diferències entre les dues poblacions en un clon, i de l'altra permetia obtenir una perfilació gènica massiva d'una cèl·lules *SP* el tipus cel·lular del qual no s'havia aclarit. Aquest punt és especialment remarcable: aquest assaig va ser fet a cegues. Certament les mostres no van ser triades de manera aleatòria, sinó que se'n van escollir tres que presentessin un percentatge d'*SP*

similar ($53,19\% \pm 6,17\%$), però no hi va haver condicionament *a priori* per anar a buscar uns resultats determinats.

Les anàlisis estadístiques realitzades van mostrar que hi havia diferències significatives quant a l'expressió gènica entre les poblacions Ho^{baix} i Ho^{elevat} , tot que aquestes eren relativament baixes si es tenia en compte el paràmetre del *fold change*, que no superava el valor de 0,9. Aquest fet, en certa manera previsible, és molt probablement fruit de l'origen clonal de les cèl·lules. De totes maneres, el llistat de gens amb una expressió diferencial obtingut mostrava com els primers 43 gens, que presentaven un p-valor ajustat $<0,05$, eren gens que pertanyen als grups d'histones 1 i 2. Els baixos valors de *fold change*, la dificultat per obtenir l'RNA de les cèl·lules, i la presència de múltiples variants gèniques del grup de les histones al llistat van fer que no es considerés rendible comprovar aquests resultats per PCR a temps real. No obstant, a continuació es discutiran algunes possibles raons d'aquest resultat. D'una banda, aquests resultats podrien ser fruit de la toxicitat del Hoechst 33342. La toxicitat del Ho és coneguda des de fa temps, ja que se sap que és un inhibidor de la síntesi de DNA.²¹² Les diferències observades a les anàlisis dels xips indiquen que tots aquests gens d'histones, gens nuclears, estan sobreexpressats en les cèl·lules Ho^{baix} respecte de les Ho^{elevat} . Se sap que el Ho342 s'intercala en els parells de bases AT del DNA i que afecta la síntesi del DNA, procés en el qual estan implicades les histones. Per això hom podria pensar que les diferències observades en els xips quant a la sobreexpressió d'histones en les cèl·lules que han incorporat menys Ho342 podrien ser degudes al fet que les cèl·lules que n'han incorporat més han vist danyat lleument el seu DNA i han patit una certa toxicitat (més que les que no l'han incorporat ja que el bombejarien d'una manera més eficient). Per tant, els resultats podrien reflectir l'efecte del Hoechst sobre les cèl·lules. Tanmateix, llavors també és cert que hom podria esperar certes diferències quant a l'expressió de gens reparadors del DNA. D'altra banda, però, si consideréssim que la posició de les cèl·lules al citograma és funció del seu estat en el cicle, aquestes diferències podrien ser un reflex del cicle cel·lular de cada clon. Per últim, podríem considerar que aquesta expressió diferencial és fruit de diferències intrínseques de les cèl·lules que incorporen menys Hoechst. Si això fos així, caldria esbrinar per què aquestes cèl·lules tenen una expressió d'histones més elevada. Podria ser que presentessin uns patrons epigenètics diferents i que aquestes diferències en fossin el reflex. Amb aquesta hipòtesi es van realitzar immunoprecipitacions de DNA metilat (MeDIP) de cèl·lules Ho^{baix} i Ho^{elevat} dels clons —es van realitzar separacions d'entre 1.5 i $3 \cdot 10^6$ cèl·lules— per tal d'hibridar-los després amb xips de DNA i comprovar els patrons de metilació del DNA de les unes i les altres —experiments que duts a terme al grup del Dr. Manel Esteller i l'explicació dels resultats dels quals no es detalla perquè encara es troben en curs. Val a dir que els valors de *Dnmt1* —la metiltransferasa de DNA 1, encarregada del manteniment dels patrons de

metilació^{213,214} obtinguts als *arrays* són elevats i no presenten diferències massa elevades entre SP i no SP (No SP= $9,876 \pm 0,179$; SP= $9,799 \pm 0,291$). Això podria interpretar-se com que la transmissió dels patrons de metilació de les cèl·lules en divisió a les cèl·lules filles s'està duent a terme d'una manera prou constant en tot el conjunt del cultiu i que per tant podria ser que no s'observessin grans diferències en els patrons de metilació de les SP i les no SP; però l'acció de la *Dnmt1* no és explicada pel valor obtingut al xip, per la qual cosa aquest punt resta per esclarir.

Segui com sigui, les anàlisis dels microxips van permetre estudiar també els llistats de tots els gens del xip en què cada un tenia un valor —normalitzat— en funció de la intensitat de fluorescència recollida per l'escàner. Es van avaluar els gens amb valors més alts per poder obtenir informació sobre les cèl·lules i es va trobar un conjunt de gens relacionats amb cèl·lules multipotents estromals amb valors molt alts. Les anàlisis amb diferents programes d'agrupació gènica i ontològica com l'*Ingenuity pathways* (IP) i el *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) van confirmar la presència de molts gens relacionats, entre d'altres vies, amb el desenvolupament. És evident que els resultats depenen en gran mesura del llindar de tall que hom esculli —i que de fet hom escull d'una manera més o menys arbitrària atès que les dades no deixen de ser valors numèrics assignats a intensitats de fluorescència recollides per un escàner—, tal i com pot observar-se a la figura R21 en què es mostren les diferents vies trobades per l'*Ingenuity Pathways* situant el valor de tall de manera diferent. De totes maneres, resultava obvi que hi havien gens i vies relacionades amb les cèl·lules mare que presentaven valors elevats i que calia comprovar aquests resultats.

Per tal de comprovar els resultats dels xips es van escollir alguns gens d'interès que presentaven valors elevats i es van realitzar diferents tècniques com la transferència *western* per MMP-14, MMP-2 i TIMP-2 —totes tres essencials per a la capacitat invasiva de les MSC²¹⁵, la immunofluorescència (Sca-1, SMA, β -Cnnt), citometria (Sca-1, Cd45, Cd81) i PCR (*Cd44*, *Sca-1*, *Itgb1*, *Dlk1*). Ja que s'havia observat que els gens relacionats amb cèl·lules multipotents estromals tenien valors alts, es van fenotipar els clons per citometria amb Cd45, Cd81 i Sca1 i es va comprovar el seu fenotip Cd45⁺Sca-1⁺ i Cd81⁺. A més, la combinació de l'assaig SP i el marcatge amb aquests anticossos demostrava que tota la població era positiva o negativa pel marcatge amb l'anticòs però que hom podia discriminar dues poblacions en funció de la incorporació de Ho342. El marcatge homogeni pels anticossos és probablement fruit de l'origen clonal de les cèl·lules, mentre que la població SP pot ser deguda als factors que s'han comentat abans sobre l'activitat del transportador, l'estat de les cèl·lules al cicle, petites variacions en l'estat de diferenciació, etc. En tot cas, aquestes dades apuntaven al fet que aquestes cèl·lules podrien ser progenitores estromals. Els trets per tal de definir si una cèl·lula pot considerar-se progenitora s'han comentat anteriorment, però és evident que

una de les seves característiques principals i probablement la més rellevant és la seva capacitat per donar lloc a altres tipus cel·lulars i a si mateixa, és a dir la seva plasticitat, el seu potencial de diferenciació i autorenovació. Per això es van plantejar els experiments de diferenciació als llinatges adipogènic i osteogènic. Val a dir que també es va assajar la diferenciació miogènica mitjançant l'ús de 5-aza. Aquesta, però, no es va assolir, ja que les elevades concentracions de 5-aza descrites en el protocol que es va manllevar i utilitzar per a aquest fi, van provocar una elevada mortalitat de les cèl·lules. Tanmateix, les diferenciacions osteogènica i adipogènica sí que van esdevenir-se 21 dies després de començar el tractament d'inducció de la diferenciació. Cal esmentar que les diferenciacions es produïren d'una manera diferent a cada clon, és a dir, a una velocitat diferent. També és interessant subratllar que, en termes generals, es va observar una tendència a la diferenciació adipogènica en diversos clons. L'explicació a aquest darrer fenomen fou donada en un treball publicat a principis del 2008 en què es descriu que l'ús de DMEM amb una concentració elevada de glucosa (DMEM-HG) —precisament el que s'havia utilitzat— induïx la diferenciació adipogènica de les MSC.²¹⁶ Per això les diferenciacions també es van dur a terme en medi DMEM amb una concentració baixa de glucosa (DMEM-LG) amb un 10% de FBS. El canvi de medi va provocar canvis morfològics a les cèl·lules: es van tornar arrodonides, van mantenir una confluència total sense, però perdre la inhibició per contacte. En alguns clons aquests canvis eren en una part de les cèl·lules i en un clon va ser en tot el cultiu. Aquests canvis, tot i que només són observacions, indiquen la plasticitat de les MSC i com les variacions al medi poden afectar-les.

Com s'ha comentat, és sabut que només calen petits canvis al medi o a les condicions del cultiu per tal que es donin diferenciacions, atesa la gran plasticitat d'aquestes cèl·lules. Aquest fenomen també ha estat detectat en aquest treball, ja que en un dels clons es van observar diferenciacions a llinatge neurogènic. El marcatge amb l'anticòs TUJ1 va confirmar la presència de neurones al cultiu. No es pot descartar que hi haguessin altres tipus cel·lulars com astròcits, oligodendròcits o cèl·lules de la glia, però les tincions immunofluorescents no van permetre detectar-les.

Recapitulant, aquests resultats indiquen que en els cultius del tumor de pròstata *PAC-120* hi ha cèl·lules multipotents estromals que poden ser identificades i separades mitjançant l'assaig de la *side population*. Aquests resultats probablement són ensem extrapolables als models animals en general i al cas de la pròstata en particular. Quant a la particularitat de l'estudi en el camp de la pròstata, se sap que les interaccions estroma-epiteli són necessàries per al desenvolupament de moltes estructures i òrgans com la pròstata,^{217,218} i que les cèl·lules estromals juguen un rol important en l'equilibri homeostàtic de diversos teixits mitjançant la remodelació de la matriu extracel·lular i la resposta a condicions patològiques diverses.²¹⁹ Quant a la pròstata, se sap que la raó

estroma/epiteli es manté constant des del naixement fins als 40 anys en glàndules no hiperplàsiques,²²⁰ i que aquest quocient augmenta a una proporció de 2:1 en glàndules normals i de 5:1 en hiperplàsies benignes de pròstata.²²¹ De fet, es creu que la hiperproliferació de l'estroma promou el desenvolupament de la hiperplàsia benigna de pròstata, per la qual cosa hom pensa que hi podrien haver cèl·lules mare adultes al compartiment estromal que expandirien l'estroma en resposta a estímuls determinats durant la patogènesi de la hiperplàsia benigna de pròstata. I de fet, publicacions recents han demostrat la presència de cèl·lules estromals multipotents a la pròstata.^{222,223} A més, s'ha observat que els fibroblasts adjacents a les cèl·lules epitelials pateixen canvis que poden alterar les interaccions normals entre ambdós compartiments.²²⁴ Com s'ha comentat a la introducció, aquests fibroblasts associats a càncer (CAF) poden potenciar les propietats tumorigèniques de les cèl·lules epitelials.^{44,225} En aquest sentit, els resultats obtinguts en aquesta tesi no només confirmen els anteriors, sinó que hi afegeixen el fet que aquestes cèl·lules poden ser aïllades mitjançant l'assaig de la *side population*, ja que presenten el fenotip SP —característic de si més no algunes cèl·lules mare canceroses. Ja que s'ha associat la secreció de TGFβ per part del compartiment estromal amb la modulació del potencial oncogènic de l'epiteli adjacent,⁴⁴ aquestes cèl·lules estromals multipotents podrien estar regulant el potencial oncogènic del *PAC-120*, ja que com s'ha vist secreten TGFβ i les immunofluorescències realitzades demostren la presència de Smad2 fosforilat tant en el compartiment estromal com a l'epitelial. Per tant, l'ús de fàrmacs que afectessin la via del TGFβ podria representar una possible opció terapèutica que caldria avaluar. A més, i d'acord amb els resultats presentats en aquesta tesi, treballs recents demostren que hi ha similituds en els perfils gènics de les cèl·lules multipotents estromals (MSC) i les cèl·lules estromals tumorals (MTC),²²⁶ amb la qual cosa hom podria parlar de cèl·lules multipotents estromals canceritzades, és a dir, que formen part de l'estroma reactiu del tumor. D'altra banda, però, és possible que es pugui fer una certa generalització de les observacions realitzades en aquest treball amb el *PAC-120* i extrapolar els resultats a d'altres models animals i a altres tipus de tumors. De fet, alguns treballs recents ja han demostrat la presència de cèl·lules mare estromals als tumors generats en models animals i com aquestes cèl·lules promouen el creixement del tumor i la metastasi.²²⁷ Per tant, aquest podria ser un procés comú, d'una banda en els models animals —reclutament de cèl·lules multipotents estromals del moll d'os o altres teixits de l'hoste per activar l'angiogènesi i permetre o afavorir el creixement del tumor—, i de l'altra en els tumors humans, on aquestes cèl·lules serien evidentment pròpies però l'efecte derivat de llur acció, el mateix que als models.

L'anàlisi dels llistats generats amb la informació dels xips també va revelar la presència de molts gens relacionats amb la via del TGFβ que presentaven valors elevats.

La discussió d'aquests resultats amb el Dr. Joan Seoane, expert en el camp del TGF β , va fer que es considerés el fet de valorar si aquestes cèl·lules secretaven TGF β d'una manera autocrina i si l'ús d'un inhibidor de la via o d'un anticòs de bloqueig anti-TGF β (material cedit amablement pel Dr. Seoane) feia disminuir l'activitat de la via. Aquesta va ser valorada estudiant els nivells de proteïna Smad-2 fosforilada.²²⁸ Els resultats van demostrar que aquestes cèl·lules tenen la via activada, que secreten TGF β de manera autocrina i que la via es pot inhibir mitjançant el compost SB431542 o un anticòs de bloqueig. A més, alguns treballs apunten que la secreció autòloga de TGF β de les MSC inhibiria la diferenciació d'aquestes cèl·lules,^{229,230} per la qual cosa es van fer els assajos de diferenciació afegint-hi l'inhibidor del TGF β SB431542 i es va veure que les diferenciacions s'assolien més ràpidament (es van aturar i comprovar als 10 dies). A més, el tractament dels clons només amb aquest inhibidor en provocava la diferenciació osteogènica, cosa que reforça la idea que el TGF β està inhibint la diferenciació osteogènica.²³⁰ A més, aquest paper en la diferenciació també va acompanyat per un rol en la proliferació. Els assajos d'incorporació de BrdU realitzats van demostrar que hi havia una davallada de la proliferació quan els clons es tractaven 24 hores amb l'inhibidor SB431542. Això indica que el TGF β secretat per aquestes cèl·lules té també un paper proproliferatiu.

La valoració de l'estat de la via del TGF β als tumors va revelar que tant les cèl·lules tumorals epitelials com l'estroma presenten marcatge per p-Smad2. Això voldria dir que la via està activa en el conjunt del tumor, i probablement aquí també s'esdevé un diàleg entre l'estroma i l'epiteli. Si bé és cert que als epitelis normals el TGF β té un rol antiproliferatiu i funciona com un supressor de tumors, característiques que es perden amb el càncer,²³¹ darrerament el seu paper a l'estroma està cobrant molta importància. De fet, les accions del TGF β són diverses i duals, i en funció del tipus i estadi del tumor pot actuar com un factor supressor tumoral o pot promoure la progressió tumoral.²³³⁻²³⁵ També s'ha vist que la inhibició del TGF β a l'estroma reactiu d'un model de càncer de pròstata en fa disminuir l'angiogènesi i el creixement.²³⁶ Ja anteriorment s'havia proposat el rol del TGF β en la generació de l'estroma reactiu.^{237,238} Una de les explicacions donades a aquest fenomen és que el TGF β produït pels fibroblasts associats a càncer pot induir la tumorigènesi mitjançant la modificació del microambient, en concret els nivells elevats del factor derivat de cèl·lules estromals (SDF-1).²³⁹ Amb aquestes informacions prèvies es va provar de fer un assaig pilot inhibint *in vivo* la via mitjançant la injecció intratumoral del compost SB 431542 diluït en DMSO i sèrum fisiològic en un animal —sabent que el DMSO és molt ben tolerat pels animals a dosis fins i tot molt superiors a les emprades i no presenta pràcticament cap toxicitat. Els resultats indiquen que el compost podria estar fent un efecte sobre la via, ja que s'observa una lleu disminució de la proteïna Smad2 fosforilada. En el futur

caldrà veure quins efectes histològics ha produït al tumor —si és que n’ha produït cap— i tractar un nombre d’animals major per poder observar els efectes sobre la dinàmica de creixement del tumor i confirmar l’efecte de l’inhibidor. En cas que no es confirmés el seu efecte, podrien utilitzar-se una sèrie d’inhibidors alternatius (taula D1).

Drug	Type	Target	Stage
AP12009	Oligonucleotide	TGF- β 2	Phase II
AP-11014	Oligonucleotide	TGF- β 1	Preclinical
Lerdelimumab (CAT 152)	Antibody	TGF- β 2	Phase III
Metelimumab (CAT 192)	Antibody	TGF- β 1	Phase II
GC-1008	Antibody	All isoforms of human TGF- β	Phase I
ID11	Antibody	All isoforms of murine TGF- β	Preclinical
Ly550410	Small-molecule inhibitors	TGF- β RI kinase	Preclinical
Ly580276			
Ly364947			
Ly2109761			
Ly573636	Small-molecule inhibitor	TGF- β RI kinase	Phase II
SB-505124	Small-molecule inhibitor	TGF- β RI kinase	Preclinical
SB-431542			
SD-208	Small-molecule inhibitor	TGF- β RI kinase	Preclinical
SD-093			
Ki26894	Small-molecule inhibitor	TGF- β RI kinase	Preclinical
Sm16	Small-molecule inhibitor	TGF- β RI kinase	Preclinical
Trx-xFoxH1b	Interacting peptide aptamers	Smads	Preclinical
Trx-Lef1			
Antisense-transfected tumor cells	Vaccine	TGF- β 2	Phase I and II
Soluble TBR2-Fc	Stabilized soluble protein	TGF- β Rs	Preclinical

Taula D1: Llistat de fàrmacs utilitzats per a la inhibició del *TGF β* , dianes i estadi de dels estudis en humans. (Extret de Wrzesinski i col laboradors, 2007)

L’estudi dels llistats va permetre identificar altres gens amb valors elevats als *arrays* que resulten interessants, com per exemple el *Delta-like1 homologue (Dlk1)* o *Fetal antigen 1 (FAI)*. S’ha descrit que el *Dlk1* regula les funcions biològiques de les MSC humanes mitjançant una acció sobre la composició del seu nínxol, amb la modulació de l’expressió gènica de citocines proinflamatories i de factors relacionats amb la resposta immune²⁴⁰ —cal recordar que les MSC tenen un efecte immunomodulador. A més, aquest gen s’ha relacionat recentment amb cèl·lules mare prostàtiques.²⁴¹ En aquest treball es va comprovar l’expressió als clons per PCR i també es van dissenyar encebadors per la forma humana i es va comprovar la seva expressió en teixit de pròstata fetal i adult, essent positiva en el primer i negativa en el segon (Figura D2). També el gen *Mif (Macrophage migration inhibitory factor)* es va trobar elevat als xips. La presència del MIF a la sang ha estat avaluada com a factor pronòstic del càncer de pròstata en comparació amb el *PSA*,²⁴² i s’ha relacionat amb el càncer de pròstata.²⁴³ També s’ha vist que la seva inhibició atenua el creixement i la invasió de les cèl·lules *DUI45*.²⁴⁴

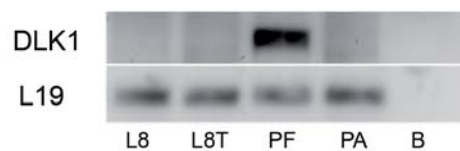


Figura D2: PCR per DLK1 amb mostres de LNCaP (L8), LNCaP tractades durant 48 hores amb 5-aza-deoxicidina (L8T), una pròstata fetal (PF) i una pròstata adulta (PA).

En el present treball es va comprovar la presència de trànscrips de *MIF* al *PAC-120*.

S'han observat diversos gens candidats els rols dels quals en les cèl·lules mare i el càncer de pròstata són susceptibles de ser estudiats en un futur, ja que certament, el volum d'informació generat a partir dels *arrays* és molt gran i no és factible ni desitjable que sigui l'objectiu d'un sol treball.

Pel que fa a l'origen de les cèl·lules estromals multipotents, aquest és un tema no resolt en aquesta tesi, però que mereix, si més no, uns comentaris. De cèl·lules estromals multipotents, se n'han trobat en diversos òrgans (llegeixi's la introducció). Tenint en compte la localització i evolució del tumor, el més lògic de pensar, doncs, és que aquestes cèl·lules tinguin tres llocs d'origen potencials: 1) el moll d'os; 2) el teixit adipós sota el qual es col·loca el tumor; 3) el múscul llis que l'envolta. Cap d'aquestes alternatives no es pot excloure, tot i que si hom considera els resultats de les anàlisi de la SP al moll d'os dels animals, hom se sent inclinat a pensar que, com a mínim una part de l'augment observat en aquests animals correspon a una resposta de l'hoste cap al tumor en aquest sentit. En cap cas, però, s'ha pogut demostrar clarament una causalitat entre l'augment de cèl·lules SP al moll d'os i la presència d'un estroma compost, entre d'altres tipus cel·lulars, per cèl·lules mare estromals —l'origen de les quals, doncs, segueix sent incert—, és a dir, no s'ha pogut demostrar que aquestes cèl·lules mare murines del tumor procedeixin del moll d'os dels animals. Però sí que hi ha proves indirectes que això podria ser així. Entre aquests indicis s'hi troba el fet que els clons analitzats per *microarrays* presenten uns valors elevats per gens que podrien distingir cèl·lules mare mesenquimals del moll d'os i, per exemple, de la sang perifèrica, com la cofilina.²⁴⁵ L'anàlisi de l'origen d'aquestes cèl·lules podria aportar més informació sobre llur paper en la progressió del tumor.

En darrer terme es va obtenir aquesta caracterització dels clons SP, però ¿quin és el seu paper en el càncer de pròstata? Per resoldre aquesta qüestió es va procedir a coinjectar un dels clons amb una línia cel·lular de pròstata hormonodependent i poc tumorigènica, és a dir, amb *LNCaP* —ja que això permet saber exactament quantes cèl·lules s'injecten—, a ratolins nusos per veure si participen o no en la generació i progressió tumorals i en quina mesura (l'afavoreixen o la inhibeixen). Hom ha descrit que la coinjecció de cèl·lules estromals del moll d'os i *LNCaP* afavoreix el creixement del tumor i l'adquisició d'un fenotip més tumorigènic per part de les *LNCaP*,²⁴⁶⁻²⁴⁷ resultat de canvis produïts tant a les cèl·lules canceroses com a les estromals de l'hoste.^{45,248-250} Aquests canvis o alteracions, a més, són permanents, ja que quan s'extreuen aquestes cèl·lules estromals que han estat en contacte amb el tumor retenen la capacitat de transformar cèl·lules no tumorigèniques.²¹⁹ Així doncs, es van injectar les cèl·lules *LNCaP* soles i combinades amb un dels clons (el clon 1) a una proporció d'1:3.²²⁷

Quaranta-vuit hores després les cèl·lules del clon 1 ja s'havien agregat formant una petita tumoració. Els tumors van créixer en els animals que portaven la combinació de cèl·lules, mentre que no van donar signes de creixement en els que només portaven *LNCaP*. L'examen histològic d'un tumor a les 4 setmanes va revelar la presència d'un tumor de tipus sarcoma generat per les cèl·lules estromals injectades. No es va detectar cap rastre de les cèl·lules *LNCaP*, ni a nivell histològic ni per PCR es van detectar trànscrips humans. Aquests resultats, afegits al fet que s'havia comprovat que alguns clons patien aneuploidies, concorden amb els publicats per Miura i col·laboradors en què descriuen la transformació maligna de MSC derivades de moll d'os en cultius cel·lulars a causa d'una acumulació d'inestabilitat cromosòmica al llarg del temps, i com aquestes cèl·lules formen fibrosarcomes un cop injectades en ratolins nus²⁵³ —en aquest sentit és interessant remarcar que s'ha descrit la presència d'una *side population* a sarcomes humans i la seva correlació amb el grau d'agressivitat, i potser aquest model involuntari de sarcoma podria ser d'interès per aquest estudi.²⁵⁴ Així doncs, almenys alguns dels clons van patir una transformació que els va convertir, literalment, en cèl·lules mare canceroses, capaces encara de diferenciar-se a diferents llinatges tant *in vitro* com *in vivo* —no van perdre les capacitats de diferenciació i autorenovació—, però també de formar tumors quan eren injectats en animals. En el moment en què es redacta aquesta tesi s'han coinjectat dos clons més novament amb *LNCaP* per comprovar-ne l'efecte. També cal dir que observacions *in vitro* realitzades a partir de cocultius de *LNCaP* amb alguns clons indiquen que es donen comportaments diferents en funció del clon. En alguns, per exemple, s'observa el mateix que *in vivo*, és a dir, que els clons creixen de tal manera que desplacen els cultius de *LNCaP*. Una altra vegada es presenta un exemple clàssic de funcionament d'un ecosistema en un paral·lelisme amb la biologia cel·lular: en un ambient nou, en un ecosistema nou o un nínxol ecològic determinat, quan dues espècies —en aquest cas tipus cel·lulars— entren en competició, la que té més probabilitats d'ocupar aquest nínxol és aquella que tingui una eficàcia biològica major, és a dir aquella que es reproduïx més i millor. En aquest cas s'ha observat com les cèl·lules del clon 1 proliferen molt més ràpid que les *LNCaP*, i acaben desplaçant-les —tant *in vivo* com *in vitro*. En d'altres casos, però, s'observa que el cocultiu s'estableix i es manté, però provoca canvis, com a mínim morfològics, de les *LNCaP* (Figura D3).

Hi ha qui ha dit que aquesta transformació deguda al temps i condicions de cultiu podia ser també responsable d'atorgar aquestes característiques de cèl·lules progenitores a les cèl·lules cultivades — propietats que s'entén que abans no tenien.²⁵⁵ Per tal d'indagar aquesta possibilitat en el sistema emprat en aquesta tesi, tal com s'ha comentat anteriorment es van fer anàlisis del contingut de DNA de diferents clons i es

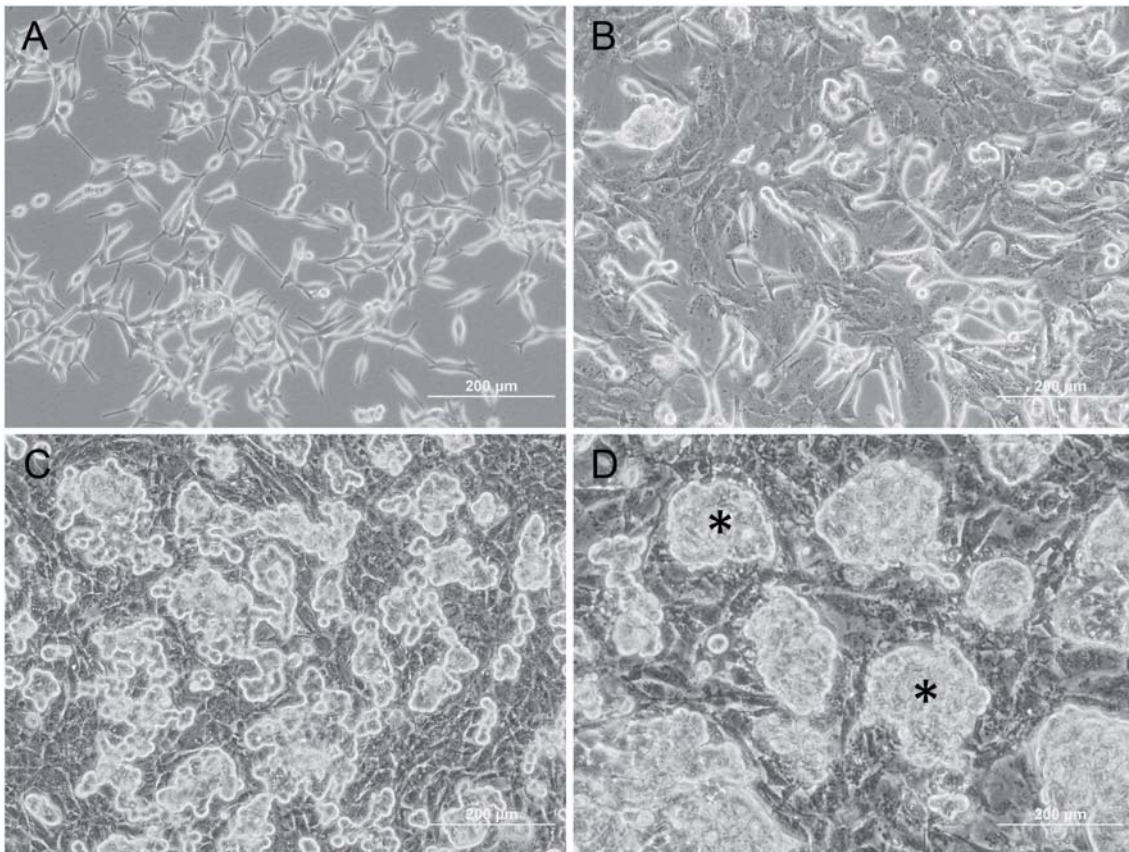


Figura D3: La imatge A mostra un cultiu de *LNCaP* en condicions estàndard. Les imatges B, C i D mostren l'evolució d'un cocultiu de les mateixes *LNCaP* amb un dels clons SP. Observi's el canvi de morfologia i l'agrupament de les cèl·lules *LNCaP* (asteriscs) sobre el tapís del clon al cocultiu al llarg del temps. Escala: 200 µm

va veure que efectivament molts d'ells, però no tots, presentaven aneuploidies. D'una altra banda, però, com que es creu que aquestes característiques de diferenciació són adquirides fruit dels successius passatges de les cèl·lules en cultiu, es va comprovar si hi havia cèl·lules multipotents estromals als cultius inicials del *PAC-120*. Per això es va posar en cultiu un tumor acabat d'extreure i després de 7 dies, un cop s'havien enganxat unes poques colònies, es va començar a induir la diferenciació tant adipogènica com osteogènica. En 10 dies moltes colònies—que a més presentaven morfologies diferents entre elles—havien donat lloc a adipòcits i osteòcits (Figura R28). Aquest experiment demostra que hi ha cèl·lules multipotents estromals normals al *PAC-120*, independentment del fet que els clons obtinguts presentin aneuploidies o no. D'altra banda, però l'atorgament d'aquestes característiques és només una conjectura, ja que el que s'ha descrit és que les cèl·lules multipotents estromals murines muten fàcilment després d'uns quants passatges en cultiu,²⁵³ per la qual hom podria també establir una tautologia com a inferència deductiva partint de les mateixes premisses: 1) les cèl·lules multipotents estromals muten fàcilment en cultiu, 2) tant les cèl·lules multipotents

estromals normals com les mutades tenen capacitat de diferenciació 3) l'anàlisi del contingut de DNA revela que hi ha clons que presenten aneuploidies, i aquests coincideixen amb aquells que tenen capacitat de diferenciar-se i formar tumors *in vivo*, 4) els cultius primaris sense aneuploidies presenten cèl·lules multipotents estromals. Podem concloure, doncs, que aquestes cèl·lules multipotents estromals —una representació de les quals podem afirmar que són els clons— ja eren cèl·lules multipotents estromals abans que mutessin, i que precisament el fet que hagin mutat i es diferenciïn confirma més la naturalesa de cèl·lula multipotent estromal d'aquests clons. Tanmateix, val a dir que com a mínim un dels casos, el clon 12, presentava un contingut de DNA diploide i al mateix temps també una capacitat de diferenciació. Amb això, és obvi que la *side population* estromal obtinguda és heterogènia, i comprèn cèl·lules multipotents estromals i d'altres tipus cel·lulars.

Finalment, aquests resultats quant a la presència de cèl·lules SP multipotents a l'estroma del càncer de pròstata *PAC-120* i totes les característiques descrites fan pensar en les possibilitats de l'ús de l'anomenada teràpia de diferenciació.²⁵⁶ Aquesta teràpia pretén que si el càncer és fruit d'una cèl·lula mare, només cal induir-ne la diferenciació per convertir una massa tumoral en una massa de cèl·lules diferenciades que, o bé no presenten cap perill o bé ja són fàcilment accessibles a la teràpia de destrucció. En aquest sentit, la pèrdua del fenotip SP durant la inducció de la diferenciació observada en aquest treball comportaria la pèrdua també d'aquest sistema de resistència als fàrmacs usats en la quimioteràpia, i recolzen, per tant, les virtuts de la teràpia de diferenciació.

5.1.2 Cèl·lules tumorals disseminades i diàleg entre el moll d'os i el tumor.

En aquesta tesi s'han analitzat per citometria els molls d'ossos de ratolins nusos amb tumor i sense tumor amb l'objectiu de valorar possibles diferències entre els percentatges de la *side population* deguda a la presència del xenotrasplantament. Els resultats demostren que hi ha diferències significatives i que, en conjunt, els animals amb tumor presenten més cèl·lules de la SP que els animals sense tumor. Val a dir que si bé els resultats són estadísticament significatius pel que fa a aquestes variacions percentuals, les diferències intragrupal són elevades. En el cas dels animals amb tumor, és remarcable com en uns pocs d'ells es van trobar percentatges d'SP al voltant del 50% i en d'altres al voltant de l'1% és a dir que hi havia variacions notables pel que fa a aquests percentatges. Aquest fenomen pot ser explicat de diverses maneres. Per una banda, és possible que això sigui fruit del fet que no tots els animals presentessin una resposta igual a la presència del tumor o bé que presentessin una infiltració de cèl·lules

disseminades del tumor diferent. Els estudis sobre la presència de cèl·lules tumorals disseminades a moll d'os en humans han demostrat precisament que no tots els individus estudiats presenten el mateix nombre de cèl·lules al moll d'os i és precisament aquesta la mesura del pronòstic. Quant al *PAC-120*, es tracta d'un tumor l'haploïdia i la genètica del qual han anat canviant, però que tanmateix manté les seves característiques generals inicials.⁴⁹ No es pot afirmar amb seguretat dins de quin grup de tumors cauria, però tenint en compte que hi ha tumors que presenten una signatura de disseminació i d'altres que no,⁸⁶ i sabent que s'ha descrit la presència de trànscrips humans als pulmons del *PAC-120*,⁴⁹ i que el present estudi indica la presència de DNA humà i cèl·lules positives per citoqueratina 8 al seu moll d'os, hom podria inclinar-se a pensar que el *PAC-120* podria tenir una signatura de disseminació, tot i que no s'han trobat proves que permetin afirmar que es tracti d'un tumor metastàtic —conceptes, com s'ha esmentat anteriorment, diferents. D'altra banda, però, podria ser que es tractés d'una qüestió tècnica: el present estudi ha estat realitzat amb animals no consanguinis, la qual cosa pot generar una certa dispersió en els resultats com a conseqüència de la diversitat genètica que presenten entre ells, fet que els pot dur a respondre de manera lleugerament diferent a la presència del tumor, que al seu torn pot dificultar la interpretació de les observacions. Hom no pot obviar aquest concepte, ja que com s'ha comentat anteriorment, no es tracta només de l'efecte del tumor sobre l'hoste sinó també de la resposta de l'hoste vers el tumor.

Les cèl·lules tumorals disseminades són objecte d'estudi des de fa anys atesa llur implicació en la disseminació silenciosa de la malaltia cancerosa. Els estudis en humans indiquen que la presència d'aquestes cèl·lules al moll d'os dels pacients —fins i tot aquells als quals s'ha practicat l'exèresi del tumor— implica la possible recaiguda i l'aparició de metàstasis. En funció d'aquests paràmetres, les anàlisis estadístiques mostren que hi ha una associació entre el fet de tenir aquestes cèl·lules tumorals disseminades i el pronòstic de la malaltia.⁸²⁻⁸⁵

En el model utilitzat per a aquest estudi, en el qual ja s'havia descrit la presència de trànscrips humans als pulmons dels animals, s'ha utilitzat la metodologia de la immunofluorescència per identificar-les. Les immunofluorescències han permès detectar una gran quantitat de cèl·lules positives per la citoqueratina en alguns molls d'ossos d'animals amb tumor —precisament associada a uns percentatges d'SP elevats en aquests mateixos molls d'ossos.

Una altra metodologia utilitzada per a la identificació de cèl·lules humanes al moll d'os dels animals és la PCR amb encebadors específics humans i murins. En aquest cas, els estudis realitzats en la present tesi doctoral —amb encebadors prèviament descrits per diferenciar les espècies—²⁵⁷ demostren que 4 mesos després de l'exèresi del

tumor es pot detectar DNA humà al moll d'os en uns quants d'aquests animals. Malgrat tot, cal dir que l'ús de la PCR de DNA per a la detecció de cèl·lules en unes condicions determinades pot comportar cert grau d'equívoc en les inferències que s'extreguin dels resultats, atès que s'està prenent una part pel tot, és a dir, s'està associant la presència de DNA amb la presència de cèl·lules. En aquest sentit cal remarcar que la presència de DNA lliure en sang o plasma, per exemple, és un fenomen corrent, i que s'estudia el seu ús per al diagnòstic no invasiu de diversos paràmetres, inclòs el càncer.^{258,259} Per tant, el fet de trobar aquest DNA al moll d'os dels animals 4 mesos postexèresi tumoral, no implica necessàriament que hi haguessin cèl·lules humanes, sinó que podria tractar-se senzillament de DNA tumoral que es troba al moll d'os en forma lliure. Tot i aquestes especulacions, si, com podria pensar-se tenint en compte els resultats de les tincions amb citoqueratina 8 i els immunomarcats per citometria, aquest DNA correspon a cèl·lules humanes que es troben al moll d'os dels animals, això voldria dir que aquestes cèl·lules no són circulants, sinó que, com es pensa generalment, aquestes cèl·lules estan fent una nidificació específica al moll d'os,⁸¹ on romanen silents. Per tal com les CTD poden "despertar-se" i donar lloc a una metastasi, podrien ser considerades com a cèl·lules disseminades potencialment metastàsiques. Els estudis que s'han realitzat en aquest treball quant a aquest aspecte no han donat lloc a resultats concloents, atès que la injecció de fraccions de moll d'os d'animals amb tumor en ratolins nusos sense tumor no ha generat tumors en aquests darrers. Això podria ser així per diverses raons: atès que no es va comprovar la presència de DNA o cèl·lules humanes en els molls injectats, d'una banda podria ser que no hi haguessin cèl·lules tumorals en aquests animals —ja que no és un fenomen, com hem vist, que es doni el 100% dels casos; també podria ser una qüestió de temps, però: les cèl·lules dorments són cèl·lules tumorals humanes i hom ha descrit que llurs estats de latència poden durar anys.⁸⁴ L'esperança de vida dels ratolins nusos no arriba als 2 anys, amb què podria ben ser que aquestes cèl·lules no haguessin tingut temps per "despertar-se". Així mateix, aquest fet caldria associar-lo amb el dels estímuls, és a dir, encara no se sap quan ni per què aquestes cèl·lules dorments es desperten, però sembla que podria ser necessari algun tipus d'estímul ambiental o una condició fisiològica o patològica determinada. Per tant podria ser que les cèl·lules injectades no haguessin donat lloc a cap tumor perquè no han rebut l'estímul adequat —de fet, sembla possible tenint en compte les condicions en què viuen aquests ratolins.

També amb l'objectiu de valorar la presència de cèl·lules humanes al moll d'os dels animals amb percentatges d'SP elevats es van realitzar diverses anàlisis de fenotipació per immunomarcatge per citometria de flux sobre la susdita població SP. De tots els marcadors utilitzats, només uns pocs van poder discriminar poblacions d'una manera més o menys clara, entre els quals un anticòs pancitoqueratina. Aquesta poca

resolució a l'hora de discriminar aquestes cèl·lules podria ser donada per diversos factors, entre els quals una baixa —o nul·la— concentració antigènica dels marcadors emprats a la superfície d'aquestes cèl·lules SP tumorals o, senzillament, l'absència d'aquestes cèl·lules —i per tant la confirmació que no es tracta de la presència de cèl·lules tumorals disseminades sinó de cèl·lules de l'hoste. De totes maneres, els resultats obtinguts semblen indicar que almenys una part d'aquestes cèl·lules SP del moll d'os dels animals amb tumor són d'origen tumoral humà.

Malgrat la poca definició quant a aquesta fenotipació múltiple, l'anàlisi de la població no hematopoètica al moll d'os dels animals va revelar que, tot i que no sembla que hi hagin diferències quant al percentatge de cèl·lules Cd45 negatives als molls d'os dels animals amb tumor respecte dels controls, sí que és cert que s'observa una diferència notable en el percentatge d'aquestes cèl·lules Cd45 negatives que formen part de la SP. És a dir, el percentatge de cèl·lules de la SP que són Cd45 negatives és més elevat als molls dels animals amb tumor que als controls ($44,18\% \pm 5,27\%$ de mitjana als animals amb tumor contra $29,43\% \pm 3,81\%$ de mitjana als controls). Una de les hipòtesis alternatives amb què es va treballar és que aquest fet podia ser degut a un augment d'eritroblasts —també presenten el fenotip SP— possiblement com a resposta a la demanda d'irrigació del tumor. Tanmateix, els marcatges amb l'anticòs Ter-119 —molècula específica d'eritroblasts— no van dirimir completament la qüestió, ja que si bé és cert que les poques mostres analitzades ($n=2$) indicaven un augment de la població Ter119 als molls d'os dels animals amb tumor, l'anàlisi de les dades no va permetre situar unes regions poblacionals clares que permetessin extreure'n unes inferències segures. Tot i així, no pot excloure's que aquesta hipòtesi fos certa i per tant aquest augment de la SP sigui degut a un augment del nombre d'eritroblasts. Tampoc no es pot excloure, però, la hipòtesi principal amb què es treballava, que era la possibilitat que aquest augment fos degut a cèl·lules tumorals disseminades al moll d'os.

Certament, la conjectura al voltant de la qual ha girat aquesta part de l'estudi ha estat que les CTD presenten característiques de CMC com ara el fenotip SP. La relació entre les CTD i les CMC no està clarament establerta, però conceptualment sembla una associació inevitable. Per una banda, les CTD presenten períodes de vida —estiguin en estat de latència o no— molt llargs, propietat característica de les cèl·lules mare. D'altra banda, les CTD són cèl·lules que poden acabar donant lloc a tumors, és a dir, que presenten un potencial tumorigènic elevat —una de les característiques que s'atribueix a les CMC i que equival al potencial d'autorenovació i diferenciació de les cèl·lules mare normals. Per bé que aquesta capacitat de generar nous tumors sigui potencial, hi és, ja que les teràpies actuals no afecten aquestes cèl·lules,⁸⁰ i sembla que la generació dels tumors depèn de diversos factors, entre els quals, factors ambientals i fisiològics. També és cert que aquestes cèl·lules han de tenir una capacitat notable

d'adaptació als diferents ambients pels quals transiten i als quals acaben nidificant. En aquest aspecte, hom considera el moll d'os com un lloc molt favorable on nidificar,⁸¹ ja que es tracta d'un ambient protegit, un "santuari" dins el cos humà al qual és difícil arribar amb tractaments quimioterapèutics.⁸⁰ Modestament, hom pot considerar establir certs paral·lelismes entre els processos evolutius que afecten els individus, i l'ecologia d'aquestes cèl·lules. L'adaptació darwiniana a noves condicions ambientals implica sens dubte canvis en els individus per tal de poder sobreviure.²⁶⁰ Evidentment, la supervivència, per si sola, no és útil —almenys en termes evolutius. L'èxit adaptatiu passa per un reeiximent reproductiu. En el cas d'aquestes cèl·lules, hom podria inclinar-se a pensar que, o bé el procés d'adaptació és llarg —poden estar anys en latència— o bé la qüestió passa per esperar les condicions més idònies per a la reproducció —crec que, salvant les diferències d'ambdós processos, en el context cel·lular hom podria assimilar el concepte de reproducció amb el de divisió. Un dels canvis amb què es troben aquestes cèl·lules és amb les pressions parcials d'oxigen, que poden variar molt del tumor a la sang i de la sang al moll d'os. Els canvis d'aquesta pressió entre els llocs de trànsit i estacionament d'aquestes cèl·lules semblen més que probables atès que aquesta és diferent en cada un dels indrets. Mentre que el tumor pot estar o no en un ambient més o menys hipòxic, i això es relaciona amb un millor o pitjor pronòstic,²⁶¹ el moll d'os, que com s'ha comentat anteriorment és un lloc de nidificació d'aquestes cèl·lules, presenta uns nivells d'O₂ més aviat hipòxics (1%2% O₂).²⁶² En aquest sentit el moll d'os pot ser un nínxol molt adequat per aquestes cèl·lules perquè les reduïdes concentracions d'O₂ podrien comportar menys dany degut a estrès oxidatiu. Una de les adaptacions, doncs, que aquestes cèl·lules poden patir és l'activació del factor induïble per hipòxia (HIF) que pot dur a l'activació transcripcional i l'expressió de l'*ABCG2*,²⁶³ el principal transportador responsable del fenotip SP.^{180,184} L'expressió de l'*ABCG2* permet la supervivència d'aquestes cèl·lules en ambients hipòxics o situacions de reducció de la pressió parcial d'oxigen.²⁶⁴ Així doncs, aquestes cèl·lules adquiririen un fenotip amb característiques de cèl·lula mare, ja que la hipòxia també regula *Notch*, *Wnt* i *Oct4*, entre altres gens relacionats amb cèl·lules mare.²⁶⁵ Inevitablement aquesta consideració comporta la pregunta de si l'expressió i activitat de l'*ABCG2* en aquestes cèl·lules ja es produeix al tumor o bé és una característica adquirida com a adaptació a unes pressions selectives determinades. I, de fet, per extensió, hom pot discutir si aquest fenotip progenitor a les cèl·lules canceroses és adquirit pel susdit procés o ja es troba a aquestes cèl·lules abans d'aquest. Aquesta és una qüestió encara discutida, i hi ha proves que indiquen que aquestes cèl·lules mare canceroses són cèl·lules mare que han patit una transformació oncogènica,²⁶⁶ i proves que apunten cap al fet que cèl·lules diferenciades podrien adquirir les propietats de cèl·lules mare a través de mutacions o d'activacions gèniques alterades²⁶⁷ —aquestes dues visions es tractaran amb més detall més endavant.

Certament, hi ha indicis que assenyalen clarament que les adaptacions es produeixen, i que aquestes adaptacions confereixen unes propietats a les cèl·lules que les acosten a fenotips progenitors. Per exemple, i seguint amb el cas de les pressions d'oxigen, la hipòxia comporta la inducció, no només de l'expressió d'*ABCG2*,²⁶³ sinó també del transportador *MDR1* i de l'activitat telomerasa a través d'*hTERT*.^{268,269} Cal remarcar que aquests efectes mitjançats per les pressions d'O₂ sobre diversos tipus de cèl·lules mare s'han evidenciat en diversos treballs amb cultius cel·lulars, en què els cultius en hipòxia han posat de relleu la potenciació de característiques de cèl·lules progenitores com l'augment de l'habilitat de les cèl·lules mare hematopoètiques per nidificar i repoblar el sistema hematopoètic en ratolins immunodeficients,²⁷⁰ l'augment de la proliferació i la diferenciació cel·lular a llinatges específics en cèl·lules mare neuronals o de la cresta neural cultivades sota condicions d'hipòxia,^{271,272} la diferenciació de les cèl·lules del citotrofolblast de placenta directament influenciada per la hipòxia,²⁷³ i l'adquisició d'un fenotip més immadur en línies cel·lulars de neuroblastoma i mama també en condicions d'hipòxia.²⁷⁴ També durant la realització d'aquest treball s'ha observat que les condicions d'hipòxia feien augmentar la població *SP* de la línia *LNCaP* (Figura D4). De fet, l'adquisició d'algunes característiques pròpies de les cèl·lules mare com l'autorenovació i la multipotència s'ha advertit en cèl·lules diferenciades a les quals s'han practicat unes poques alteracions genètiques.²⁷⁵⁻²⁷⁷

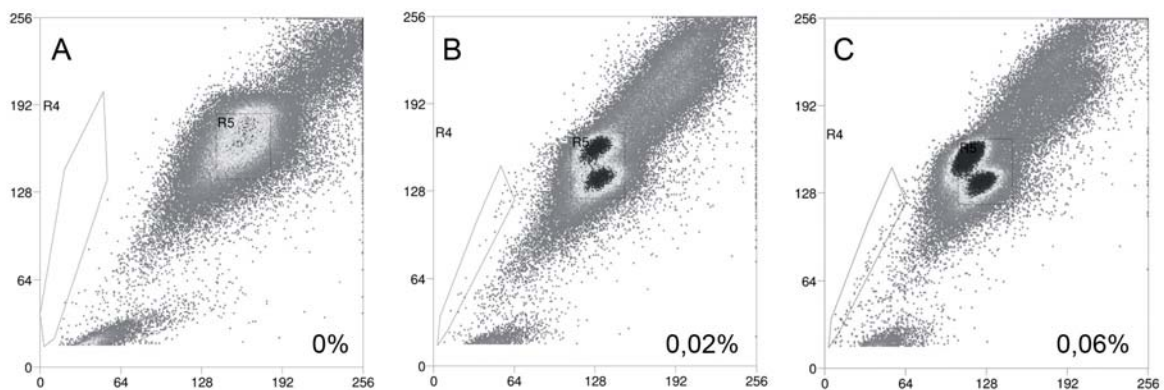


Figura D4: Evolució de la *side population* línia *LNCaP* sota condicions diferents condicions d'oxigen. Al citograma A s'hi mostra les cèl·lules en condicions d'hiperòxia (incubador corrent, amb 95% d'aire, del qual un 21% és O₂); al citograma B s'hi mostra el perfil SP de les mateixes cèl·lules després de 48h en hipòxia (2% O₂). Al citograma C, les mateixes cèl·lules al segon passatge.

Altrament, s'ha descrit que la localització del tumor en xenotrasplantaments pot ser crucial pel fenomen metastàtic. Així, es diu que la localització ortotòpica dels tumors afavoreix la metastasi mentre que els models amb localitzacions ectòpiques no en presenten.²⁷⁸ Val la pena aturar-se a discutir aquest punt. Els models animals d'una malaltia es generen per tal que aquests siguin el més fidels possible a la malaltia humana

per tal d'estudiar-ne la seva aparició, desenvolupament i progressió i els possibles procediments terapèutics a seguir per a la seva curació, pal·liament dels símptomes o millora. Òbviament, no sempre aquest objectiu és assolible a la pràctica. De fet, els models animals disten de ser perfectes, atès que partim de la base que els sistemes biològics no es comporten de la mateixa manera i les respostes poden variar enormement depenent de diversos paràmetres, entre els quals l'ambient. Així doncs, malgrat el que digui la genètica —llegeixi's allò de *ratolins i humans tenen un 90% d'homologia genètica*— les diferències entre un ratolí i un humà continuen essent perfectament apreciables a simple vista. Quant a la generació de models tumorals prostàtics en ratolins, la qüestió presenta unes quantes complicacions metodològiques, anatòmiques i conceptuals. En primer lloc, la pròstata humana i la murina difereixen en força de mesura pel que fa a llur anatomia. Mentre que la humana és una glàndula de mida una mica superior a una nou i que no presenta lobulacions, la murina fa uns pocs mil·límetres i presenta tres lòbuls —ventral, dorsal i lateral— amb funcions diferents. Això fa que aquesta darrera sigui difícil de manipular. Però més enllà de les complicacions tècniques cal pensar que la cèl·lula tumoral humana i el seu ambient a la pròstata humana dista molt de l'ambient de la pròstata murina. Per això el concepte "ortotòpic" en el cas del xenotrasplantament de fragments de pròstata tumoral humana a ratolins, cal prendre-se'l amb cura, atès que tot i que els fragments es col·loquin a la pròstata murina o a localitzacions properes a aquesta, el nou ambient difereix molt de l'ambient humà. Tant és així que tumors que en humans són hormonoindependents, un cop col·locats en ratolins esdevenen hormonodependents —però no sabem si s'esdevindria el mateix en humans. Per això cal en certa manera relativitzar aquest concepte. Nogensmenys, aquestes observacions susciten com a mínim un parell de qüestions: en primer lloc, si la situació ortotòpica del tumor és responsable que les cèl·lules tumorals metastatitzin, això equival a dir que l'ambient del tumor juga un paper poc menys que crucial en la generació de metastasis. Certament, moltes dades actuals indiquen que el nínxol de la cèl·lula tumoral —i de la cèl·lula mare— té un rol principal en l'activitat d'aquesta.²⁷⁹ I també s'ha observat com les cèl·lules multipotents estromals faciliten el creixement d'alguns tumors.²²⁶ També els resultats exposats en aquest treball suggereixen això. Però, és clar, aquesta afirmació implica que el paper de la cèl·lula tumoral, *per se*, en el procés metastàtic perdi protagonisme. Això podria semblar que contradiu els estudis que remarquen que hi ha tumors que presenten una signatura gènica de metastasi i n'hi ha que no.^{57,58} Tanmateix aquests estudis han estat fets amb tumors sencers, i no pot descartar-se una important contribució de l'estroma en els resultats d'aquests *microarrays*. I, en tot cas, si bé és cert que hom ha demostrat que la iniciació i progressió del càncer poden modelar-se mitjançant la generació per enginyeria de lesions específiques dirigides a la presumpta cèl·lula originària del càncer,

²⁸⁰ tots aquests resultats subratllen el paper de l'estroma i el microambient en el desenvolupament de la malaltia cancerosa.

En aquest estudi s'ha practicat la implantació del tumor *PAC-120* a tres localitzacions diferents —subcutània ventral, dorsal i periprostàtica— per veure si aquest fet afavoria l'augment de cèl·lules SP al moll d'os dels animals —probablement degut a una disseminació de cèl·lules tumorals o a una metàstasi òssia. Les observacions fetes en aquest sentit no han permès confirmar aquesta hipòtesi. A més, s'ha observat que la localització subcutània dorsal creix més ràpid que les altres —probablement perquè sota el teixit adipós on es col·loca el fragment tumoral aquest hi té facilitada la irrigació. Això, però, no deixa de ser un altre indicatiu de la importància del microambient en el creixement i desenvolupament del tumor.

També és interessant remarcar que els ratolins sense tumor, amb una mitjana percentual d'SP al moll d'os de $2,31 \pm 1,89$, presenten un percentatge d'SP molt més elevat que el descrit per animals no nusos.¹⁵⁸ Aquest fet podria ser degut a la presència de cèl·lules progenitores alternatives com ara les cèl·lules NK —ja que els animals *swiss nude*, tot i presentar nivells molt baixos de cèl·lules T, sí que presenten cèl·lules NK. Perseguint la confirmació o refutament d'aquesta hipòtesi es va fer ús d'un marcador de cèl·lules NK, l'NK1.1 als molls dels animals, però aquest marcatge no va ajudar a resoldre aquest punt, ja que no s'obtingué marcatge amb aquest anticòs al moll d'os dels animals —d'altra banda perquè és possible que els progenitors d'NK possiblement no expressin aquesta molècula.

Sigui com sigui, el que sí que resulta obvi a partir dels resultats obtinguts en aquesta tesi i de molts altres treballs és que durant la progressió tumoral s'estableix un diàleg entre el moll d'os i el tumor que juga un paper molt rellevant en el desenvolupament i progressió tumorsals, i sembla que diferents poblacions SP hi podrien estar involucrades.

5.2 Sobre l'origen de les cèl·lules mare canceroses: adaptació contra selecció.

Les hipòtesis sobre l'origen de les cèl·lules mare canceroses —que es debaten entre la selecció de cèl·lules mare transformades i l'adaptació de cèl·lules diferenciades— no són necessàriament contradictòries. De fet, és probable que siguin certes totes dues: com s'ha vist, les adaptacions s'esdevenen i l'adquisició d'un fenotip progenitor —o algunes característiques del fenotip— és un fet, i en aquest treball se n'han brindat més proves. Però la transformació de les cèl·lules mare i per tant l'obtenció de cèl·lules mare canceroses també es produeix, i també en aquest treball se n'han obtingut proves, com la transformació de les MSC dels clons i la generació de sarcomes un cop injectades en animals. Per tant, hom s'inclina a pensar que els processos que hem anomenat *adaptatius* en cèl·lules diferenciades sota unes condicions ambientals determinades o unes pressions selectives concretes poden tendir a conferir-los aquests fenotips progenitors, però que això no exclou el fet que determinades cèl·lules mare puguin patir mutacions que acabin transformant-les, fenomen facilitat per les pròpies característiques d'aquestes cèl·lules. De totes maneres, en aquest darrer cas, probablement també l'ambient jugui un paper crucial en el procés de transformació. D'aquesta suposada controvèrsia n'és un exemple l'hormonoresistència del càncer de pròstata, el desenvolupament de la qual encara segueix essent discutit. La transició de l'hormonodependència a l'hormonoresistència és un procés extensament debatut. En termes generals s'especula sobre dues possibilitats: la selecció i l'adaptació. En el primer dels casos, l'ús de la teràpia antiandrogènica suprimiria totes aquelles cèl·lules que són dependents d'andrògens per sobreviure, però podria deixar un subgrup de cèl·lules que en són independents *ab origine* i que per tant més tard podrien regenerar el tumor.²¹ Això equivaldria a dir que hi ha unes cèl·lules mare canceroses des de l'inici, responsables del tumor, i que aquestes són independents d'andrògens per créixer —tot i que com s'ha comentat a la introducció, encara hi ha un cert debat sobre si són independents d'andrògens o no, la qual cosa canviaria substancialment la hipòtesi, i val a dir que aquestes controvèrsies, sovint semblen degudes a diferències metodològiques i conceptuals, com es comentarà més endavant. En el segon dels casos, aquesta transició seria fruit d'una adaptació de les cèl·lules a un tractament continuat de retirada androgènica, és a dir, com s'esdevé en els canvis sobtats en macrosistemes ecològics —considerin-se grans cataclismes, glaciacions, etc—, la gran majoria de cèl·lules morien a causa del tractament però unes poques podrien sobreviure i adaptar-se a les noves condicions. En el present treball s'han realitzat estudis tant en línies cel·lulars com en models animals. Diverses dades obtingudes durant la realització d'aquesta tesi

permeten establir les següents afirmacions: 1) els cultius de *LNCaP* en absència d'andrògens no es veuen afectats per una gran mortalitat, sinó que s'observa una transició neuroendocrina —que finalment desemboca en una hormonoindependència— i una aturada de la proliferació; 2) el *PAC-120*, quan és trasplantat en femelles o mascles castrats, no creix, però les cèl·lules hi semblen sobreviure; 3) quan el ratolí portador del *PAC-120* és castrat, el tumor perd volum, però no desapareix. Aquestes dades fan pensar que és probable que, si més no en alguns casos, es produeixi una adaptació de les cèl·lules als efectes del tractament, més que no pas que hi hagi un subgrup de cèl·lules mare canceroses des de l'inici, és a dir, dona suport a la hipòtesi adaptativa. Així doncs, el tractament de reducció d'andrògens comportaria l'adquisició de fenotips progenitors per part d'algunes cèl·lules, cosa que els permetria sobreviure i en darrer terme dividir-se novament en les noves condicions. Això no obstant, algunes d'aquestes dades poden ser interpretades de manera dual, ja que la pressió selectiva pot exercir-se sobre totes aquelles cèl·lules que no estan *prèviament* adaptades, és a dir que les cèl·lules que sobreviuen, ho fan perquè ja tenen les característiques que els ho permeten *ab origine*. Així, el fet que el *PAC-120* trasplantat en femelles o mascles castrats no creixi o el fet que el tumor recreixi després de la seva exèresi fan pensar que hi podrien haver unes quantes cèl·lules amb característiques de cèl·lula mare cancerosa al tumor abans del tractament. Una prova a favor de la hipòtesi adaptativa és el tractament de supressió androgènica intermitent que s'ha dut a terme, que tot i que encara presenten una certa controvèrsia, sembla que retarda el desenvolupament de la hormonoindependència.²⁸¹ Les investigacions prèvies que van dur a passar aquest tipus de teràpia a fase clínica apuntaven al fet que la teràpia de supressió androgènica intermitent manté el potencial apoptòtic de les cèl·lules i retarda la progressió tumoral,²⁸² i de fet s'ha parlat de l'efecte d'aquest tractament cíclic sobre la composició de les cèl·lules mare canceroses hormonoindependents.^{283,284} Seguint el fil argumental que s'ha descabdellat en aquesta discussió, sembla probable que aquest retard es doni, doncs, perquè no es deixa que es produeixi l'adaptació de les cèl·lules al nou ambient bàsicament perquè aquest s'està canviant constantment. Ara bé, ¿llavors per què s'observa una pèrdua d'*ABCG2* i el fenotip SP a les *LNCaP* quan es retiren els andrògens del medi si considerem aquest fenotip com a característic de cèl·lules progenitores? —suposem ara que el que passa a les *LNCaP* és un reflex més o menys fidel del que pot passar al càncer de pròstata, ¿És una contradicció? No necessàriament. Se sap que *ABCG2* transporta andrògens.²⁸⁵ I en aquest treball s'ha demostrat que l'augment del sèrum i l'estradiol regulen a l'alça els nivells transcripcionals d'*ABCG2* a les *LNCaP*—i el sèrum n'augmenta la SP. Això vol dir que el paper de l'*ABCG2* a la pròstata està lligat a les hormones i que per tant pot no ser un marcador exclusiu de cèl·lules mare a la pròstata, ja que també és regulat per hormones, una possibilitat que s'haurà de valorar amb estudis rigorosos sobre la

població SP i la no SP de la pròstata i determinar clarament el paper de les cèl·lules mare canceroses prostàtiques, el seu origen i la seva relació amb el receptor d'andrògens.

Els resultats obtinguts en les línies cel·lulars, però, no deixen de ser intrigants. En el supòsit que les cèl·lules mare de la pròstata siguin AR negatives i hormonoindependents —associació, aquesta, potser poc precisa però que no es discutirà aquí— ¿de què serviria tenir un transportador que bombeja andrògens? D'una banda podria ser que això les protegís contra uns nivells massa elevats d'andrògens, que hom ha descrit que són carcinogènics,³¹ però també que n'evitessin la diferenciació, ja que els andrògens la indueixen. En aquest cas, sí que aquesta característica els proporcionaria un avantatge. Però llavors, ¿com esdevindrien tumorals? Tot i que aquestes cèl·lules estarien protegides contra efectes hormonals, també és cert que els efectes hormonals podrien ser independents d'AR o bé a través del receptor d'estrògens. Però, ¿i a les cèl·lules mare canceroses? Quant a hormones, el fet de tenir el transportador no sembla tenir sentit, sinó és que el bombeig continuat d'andrògens fa que aquestes cèl·lules esdevinguin hormonoindependents. ¿O és al contrari, i és precisament perquè tenen el transportador, que esdevenen hormonoindependents a força d'extreure hormones? En tot cas, havent observat que la retirada d'andrògens provoca la pèrdua de l'expressió d'*ABCG2* i el fenotip SP, hom podria pensar que el tractament antihormonal faria que aquestes cèl·lules perdessin un sistema de defensa valuós. Aquestes possibilitats encara s'han d'explorar amb detall, però sí que s'ha vist que una mostra de càncer de pròstata hormonoindependent presenta nivells alts de la proteïna *ABCG2* per immunohistoquímica.²⁸⁵ Això recolzaria la hipòtesi que el subgrup de cèl·lules progenitores canceroses s'expandeix amb la transició a l'hormonoindependència. Tanmateix, aquests resultats s'han de prendre amb prudència. D'una banda, només es tracta d'una sola mostra, que podria no ser representativa del que passa habitualment. De l'altra, el fet que hi hagi proteïna no vol dir que el transportador sigui actiu, tal i com s'ha vist en el present treball de tesi, ja que *LNcaP* i *PC-3*, tot i presentar mRNA i proteïna, presenten percentatges baixos o nuls de *side population* —a banda que hi podrien haver altres transportadors implicats. També en aquesta tesi es va plantejar si els nivells d'andrògens podien afectar l'*ABCG2*, però utilitzant una aproximació diferent: pensant que les hormones poden afectar l'estat de metilació d'alguns gens, es va fer un estudi de l'estat de metilació de l'*ABCG2* després de la castració i restitució hormonals del *PAC-120*, el resultat del qual podria donar informació sobre l'expressió del transportador. Els resultats van demostrar que l'estat de metilació del promotor de l'*ABCG2* en aquests animals era molt semblant al dels animals no castrats. Val a dir que aquesta anàlisi es va fer amb tumors d'animals als quals s'havia aplicat una restitució hormonal i el tumor havia recrescut. Si és cert que en practicar la teràpia hormonal moren totes les cèl·lules del tumor menys les resistents —sigui per selecció o per

adaptació— i si aquestes cèl·lules presenten un ABCG2 funcional, llavors hom esperaria que al moment de màxima eficàcia del tractament, és a dir, al moment de màxima reducció del tumor, les probabilitats d'obtenir clons de DNA amb el promotor d'*ABCG2* desmetilat fossin més elevades, possibilitat que caldrà investigar en un futur. Probablement, d'aquests plantejaments hipotètics sobre l'expansió de les cèl·lules canceroses hormonoindependents tampoc no sigui inferible que totes les cèl·lules hormonoindependents formin part d'una *side population*. I de fet, aquí s'ha demostrat que *PC-3*, línia hormonoindependent, presenta uns percentatges d'SP molt baixos (0,01%)— malgrat totes les precaucions amb què cal parlar dels resultats obtinguts d'una línia cel·lular. Llavors seria més fàcil pensar que l'expansió cel·lular durant l'hormonoindependència no genera cèl·lules iguals que la progenitora —o progenitores— sinó que també comporta una certa "diferenciació". És a dir, l'expansió de les cèl·lules hormonoinsistentes dona lloc a cèl·lules també hormonoinsistentes però que difereixen en altres característiques a la cèl·lula de la qual procedeixen. Al *PAC-120*, després de la castració —i novament en retornar els nivells normals d'andrògens endògens— els nivells d'mRNA d'*ABCG2* no varien massa, fet que està d'acord amb els resultats obtinguts dels estudis de metilació. En canvi, els nivells d'mRNA d'*Abcg2* muri sí que experimenten un augment. Aquest augment probablement sigui degut al fet que en tornar a créixer el tumor torna a haver-hi una formació d'estroma important, estroma que expressa l'*Abcg2*.

L'estat d'hormonoinsistència és un dels factors més crítics del càncer de pròstata, atès que el tumor deixa de respondre a la teràpia antiandrogènica. Tanmateix, hi ha proves que aquest estat no és irreversible —com a mínim en models animals. La generació de xenotrasplantaments mitjançant la implantació en ratolins d'un tumor que en el pacient és hormonoindependent ha donat lloc en alguns casos —com el del *PAC-120*— al creixement de tumors hormonodependents. Sembla coherent pensar que aquest creixement és degut al canvi d'ambient del tumor. Se sap, doncs, que la teràpia antiandrogènica està exercint una pressió selectiva sobre el tumor mitjançant la modificació de l'ambient. Ara caldrà aprofundir en els mecanismes que regulen aquest procés per tal de comprendre'l millor i poder assajar noves teràpies.

5.3 Sobre la inducció

Sobre la caracterització de les cèl·lules mare canceroses, és interessant de veure com l'aproximació a llur identificació i aïllament de diferents grups porta a resultats divergents.¹⁷³ En alguns casos, hom podria argumentar que s'estan obviant certes possibilitats en les conjectures formulades, com per exemple en el cas de la presència o no d'AR a les cèl·lules mare prostàtiques o en l'evolució del càncer de pròstata, en què caldria considerar l'existència de proteïnes alternatives aparegudes a freqüència de la generació de transcrits alternatius del gen —fenomen també estudiat al grup on s'ha realitzat aquest treball. En molts casos, però, l'aparent contradicció té una explicació conceptual senzilla: cada grup fa ús d'una metodologia diferent d'aïllament de cèl·lules mare canceroses, basada en la fenotipació parcial d'aquestes cèl·lules amb marcadors de membrana. Tanmateix, aquest enfocament sovint condueix a un direccionament *a priori* cap a un subgrup de cèl·lules basat simplement en l'expressió d'uns gens concrets, cosa que dóna poca informació sobre el fet que aquestes cèl·lules siguin progenitores o no. En part, s'entén que aquest quòdlibet s'encari així si es té en compte la laxitud amb què hom ha definit el concepte de cèl·lula mare cancerosa. Llavors, adesiara hom troba que s'adequa el resultat d'observacions alienes no concloents a la pròpia hipòtesi i metodologia. En certa manera es tracta de la generació d'una hipòtesi sobre una altra hipòtesi, cosa que facilita la pèrdua d'informació i la confusió quant als resultats. Quan, per exemple, es fa ús de marcatges de molècules de membrana —*CD44*, integrina $\alpha_2\beta_1$, o molècules de citoesquelet com les citoqueratines— per identificar una població cel·lular que tingui més capacitat tumorigènica, cosa que hom estableix com un dels conceptes clau a l'hora de definir cèl·lules mare canceroses. Per arribar a esclarir aquesta qüestió, doncs, en molts casos s'utilitzen uns marcadors que prèviament han estat descrits com a possibles candidats a identificar cèl·lules mare —però que ningú no ha demostrat clarament que ho siguin, sinó que s'han proposat com a tals, cosa ben diferent, i que per això és la principal raó de ser del treball. Per tant, hom parteix de la premissa que l'ús d'aquests marcadors —alguns dels quals, a més, són expressats per altres tipus cel·lulars— permetrà aïllar un subgrup de cèl·lules amb més potencial tumorigènic. Però és evident que en aquest cas la connexió entre la premissa i la conclusió només permet suposar, en el millor dels casos, que, si la primera és vertadera, aleshores és probable que la conclusió també ho sigui. El plantejament inductiu, defensat com a eina de progrés científic, presenta alguns problemes conceptuals,²⁸⁶ i si bé és cert que ha conduït a grans descobriments, també genera grans confusions. Quant a l'expressió gènica, sabem que es tracta d'un fenomen espaciotemporal. És a dir, no depèn exactament o exclusivament del tipus de cèl·lula, sinó del lloc on es trobi

—novament l'ambient— i del moment en què s'hi trobi. Alguns d'aquests marcadors putatius de cèl·lules mare, doncs, podrien ser expressats per altres tipus cel·lulars en unes condicions determinades, i de fet, com s'ha comentat anteriorment, cèl·lules diferenciades podrien adquirir-los en circumstàncies concretes i s'ha aconseguit reprogramar cèl·lules somàtiques per tal que esdevinguin cèl·lules mare pluripotents o embrionàries mitjançant modificacions genètiques com l'expressió ectòpica o la inducció de tres factors.²⁷⁵⁻²⁷⁷ Per tant, l'establiment de jerarquies cel·lulars en funció de l'expressió d'uns pocs gens no sembla, *a priori*, un plantejament massa atractiu per a la identificació de cèl·lules progenitores. En el cas del present treball, s'ha utilitzat la metodologia de la *side population* per aïllar cèl·lules mare. Des que Margaret Goodell va descriure que aquest assaig permet l'aïllament de cèl·lules mare hematopoètiques al moll d'os,¹⁵⁸ diversos grups han posat a prova l'assaig als seus laboratoris. S'ha comprovat que l'assaig és experimentalment robust i discrimina poblacions enriquides de cèl·lules mare, però que les condicions experimentals són molt rellevants a l'hora d'establir bé la SP,^{187,189} i que no en tots els casos permet identificar cèl·lules mare.²⁸⁸ És important subratllar que l'assaig discrimina poblacions *enriquides* en cèl·lules mare, ja que no tota la SP comprèn cèl·lules mare, fet d'altra banda lògic si es considera la relativa arbitriietat amb què s'estableixen els *gatings* en els experiments de citometria de flux. Sobre aquest punt concret val la pena remarcar que un estudi realitzat per la *Sociedad Ibérica de Citometría* va arribar a la conclusió, que, partint d'un mateix arxiu de dades crues sobre una adquisició de *side population*, els diferents grups participants van generar una diferència d'interpretació de les dades del 80% (informes no disponibles). Això posa de relleu el fet que cal mantenir uns criteris experimentals acurats quan es treballa amb l'assaig de la *side population*. I de fet, aquest criteri es pot fer extensiu a tota manera de treballar en ciència, i en el particular que ens ocupa, a aquelles tècniques i metodologies usades per a l'experimentació amb cèl·lules mare; altrament es corre el risc de generar resultats que rarament es poden reproduir. Evidentment hom podria argumentar que la SP, com també s'ha vist en aquest treball, també pot variar en funció de condicions experimentals i ambientals i que per tant no està exempta de l'anterior crítica. Certament és així, tot i que presenta una sèrie d'avantatges: en primer lloc, la SP és considerada una població enriquida en cèl·lules mare, la qual cosa no vol dir que totes les cèl·lules de la població ho siguin —i en alguns casos, cap. En segon lloc, la característica del fenotip SP és la seva capacitat d'extreure drogues, fet que confereix un avantatge clar a aquestes cèl·lules quant a supervivència —sigui per eliminar drogues, xenobiòtics o en ambients hipòxics. I en tercer lloc, i relacionat amb el segon, es tracta d'un assaig que dona una informació funcional d'aquestes cèl·lules. De totes maneres, cal considerar que per si sola, la integració a una *side population* no és un tret identificador definitiu de cèl·lules mare, ni tan sols de poblacions enriquides en cèl·lules mare, sinó

que cal valorar altres paràmetres conjuntament, i, sobretot, analitzar les característiques pilar sobre les quals se sustenta el concepte de cèl·lula mare —és a dir el poder d'autorenovació i diferenciació.

5.4 Estudi de la *side population* i la seva regulació a les línies cel·lulars LNCaP i PC-3

Així com es plantejava estudiar la possible presència de cèl·lules mare canceroses al model *PAC-120*, també es va plantejar de fer l'anàlisi en les línies cel·lulars de càncer de pròstata *LNCaP* i *PC-3*. Un estudi del 2004 havia apuntat la presència d'una *side population* amb característiques de cèl·lules mare canceroses en diferents línies cel·lulars.²⁰⁵ És necessari recordar que els cultius de línies cel·lulars són models experimentals que poden ajudar a estudiar determinats fenòmens o processos cel·lulars, però que no per això deixen de ser sistemes artificials —i a voltes artificiosos. Per això cal ser cautelós a l'hora de valorar i interpretar els resultats obtinguts només a partir d'experiments realitzats amb línies cel·lulars. En aquest sentit és especialment remarcable el cas de les línies de càncer de pròstata, que de fet, no són de càncer de pròstata sinó procedents de metàstasis de càncer de pròstata. Aquest darrer apunt és important, per tal com és sabut que les cèl·lules d'una metàstasi i les del tumor primari no es comporten de la mateixa manera ni són iguals. Per exemple, un estudi sobre l'estat de metilació del promotor d'*ERβ* va concloure que així com el tumor primari de pròstata tendeix a la metilació del promotor, les metàstasis tendeixen a la seva desmetilació, fenomen que pot tenir implicacions rellevants en el comportament de les cèl·lules en un lloc o en un altre.²⁸⁹

En tot cas, aquestes dues línies, *LNCaP* i *PC-3*, s'han utilitzat en aquesta tesi des del 2004 per valorar-hi la presència d'una *side population* i unes cèl·lules mare canceroses putatives. En el cas de la línia *PC-3* s'ha trobat una SP del 0,01 %, mentre que en el cas de la línia *LNCaP* aquesta població ha fluctuat segons els assajos entre indetectable i el 14%. Ja s'ha comentat anteriorment que la població SP depèn de diversos factors tant metodològics com intrínsecs a les pròpies cèl·lules estudiades. Així com no s'han observat variacions notables a la línia *PC-3* quant a la població SP que presenta —pràcticament sempre ha estat del 0,01%— les variacions amb la línia *LNCaP* han estat notables. Per aquest motiu es va plantejar de valorar les possibles causes d'aquestes variacions mitjançant una anàlisi experimental piramidal que examínés les possibles causes genòmiques —en aquest cas l'estat de metilació del promotor d'*ABCG2*—, els efectes sobre la transcripció del gen i la traducció de la proteïna, i finalment la seva

funció mitjançant els assajos de la SP. Cal remarcar, però, que la relació entre l'expressió d'*ABCG2* i la funció del transportador, com s'ha vist en el cas dels clons murins SP, pot no ser directa, i expressar *ABCG2* no implica necessàriament posseir el fenotip SP i les propietats de les cèl·lules mare.¹⁷⁶

Un dels fenòmens que juga un paper clau en l'expressió gènica és la metilació dels promotors dels gens. La metilació, que comporta una modificació covalent de citosines, és un fenomen epigenètic heretable i reversible que actua en molts i diversos processos biològics, incloent el càncer,²⁹⁰ on s'ha descrit que es produeix una hipometilació global del genoma acompanyada d'una hipermetilació de les illes CpG. Quant a l'*ABCG2*, prèviament dos grups havien descrit que la metilació del seu promotor jugava un paper important en el carcinoma renal i en el mieloma múltiple.^{198,199} En la present tesi es va considerar l'estudi de l'estat de metilació del promotor de l'*ABCG2* a les línies *LNCaP* i *PC-3* —i al *PAC-120*. Amb aquest objectiu es van dissenyar uns encebadors adequats i es van dur a terme les seqüenciacions de la regió de l'illa CpG del promotor d'*ABCG2*. Es van elaborar mapes de metilació i es va veure que les cèl·lules *LNCaP* tenen el promotor parcialment desmetilat mentre que les *PC-3* el tenen pràcticament metilat en la seva totalitat. L'addició als cultius de l'agent bloquejador de la metilació *de novo* 5-aza-2-deoxicitidina va demostrar que afectava la metilació del promotor i el desmetilava parcialment. És interessant subratllar com les anàlisis de metilació d'*ABCG2* —a la línia *LNCaP* sobretot— mostren una heterogeneïtat quant al seu estat molt elevada entre els clons seqüenciats. És a dir, cada molècula de DNA —equivalent a una cèl·lula— presenta uns patrons diferents, amb algunes cèl·lules molt desmetilades i d'altres molt metilades. Aquesta observació corrobora el fet que els cultius cel·lulars, malgrat la certa homogeneïtat que se'ls atribueix, són heterogenis —com a mínim pel que fa a l'*ABCG2*. Per tant, els patrons de metilació al llarg dels passatges cel·lulars —que impliquen els canvis de temperatura, variacions en el medi, pH, etc— poden variar. De fet, aquests canvis en sistemes de cultiu cel·lular han estat observats per alguns grups.²⁹¹ És també interessant subratllar que tant les cèl·lules epitelials del *PAC-120* com la línia *PC-3*, ambdues més tumorigèniques que *LNCaP* —que de fet, no ho són gaire—, presenten el promotor d'*ABCG2* metilat. En aquest sentit seria interessant veure si aquesta metilació pot ser aberrant, com la descrita pel carcinoma renal.¹⁹⁸ En aquest cas, s'hauria d'avaluar què comportaria la metilació aberrant del promotor d'*ABCG2* en el càncer de pròstata.

La relació entre l'estat de metilació i l'expressió gènica va establir-se mitjançant la PCR convencional, que amplificava més en *LNCaP* que en *PC-3*. En ambdós casos, l'addició de 5-aza feia augmentar els trànscrips d'*ABCG2*. En l'aspecte transcripcional,

també és sabut que les variants gèniques generades per empalmament alternatiu poden jugar un paper important en la regulació del gen o en la generació de proteïnes alternatives. S'han trobat diversos primers exons alternatius per *ABCG2* i s'ha descrit que l'expressió d'alguns d'ells està relacionada amb cèl·lules canceroses quimioresistents.¹⁹⁵ Per aquest motiu es van emprar els encebadors descrits a l'article prèviament citat per comprovar l'expressió dels transcrits alternatius a les *LNCaP* i les *PC-3*. Les PCRs van demostrar que la forma més expressada era la 1c, que s'ha associat a cèl·lules resistents a drogues. A més, es va veure que l'addició de 5-aza també afectava aquesta isoforma, atès que comparteixen el mateix promotor. També és remarcable que la forma 1c pràcticament no es trobava expressada en situació normal en les *PC-3*, mentre la forma sencera sí. Pel que fa a la traducció, es va trobar proteïna per transferència *western* tant a *LNCaP* com a *PC-3*, i novament la 5-aza en feia augmentar els nivells. També es van investigar els nivells de proteïna per citometria de flux, i aquestes anàlisis van determinar que ambdues línies presentaven la proteïna, tot i que a nivells molt baixos. A més, en el cas de les *PC-3* tota la població semblava presentar els mateixos nivells de la proteïna, mentre que a les *LNCaP* novament s'observava una heterogeneïtat, amb com a mínim dues poblacions —una de lleument positiva i l'altra negativa. Finalment, a nivell funcional, es va comprovar com l'addició de 5-aza feia augmentar també la població SP d'ambdues línies. Tot i que està descrita la relació causa-efecte entre l'ús del fàrmac i la seva acció genòmica i l'augment de la població SP, no pot descartar-se els efectes no genòmics a través de l'estimulació funcional dels transportadors o la presència de transportadors nucleosídics.

D'un temps ençà alguns grups, com el dirigit per Momparler, han proposat compostos desmetilants com la 5-aza com a tractament pel càncer pel seu efecte antineoplàstic.²⁹² En aquest treball s'ha demostrat que la 5-aza desmetila *ABCG2* a les línies de pròstata *LNCaP* i *PC-3*, que en estat basal presenten uns estats de metilació diferents. Amb aquestes dades, el paper de la metilació de l'*ABCG2* no és clar, però es poden fer algunes reflexions. En primer lloc, si tenim en compte el paper de bombeig de drogues de l'*ABCG2*, la seva desmetilació i expressió mitjançant l'ús de fàrmacs d'efecte epigenètic podria ser contraproductiu, ja que, *a priori* fa pensar que permetria a moltes cèl·lules sobreviure a la quimioteràpia. En aquest sentit val a dir que en aquest treball es va utilitzar un tumor d'un animal que havia estat tractat amb 5-aza —i de fet no es va observar cap efecte sobre el creixement del tumor— i es va veure com el tractament havia afectat l'estat de metilació del promotor d'*ABCG2*, i com en l'anàlisi de la SP pràcticament tota la població cel·lular s'havia desplaçat cap a la regió de la cua i formava part de la *side population* —malgrat que aquest darrer fenomen també podria ser degut a una relaxació de la cromatina (Figura D6). Tot i que cal tenir sempre present

que el tractament amb 5-aza no és específic, sinó que actua sobre tots els promotors susceptibles de patir la seva acció, aquests resultats indiquen que aquest tractament podria no només no ser efectiu, sinó contraproduent, com a mínim en el càncer de pròstata. D'altra banda, però, les línies donen una informació diferent: *LNCaP*, línia hormonodependent, té el promotor més desmetilat que *PC-3*, línia hormonoindependent, que el té metilat. ¿És associable l'estat de dependència hormonal i l'estat de metilació del promotor d'*ABCG2*? ¿Hi ha cap vincle entre l'*ABCG2* i l'hormonoresistència? En aquest treball no se n'han obtingut proves concloents, però és si més no intrigant que es donin aquests fenòmens tenint en compte que l'*ABCG2* bombeja andrògens.

Quant a la regulació hormonal de l'*ABCG2*, en aquest treball s'ha demostrat que els nivells de sèrum regulen *ABCG2* i la *side population* a la línia *LNCaP*. En aquest sentit val a dir que la composició dels diferents sèrums comercials no és igual i que, de fet, aquesta pot variar en funció de molts paràmetres, inclosos el lot i la procedència dels animals. Això fa difícil esclarir quin dels components és responsable d'aquesta acció. De totes maneres, sabent que *ABCG2* bombeja andrògens,²⁸⁵ que *ABCG2* presenta un element de resposta a estrògens al seu promotor,²⁰⁰ i que s'ha vist que els estrògens poden regular-lo,²⁰¹⁻²⁰³ es va plantejar d'estudiar l'efecte de l'estradiol sobre l'*ABCG2* a la línia *LNCaP* i es va observar que n'augmenta la transcripció —aquestes concentracions tan baixes d'estradiol, però no afectaven la *side population*. Per tal de resoldre si el mecanisme d'acció de l'estradiol és a través del receptor d'estrògens, es van tractar les cèl·lules *LNCaP* amb estradiol i el compost ICI i es van comprovar els nivells d'RNA d'*ABCG2* per PCR convencional. Els càlculs sobre la densitometria van mostrar que aquests nivells havien disminuït amb l'addició d'ICI, la qual cosa està dient que l'efecte de l'estradiol es produeix, almenys en part, a través del receptor d'estrògens. Aquests resultats demostren que l'*ABCG2* està regulat per hormones a les línies de pròstata i reforcen el seu paper en el bombeig d'hormones.

Els resultats obtinguts en el present treball quant a la presència d'una *side population* a les línies *LNCaP* i *PC-3* contrasten amb els publicats per Patrawala i col·laboradors,¹⁷⁶ que descriuen l'absència d'una *SP* en les mateixes línies. Amb les dades discutides anteriorment, hom pot argumentar que el fet que no trobessin una *SP* pot ser deguda a unes condicions de cultiu subòptimes per a la seva detecció, o a la metilació del promotor d'*ABCG2* en les cèl·lules en cultiu. També les modificacions fetes al protocol de la *side population* —com la incubació de 90 minuts per a cèl·lules humanes en comptes dels 120 minuts descrits— podria afectar l'anàlisi dels resultats. En aquest cas en concret, la disminució del temps no necessàriament hauria de generar falsos negatius,

ja que el resultat esperat és que aquesta reducció no permeti que l'assaig arribi a un punt de saturació i per tant, les cèl·lules que ho puguin fer no acabin d'extreure tot el Ho342 —és a dir, que més aviat hom esperaria falsos positius. Però sí que, en el cas dels xenotrasplantaments, caldria valorar la contribució de les cèl·lules estromals murines al resultat, tal i com s'ha fet en el present estudi, ja que l'obtenció de poblacions *SP* mixtes (epiteliales i estromals) podria afavorir en molta de mesura el creixement i desenvolupament dels tumors. En aquest treball també descriuen la presència d'unes poques cèl·lules positives per ABCG2 a les línies *LNCaP* i *PC-3*.¹⁷⁶ El fet que trobin tan poques cèl·lules positives per ABCG2 quan fan immunocitofluorescències també contrasta amb els resultats exposats aquí, ja que les transferències *western* realitzades en aquesta tesi i els assajos de citometria de flux han indicat la presència de la proteïna ABCG2 a les línies *LNCaP* i *PC-3* en quantitats que no semblen correspondre's amb el marcatge d'unes poques cèl·lules. A la present tesi s'han utilitzat fins a 5 anticossos diferents contra ABCG2, i cap d'ells ha donat un resultat satisfactori per immunotinció per microscòpia. Només dos han resultat útils per citometria de flux i un per transferència *western*.

5.5 Darreres reflexions

El càncer de pròstata és una malaltia comuna en els homes d'edat avançada. De fet, la pròstata experimenta diferents graus d'alteracions durant el temps de vida dels homes que porten de manera inexorable al càncer de pròstata. Es creu que si els homes arribessin a 100 anys tots desenvoluparien càncer de pròstata. És a dir, el càncer de pròstata sembla un procés natural lligat a l'edat dels homes. En aquest sentit sembla com si d'alguna manera aquest fos un mecanisme de selecció natural contra la longevitat masculina —els possibles motius de la qual no discutiré aquí. A banda del fet que suposa una despesa important per la sanitat, el càncer de pròstata és encara una causa de mortalitat major en els països desenvolupats. L'origen i mecanismes associats al seu desenvolupament i progressió no han estat esclarits, tot i que amb el temps s'han obtingut informacions rellevants que han ajudat molt a comprendre el seu funcionament.

Malauradament, queda camí per recórrer. Que la premsa no ens faci inacurats a l'hora d'elaborar estudis i d'interpretar-ne les observacions que se'n deriven, però que tampoc la pressió, la precarietat, l'oportunisme ni els esperits mercenaris ens facin perdre de vista que la noblesa de l'objectiu exigeix de nosaltres molt més que l'aplicació d'uns coneixements. La ciència, o l'esperit científic, no és una necessitat sinó més aviat s'entén com allò que Maslow anomenava una *metamotivació*,²⁹³ i en certa manera, se'n demana una implicació en profunditat en aquest projecte, que sobrepassa de llarg les pures necessitats vitals de l'individu. Fóra peremptori que hom s'aturés a pensar quins són els principals beneficis que aporta a la societat l'exercici d'aquest —el seu— treball i quines conseqüències té, tan a gran escala com a petita escala, la manera com és exercit.²⁹⁴ Així pot esdevenir un camí vers la magnanimitat. Manllevant i adaptant les paraules de Hume: sigues científic, però enmig de tota la teva ciència, sigues encara un home.²⁹⁵