

## MECANISMOS DE DISEMINACIÓN Y METÁSTASIS Y ABORDAJES TERAPÉUTICOS EN TUMORES GINECOLÓGICOS

Luis Gonzalo ALONSO\*; Andrea Estrella ARIAS; Jorge BARBAZAN; Miguel ABAL

Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS). Santiago de Compostela, España.

\* luisgonzalo.alonso@rai.usc.gal

*Recibido: 10-Agosto-2023*

*Aceptado: 03-October-2023*

*Publicado on-line: 29-Diciembre-2023*

Cita:

Alonso LG, Arias AE, Barbazan J, Abal M. 2023. Mecanismos de diseminación y metástasis y abordajes terapéuticos en tumores ginecológicos. Mol 23: 1.

### Resumen

Los carcinomas serosos de ovario forman una entidad clínica bien diferenciada, de muy mal pronóstico dentro de los tumores ginecológicos que suelen progresar con una carcinomatosis peritoneal masiva de muy difícil manejo. En el presente estudio, nos centramos en este último aspecto para intentar clarificar los mecanismos de diseminación y metástasis en peritoneo, típica de este tipo de tumores ginecológicos donde el principal mecanismo de diseminación es el transcelómico en la cavidad abdominal, por el cual las células tumorales que descaman del tumor se incorporan al líquido peritoneal y diseminan por toda la superficie de la cavidad peritoneal para formar las metástasis. El microambiente tumoral juega un papel muy relevante en este proceso de metástasis, y uno de los principales componentes de dicho microambiente son los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs). En cáncer colorrectal, nuestro grupo ha demostrado que estos CAFs forman un anillo contráctil alrededor de los agregados de células tumorales ejerciendo fuerzas de compresión y contracción sobre estas células, reorganizándolas y alterando su conformación, pudiendo contribuir a la progresión del tumor. En el caso de la diseminación peritoneal, el papel de los CAFs está menos estudiado y la intención de este trabajo es explorar el comportamiento de los CAFs y las células tumorales al imitar la diseminación de estas, así como su interacción con los CAFs. Para ello, se realizaron co-cultivos de organoides y CAFs procedentes de muestras de líquido ascítico y peritoneo, respectivamente, de pacientes con cáncer de ovario, y se analizó mediante microscopía de fluorescencia si los CAFs forman este anillo contráctil alrededor de las células tumorales de cáncer de ovario. Asimismo, mediante videomicroscopía time-lapse, se estudió la evolución de estos co-cultivos y si las fuerzas de compresión ejercidas por los CAFs sobre las células tumorales intervienen en su diseminación. En estos modelos *in vitro* se ha observado que los CAFs agrupan de forma activa los agregados de células tumorales en agregados de mayor tamaño y los rodean formando una barrera alrededor de ellos; sin embargo, esta barrera no impide por completo su expansión. Consideramos que estos resultados pueden resultar interesantes para entender mejor la diseminación en peritoneo de cáncer de ovario, además de servir de base para el desarrollo de nuevas aproximaciones, como el estudio de la capacidad de los CAFs de ejercer fuerzas sobre las células tumorales o determinar qué sucede con estas células tras interaccionar con los CAFs, para finalmente pasar al uso de modelos *in vivo* y trasladar estos conocimientos a la clínica, contribuyendo así al desarrollo de nuevas terapias.

## Abstract

Ovarian serous carcinomas form a well-differentiated clinical entity with a very poor prognosis among gynecologic tumors that usually progress with massive peritoneal carcinomatosis that is very difficult to control. In the present study, we focus on the latter aspect to try to clarify the mechanisms of dissemination and metastasis in the peritoneum, typical of this type of gynecologic tumors, in which the main mechanism of dissemination is transcoelomic in the abdominal cavity, whereby tumor cells that lost adhesion to the tumor are incorporated into the peritoneal fluid and spread over the entire surface of the peritoneal cavity to form metastases. The tumor microenvironment plays a very relevant role in this metastasis process, and one of the main components of this microenvironment are cancer-associated fibroblasts (CAFs). In colorectal cancer, our group has shown that these CAFs form a contractile ring around the aggregates of tumor cells, exerting compression and contraction forces on these cells, reorganizing them and altering their conformation, which may contribute to tumor progression. In the case of peritoneal dissemination, the role of CAFs is not so well known and the intention of this study is to explore the behavior of CAFs and tumor cells, as well as their interaction with CAFs. To demonstrate this hypothesis, we co-cultured patient-derived organoids obtained from ascitic fluid samples and CAFs, obtained from peritoneal samples, both from ovarian cancer patients, and analyzed by fluorescence microscopy whether CAFs form this contractile ring around ovarian cancer tumor cells. Also, by time-lapse videomicroscopy, we studied the evolution of these co-cultures and whether the compressive forces exerted by the CAFs on the tumor cells are involved in their dissemination. In these *in vitro* models, it was observed that CAFs actively group tumor cell aggregates into larger aggregates and surround them by forming a barrier around them; however, this barrier does not completely prevent their spread. We believe that these results may be useful to better understand the dissemination of ovarian cancer in the peritoneum, as well as serving as a basis for the development of new approaches, such as the study of the capacity of CAFs to exert forces on tumor cells or to determine what happens to these cells after interacting with CAFs, in order to finally move on to *in-vivo* models and transfer this knowledge to the clinic, thus contributing to the development of new therapies.

## Introducción

El cáncer de ovario es considerado el cáncer ginecológico con mayor mortalidad (Ritch y Telleria 2022; Siegel et al. 2022) y la cuarta causa de muerte asociada a cáncer en mujeres de todo el mundo (Ritch y Telleria 2022). Esta elevada mortalidad se debe principalmente a la ausencia de síntomas en los estadios tempranos (van Baal et al. 2018), de forma que cuando las pacientes son diagnosticadas con cáncer de ovario se encuentran ya en un estadio muy avanzado, generalmente estadio III – IV (Tan et al. 2006), lo cual está asociado a un mal pronóstico; además, las células tumorales son quimiosensibles durante un periodo corto de tiempo por lo que la probabilidad de curar a las pacientes es solo del 30% (Lengyel 2010). El tipo de cáncer de ovario más común es el cáncer de ovario epitelial, que representa alrededor del 90% de los casos (Lisio et al. 2019; Mei et al. 2023; Tan et al. 2006). El cáncer de ovario epitelial se puede clasificar en varios histotipos distintos que a su vez se dividen en cáncer de Tipo 1 y de Tipo 2 (Lengyel 2010; Ritch y Telleria 2022). El cáncer de ovario epitelial de Tipo 1 se caracteriza por presentar un crecimiento más lento y, por tanto, ser diagnosticado en estadios más tempranos (estadio I o II) y suelen presentar TP53 sin mutar / *wild-type* (Ritch y Telleria 2022). Por el contrario, el cáncer de ovario epitelial de Tipo 2 tiende a ser mucho más agresivo, se diagnostica a estadios más avanzados (estadio III o IV) y generalmente presentan TP53 mutado (Ritch y Telleria 2022). El cáncer de ovario seroso de alto grado, el cual es un cáncer de ovario epitelial de tipo 2, es el más agresivo y es la causa del 70% de las muertes de las pacientes con cáncer de ovario epitelial (Ritch y Telleria 2022).

El cáncer de ovario se origina mayoritariamente en tres sitios: las superficies del ovario, las trompas de Falopio o la cavidad peritoneal (Lengyel 2010; Ritch y Telleria 2022). Al igual que la gran mayoría de tumores epiteliales, el cáncer de ovario epitelial comienza invadiendo los órganos más cercanos,

principalmente las trompas de Falopio, el útero y el anejo contralateral (Amadori et al. 1997); sin embargo, a la hora de metastatizar presenta un comportamiento diferente al resto de tumores epiteliales (Tan et al. 2006) y hematógenos (Lengyel 2010), ya que disemina mayoritariamente en peritoneo (Lengyel 2010) y omento (Mei et al. 2023) y lo hace de manera superficial (Lengyel 2010). Existen varias vías que hacen posible estas metástasis: la vía linfática, la hematogena, que es la menos frecuente (Thomakos *et al.* 2019) y la transcelómica, siendo esta última la más frecuente, donde alrededor del 70% de las pacientes presentaron metástasis en peritoneo (Eisenhauer 2017; Tan et al. 2006). Existen varias razones por las que las células tumorales de cáncer de ovario metastatizan mayoritariamente al peritoneo abdominal o al omento a través de esta vía transcelómica. La primera, es una simple cuestión de localización anatómica, ya que los ovarios se encuentran cerca de la cavidad abdominal, además de que el ovario no se encuentra recubierto de peritoneo por lo que no existe una barrera física que separe el tumor de la cavidad abdominal (Mei et al. 2023). La segunda razón, el omento y el peritoneo proporcionan un “suelo” con un microambiente protumoral para las metástasis de cáncer de ovario, acorde con la hipótesis de “semilla” y “suelo” (Fidler 2003). Por último, el gran tamaño de la cavidad y la existencia del líquido peritoneal facilitan la metástasis de las células tumorales en la cavidad del peritoneo (Mei et al. 2023).

Para metastatizar, las células tumorales primero necesitan desprenderse del tumor primario y adquirir un fenotipo más móvil e invasivo (van Baal et al. 2018), sin embargo, los mecanismos que intervienen en este desprendimiento celular todavía no están bien definidos (Mei et al. 2023). A diferencia de lo que ocurre en otros tipos de cáncer, el papel de la transición epitelio-mesénquima en la progresión y diseminación de cáncer de ovario todavía se desconoce a día de hoy (Mei et al. 2023). Algunos investigadores consideran que las células que se desprenden del tumor primario y metastatizan en peritoneo sufren esta transición epitelio-mesénquima (Faleiro-Rodrigues et al. 2004; Lengyel 2010; Patel et al. 2003) mientras que otros afirman lo contrario al detectar niveles de caderina epitelial (E-caderina) en las células tumorales metastáticas (Hang et al. 2019). En definitiva, la transición epitelio-mesénquima en cáncer de ovario solamente ha sido confirmada *in vitro* (Mei et al. 2023).

A pesar de esto, está mayoritariamente aceptado que la pérdida de uniones célula-célula y la pérdida de adhesión celular contribuyen al desprendimiento de las células del tumor primario (Mei et al. 2023). Diferentes moléculas responsables de la adhesión celular sufren cambios en su expresión y como consecuencia de estos cambios se produce el desprendimiento celular, algunas de estas moléculas son: la integrina (Ahmed et al. 2002), el PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno-1) (Czekay y Loskutoff 2004), el factor de crecimiento de hepatocitos (Corps et al. 1997) y, por último, la más relevante, la E-caderina (Sawada et al. 2008). La E-caderina actúa suprimiendo la motilidad celular, la invasión y la metástasis (Sawada et al. 2008) y en el 60% de los casos, su expresión se encuentra reducida (Joo et al. 2002; Elloul et al. 2005). Esto desencadena el desprendimiento de células que formaban parte del tumor primario, las cuales obtienen un fenotipo más invasivo (Kalluri y Weinberg 2009) y se incorporan al líquido peritoneal, en forma de célula única (*single cell*) o en agregados (*clusters*), hasta metastatizar en peritoneo y omento (Lengyel 2010; Tan et al. 2006; van Baal et al. 2018). En estadios avanzados de cáncer de ovario se produce una acumulación excesiva de este líquido peritoneal, que es lo que se conoce como ascitis y está asociado con un mal pronóstico y una mayor diseminación de las celulares tumorales (Ayhan et al. 2007; Huang et al. 2013). Por un lado las fuerzas mecánicas y el flujo resultante del movimiento fisiológico del líquido ascítico contribuyen a la implantación intraperitoneal de las células tumorales que se habían desprendido (Asem et al. 2020) y por otro lado, el líquido ascítico facilita las metástasis transcelómicas al generar un microambiente tumoral único, el cuál puede dividirse en dos componentes (Ritch y Telleria 2022): un componente celular, que incluye fibroblastos y células del sistema inmune (Ritch y Telleria 2022), además de células tumorales y células del estroma (Jiang et al. 2020; Kipps et al. 2013) y un componente acelular formado por citoquinas, factores de crecimiento y otros metabolitos liberados por el componente celular, los tejidos de los alrededores y las células tumorales del ovario (Ritch y Telleria 2022).

La cooperación entre las células tumorales y las células del estroma favorecen la diseminación de las células tumorales en el interior de la cavidad del peritoneo (Schoutrop et al. 2022) y es el motivo principal de la progresión de la enfermedad (Joyce y Pollard 2009) y, por tanto, del mal pronóstico de las pacientes con cáncer de ovario (Fucikova et al. 2021; Yokoi et al. 2017). Uno de los tipos celulares más abundantes presentes en el estroma son los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) (Sahai et al. 2020). En cáncer colorrectal los CAFs promueven la supervivencia y la proliferación de las células tumorales, además de regular las metástasis y la respuesta inmune (Kalluri 2016; Sahai et al. 2020), contribuyendo así a la progresión del cáncer.

Los CAFs son células altamente contráctiles que se encargan de la formación de la matriz extracelular (Attieh y Vignjevic 2016; Barbazan y Vignjevic 2019) y junto con dicha matriz forman una cápsula alrededor de los agregados de células tumorales de cáncer colorrectal (Glentis et al. 2017; Staneva et al. 2019), que no solo los rodean de forma pasiva, sino que también comprimen de forma activa estos agregados, reorganizándolos y alterando su conformación (Barbazan et al. 2021). La fibronectina se encarga de estabilizar estas cápsulas, además de permitir la conexión entre diferentes fibroblastos mediante uniones célula-célula (Pankov et al. 2019) y por tanto conseguir así una contracción supracelular coordinada. Esta barrera que forman los CAFs alrededor de los agregados celulares y las contracciones y compresiones que ejercen sobre dichos agregados pueden favorecer la progresión del tumor promoviendo la pluripotencia de las células tumorales y su proliferación, lo que conlleva a un mal pronóstico (Barbazan et al. 2021).

El papel de los CAFs en la diseminación peritoneal que caracteriza el cáncer de ovario todavía no se conoce al completo. Con este trabajo se busca explorar cómo se comportan los CAFs y las células tumorales imitando la diseminación de éstas, además de su interacción con los CAFs, estableciendo como principales objetivos los siguientes:

1. Puesta a punto de aislamiento y generación de cultivos de células tumorales y de CAFs de pacientes con cáncer de ovario.
2. Puesta a punto de estudios de videomicroscopía con co-cultivos de células tumorales y CAFs en el contexto de cáncer de ovario.
3. Caracterización por microscopía confocal de la interacción entre células tumorales de cáncer de ovario y CAFs.

## Material y Métodos

### *Obtención de fibroblastos a partir de peritoneo*

En este estudio preliminar se han puesto a punto las técnicas de co-cultivo que simulan la diseminación peritoneal en cáncer de ovario, y las de microscopía en tiempo real y de inmunofluorescencia, para estudiar y caracterizar la interacción entre las células tumorales y su microambiente durante el proceso de diseminación y colonización en peritoneo. Para esta puesta a punto, se generaron cultivos primarios de fibroblastos representativos a partir de una muestra de peritoneo de una paciente diagnosticada con cáncer de ovario, proporcionada por el Hospital Clínico Universitario de Santiago (Santiago de Compostela), además de una muestra de peritoneo de ratón. Estas muestras se utilizaron para la obtención de fibroblastos, tanto murinos como humanos y fueron manipuladas en condiciones de completa esterilidad tal y como se describe en Barbazan et al. (2021). Con unas pinzas y un bisturí se separó la membrana basal del peritoneo, la cual se cortó en trozos de 1 – 2 mm de tamaño que fueron posteriormente colocados en una placa con medio DMEM High Glucose 10% FBS, complementado con antibióticos (25  $\mu$ L de Metronidazole y 20  $\mu$ L de Ciprofloxacina por cada 10 mL de medio). Una vez colocados los trozos en las correspondientes placas, éstas se incubaron a 37 °C durante varios días. Se fue comprobando periódicamente si se observaban fibroblastos en las inmediaciones de los trozos de membrana basal que se habían colocado en la placa. Una semana después se empezaron a ver fibroblastos (figura 1).

Dos semanas después de lo observado en la figura 1, algunos fibroblastos empezaron a entrar en senescencia, adquiriendo una morfología diferente, con el citoplasma más aplastado, y generalmente eran aquellos fibroblastos que se encontraban más lejos de la muestra de peritoneo los que presentaban dicha morfología. Fue entonces cuando se decidió pasar los fibroblastos a una nueva placa con medio fresco, con nuevos nutrientes y sustituyendo el anterior, el cual ya habían consumido. Para ello se aspiró el medio y se lavó con PBS para eliminar posibles restos; después, se incubaron durante unos minutos a 37 °C con 2 mL de Tripsina. Tras observar al microscopio que los CAFs se habían despegado de la placa se añadieron 5 mL de medio DMEM Glutamax 1x ITS antes de centrifugar a 500x g durante 5 min. Al terminar se retiró el sobrenadante, se resuspendió en 10 mL de medio DMEM Glutamax 1x ITS y se sembró en una placa, que se incubó a 37 °C hasta el momento de su siembra en la placa con organoides.

### *Recuperación y siembra de organoides*

Se procesaron muestras de líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario, proporcionadas por el Hospital Clínico Universitario de Santiago (Santiago de Compostela), a partir de las cuáles se obtuvieron cultivos de organoides (PDOs: Patient Derived Organoids). Se llevó a cabo una caracterización inmunohistoquímica de dichos organoides utilizando diferentes marcadores típicos de diagnóstico clínico: hematoxilina eosina, estrógenos, progesterona, TP53, CK7, WT1 y PAX8 (Arias-Díaz et al. 2023). De esta forma se confirmó que el cultivo de organoides utilizado, además de presentar una estructura similar a los tumores de origen, guarda una cierta funcionalidad y tiene las mismas características que el tumor primario, siendo un modelo preclínico representativo del tumor que tiene la paciente.

Los organoides suelen presentar dos morfologías distintas: densos (figura 2A) y císticos (figura 2B). Para realizar este estudio se optó por el uso de organoides densos, los cuales fueron recuperados con VitroGel con el fin de deshacer solamente la matriz, permitiendo la obtención de organoides disgregados. En un primer lugar se retiró el medio DMEM F12 de los pocillos donde se encontraban los organoides. Se añadió 1 mL de VitroGel (4 °C) a cada uno y se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL. Se realizó un lavado con 1 mL de VitroGel para asegurar la recuperación total de organoides, se añadió al mismo Falcon y se centrifugó a 300x g durante 5 min a una temperatura de 4 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet en medio DMEM High Glucose 10% FBS y se sembró 1 mL en placas, previamente tratadas con una solución de 100 µg/mL de Colágeno I en PBS.

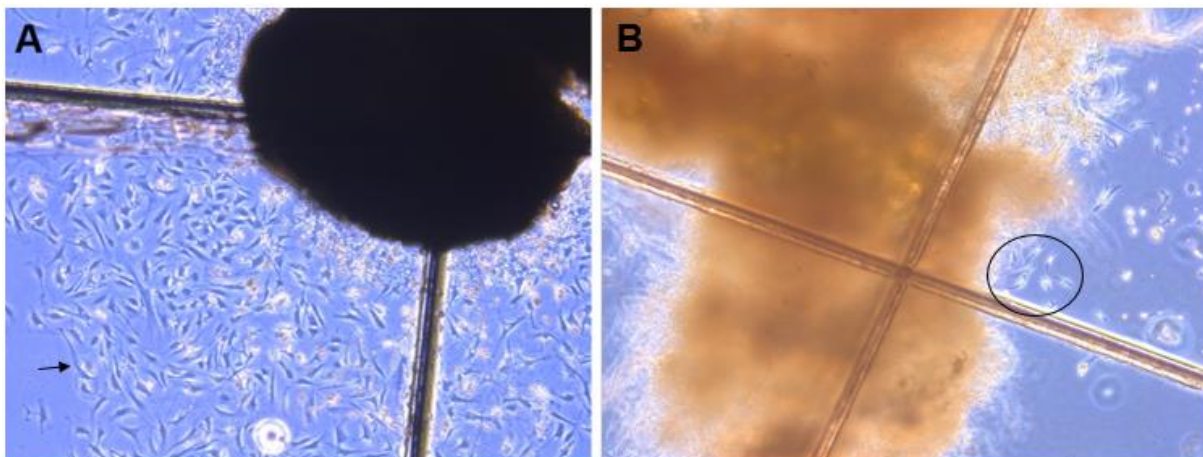


Figura. 1. Muestras de membrana basal de peritoneo de ratón (A) y de una paciente con cáncer de ovario (B) colocadas sobre marcas para evitar su desplazamiento. Se pueden ver fibroblastos en los alrededores (flecha: fibroblastos de ratón; círculo: fibroblastos humanos).

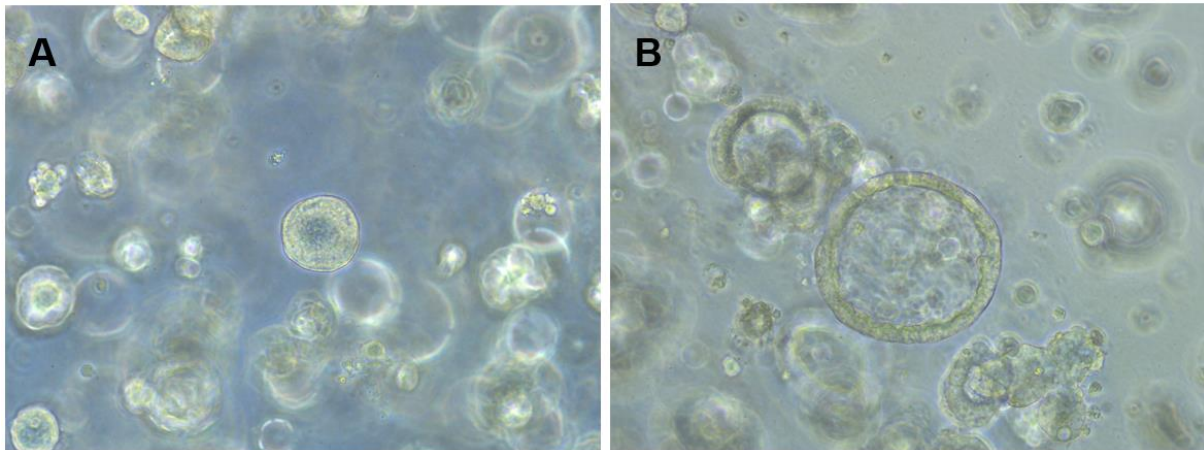


Figura. 2. Organoides densos (A) y organoides císticos (B) recuperados a partir de muestras de líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario. Los organoides densos presentan una morfología más compacta, mientras que los organoides císticos se encuentran en forma de anillo.

También se sembraron 100  $\mu$ L en las placas de 35 mm de diámetro con geles de acrilamida de 11 Kpa para favorecer su adhesión y plantillas de PDMS de 300  $\mu$ m para controlar el crecimiento de las células tumorales; dichas placas se incubaron a 37 °C.

#### *Fabricación de geles de acrilamida*

Tal y como se describe en Barbazan et al. (2021), se trataron dos placas de 35 mm de diámetro con silano (3-aminopropyltrimethoxysilane, Sigma-Aldrich) diluído 1:3 en PBS durante 15 min. Pasado este tiempo, se realizaron tres lavados con agua, de 5 min cada uno. Después se incubaron durante 30 min con una solución de 0,5% Glutaraldehído/PBS (p/v). De nuevo, se realizaron tres lavados con agua y se secaron. Se fabricaron geles de poliacrilamida de una rigidez de 11 Kpa con una solución que contiene PBS 1X, acrilamida, bisacrilamida, persulfato de amonio (APS) y TEMED en las cantidades recogidas en la tabla 1. Esta solución se dejó polimerizar encima de los cubres de cristal tratados previamente con silano y se cubrieron con cubres de 18 mm de diámetro sin tratar con silano. Tras una hora se retiraron los cubres y los geles de poliacrilamida se incubaron con una solución de 2 mg/mL de sulpho-SANPAH bajo una luz UV de una longitud de onda de 365 nm durante 15 min. Después de esto, se lavaron los geles una vez con HEPES 10 mM durante 3 min en agitación, y dos veces con PBS (3 min cada uno y también en agitación) para eliminar el exceso de Sulpho-SANPAH. Por último, los geles se recubrieron con una solución de 100  $\mu$ g/mL de Colágeno I en PBS (100  $\mu$ L por cada gel es suficiente) y se incubaron durante toda la noche a 4 °C.

Tabla 1. Componentes de la solución de acrilamida y volúmenes necesarios para la preparación de un gel de acrilamida de una rigidez de 11 Kpa.

Rigidez	PBS 1X ( $\mu$ L)	Acrilamida 40% ( $\mu$ L)	Bisacrilamida 2% ( $\mu$ L)	APS 10% ( $\mu$ L)	TEMED ( $\mu$ L)
11 Kpa	367,75	93,75	25	2,5	0,25

#### *Pasivación de las plantillas de PDMS*

Las plantillas de PDMS (*Polydimethylsiloxane*) son unas finas láminas con unos agujeros, de 300  $\mu$ m o de 500  $\mu$ m en la zona central que se utilizaron para controlar el crecimiento de las células tumorales

que posteriormente serían sembradas sobre los geles de acrilamida. De esta forma, en las placas donde se coloquen estas plantillas de PDMS, el crecimiento de las células tumorales estará controlado y concentrado en estos agujeros. Sin embargo, antes de colocarlas sobre los geles de poliacrilamida recubiertos con colágeno, se deben tratar con una solución de ácido plurónico F127/PBS 2% (p/v) (Sigma-Aldrich) durante una hora para pasivarlas (Barbazan et al. 2021), es decir, para hacer el PDMS no adherente y evitar así que las células tumorales se peguen al PDMS y asegurarse de que crezcan en los agujeros de las plantillas. Tras esto, se lavaron dos veces con PBS, se dejaron secar durante 20 min y se colocaron con sumo cuidado encima de los geles de poliacrilamida.

#### *Siembra de fibroblastos asociados a cáncer (CAFs)*

Con una cámara Neubauer se determinó la densidad celular de los cultivos de CAFs, obteniéndose un resultado de ~200.000 células/mL en el caso del cultivo de fibroblastos de humano y ~400.000 células/mL en el caso de los fibroblastos de ratón. Se centrifugaron a 500x g durante 5 min y se sembraron 75  $\mu$ L de los fibroblastos de humano (~150.000 CAFs) en las placas con gel y plantillas de PDMS; en cada una de las demás placas se sembró 1 mL de los fibroblastos de ratón (~400.000 CAFs).

#### *Ensayo de time-lapse*

Mediante el uso de un microscopio wide-field se llevó a cabo un ensayo de time-lapse con el objetivo de estudiar el comportamiento de los CAFs y de las células tumorales para poder determinar las posibles interacciones que se puedan dar entre ambos. Se utilizó un soporte específico para colocar las placas de cultivo en el microscopio, además de una sonda de temperatura y un tubo de CO<sub>2</sub> para mantener, durante la totalidad del ensayo, unas condiciones de temperatura y CO<sub>2</sub> adecuadas para el mantenimiento de las células tumorales y de los CAFs. Con el software de microscopía Leica LASX se ajustaron los parámetros de intensidad, exposición y apertura para facilitar la visualización de los cultivos. Con el mismo software se seleccionaron diferentes posiciones de cada una de las condiciones establecidas: cuatro posiciones del cultivo exclusivo de organoides; otras cuatro del cultivo de organoides sobre CAFs; y por último, doce posiciones del cultivo con CAFs sobre los organoides. Se fijó la duración del ensayo en tres días, con una toma de imágenes cada treinta minutos, con el objetivo 10X, de las posiciones previamente marcadas.

#### *Fijación de muestras de organoides con CAFs*

Además de las placas de cultivo con organoides y CAFs utilizadas para realizar el ensayo de time-lapse, también se sembraron, siguiendo el mismo procedimiento, tres placas de 35 mm de diámetro. Sin embargo, en este caso, antes de sembrar los CAFs, se incubaron con una solución de CellTracker Green diluido 1:1000 en PBS durante 30 min a 37 °C para marcarlos. Estas tres placas se fijaron con paraformaldehído (PFA) a distintos tiempos (ver más abajo) para estudiar el comportamiento de los CAFs y de los organoides para así complementar las imágenes obtenidas con el time-lapse. La primera de las placas fue fijada 24 h después de la siembra de los CAFs; la siguiente se fijó a las 48 h y la última, a las 96 h. Para fijarlas, en primer lugar se realizó un lavado con PBS antes de incubar a temperatura ambiente durante 20 min con 1 mL de PFA 4%. Una vez transcurrido este tiempo se realizó otro lavado con PBS y se almacenaron las placas a 4 °C. De la misma forma se fijaron también las placas con gel y plantillas de PDMS.

#### *Inmunofluorescencia de las placas previamente fijadas*

Con el objetivo de preparar estas placas para un ensayo de inmunofluorescencia mediante el uso de un microscopio confocal se marcaron los filamentos de actina con Phalloidin, los núcleos con DAPI y los CAFs con CellTracker Green (previamente ya marcados). En lo que respecta al marcaje con Phalloidin y DAPI se llevó a cabo siguiendo los siguientes pasos: en primer lugar se incubaron las

placas durante 5 min con 200  $\mu$ L de Triton X100 0,1% para permeabilizar las membranas de las células. Tras esto, se realizaron varios lavados con PBS para retirar posibles restos de Triton y se incubaron las placas durante 90 min con una solución de Phalloidin 1X en PBS - 1% BSA, a la cual se le añadió una gota de DAPI por cada 10 mL de Phalloidin utilizados. De nuevo, se realizaron varios lavados con PBS y se añadió una gota de medio de montaje, se colocó un cubre encima y se almacenaron las placas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## Resultados y Discusión

Como ya se ha mencionado previamente, se establecieron diferentes condiciones: un cultivo exclusivo de organoides sobre una placa sin tratar y co-cultivos de organoides y CAFs en placas tratadas con una solución de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Colágeno I en PBS, donde en algunas placas se sembraron CAFs sobre organoides y en otras se hizo al revés, organoides sobre CAFs. Gracias a los resultados obtenidos con los experimentos de videomicroscopía time-lapse ha sido posible identificar y clasificar diferentes escenarios y comportamientos de los cultivos de organoides y CAFs.

### *Agrupación de organoides por acción activa de los CAFs*

Los cultivos de organoides sin CAFs no presentaron variaciones significativas durante el experimento (Fig. 3A), algunos aumentaron de tamaño mientras que otros permanecieron inalterados durante todo el ensayo. Sin embargo, en presencia de CAFs, los organoides tendían a agruparse los unos con los otros. Esto se observó tanto en aquellas placas donde se sembraron organoides sobre un cultivo de CAFs (figura 3B), como en aquellos casos en los que se disponía de un cultivo de organoides, sobre los cuales se sembraron CAFs a posteriori (figura 3C). Por tanto, se puede afirmar que, por acción de los CAFs, los organoides cercanos tienden a agruparse los unos con los otros formando agregados celulares de mayor tamaño.

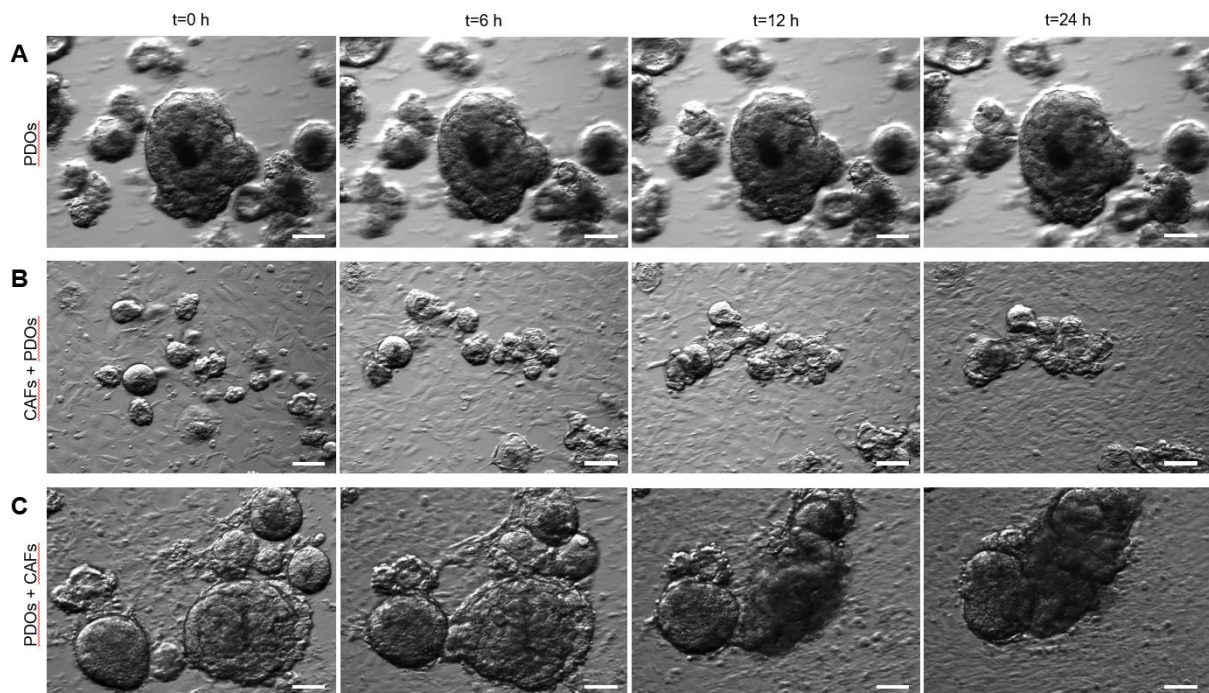


Figura 3. Agrupación de los organoides por acción de los CAFs (microscopía de campo claro, barra de escala 100  $\mu\text{m}$ ). (A) Cultivo de solo organoides, sin CAFs. (B) Organoides sembrados sobre un cultivo de CAFs. (C) CAFs sembrados sobre un cultivo de organoides.



### Interacción de los organoides con los CAFs

En los cultivos de organoides donde se sembraron CAFs a posteriori, se observaron numerosos casos donde las células tumorales comenzaban a expandirse de forma continuada, provocando la retracción de los CAFs que se encontraban rodeando los organoides, dando lugar a la formación de un anillo de expansión, el cual se hacía cada vez más grande a medida que pasaba el tiempo. Esta expansión de las células tumorales resultó ser independiente del tamaño del organoide (figura 4A) ya que en ambos casos (s1 y s2), a pesar de la diferencia en tamaño, se forma igualmente el anillo de expansión. En aquellas situaciones donde se encontraban varios organoides en regiones cercanas, la expansión de uno de ellos generalmente era tan grande que alteraba la conformación del otro (figura 4B).

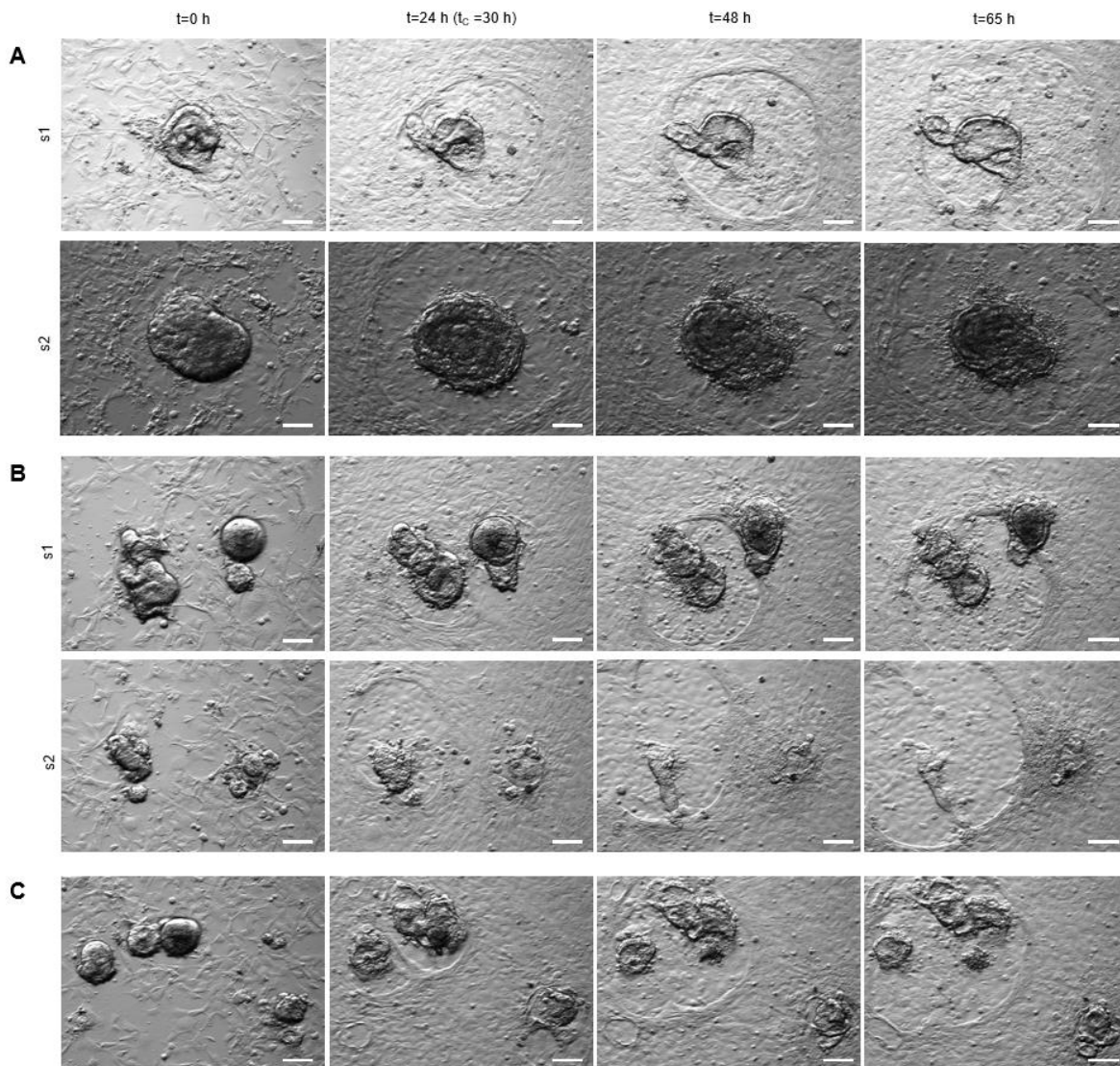


Figura. 4. Distintos escenarios donde se observa una expansión por parte de las células tumorales, provocando la retracción de los CAFs. (A) Esta expansión es independiente del tamaño del organoide, en ambos casos (s1 y s2), se produce la formación de un anillo de expansión. (B) La expansión de un organoide puede interferir con el tamaño y la morfología de otro cercano. (C) La expansión de dos organoides cercanos puede darse sin alteraciones. Condiciones de microscopía idénticas a la figura 3.

Sin embargo, esto no siempre era así, como se puede observar en la figura 4C, a pesar de encontrarse dos organoides muy cerca el uno del otro, sus correspondientes expansiones no se vieron alteradas, es más, tras un tiempo (t=40 h) los anillos de expansión de cada uno de estos organoides terminaron

juntándose debido a la fuerza ejercida por las células tumorales, las cuales terminaron rompiendo la barrera de CAFs que separaban ambos organoides, dando lugar a un único anillo de expansión de gran tamaño (figura 4C).

También se observó una situación diferente a todas las demás (figura 5), donde los CAFs comprimen a las células tumorales, alterando su tamaño y conformación a medida que pasa el tiempo. Como se puede observar en la figura 5, el tamaño y la forma del organoide al inicio del ensayo de time-lapse ( $t=0$  h) es diferente a la conformación que presenta al finalizar dicho ensayo ( $t=65$  h). Esto, aunque en menor medida, se corresponde con lo observado en cáncer colorrectal por Barbazan et al. (2021), donde se ha demostrado que los CAFs ejercen fuerzas de compresión suficientes como para alterar la conformación de las células tumorales. Es posible que esto tenga consecuencias en la diseminación de las células tumorales de cáncer de ovario, sin embargo, sería necesario realizar más estudios al respecto, como por ejemplo añadir bolitas o perlas magnéticas para poder cuantificar las fuerzas ejercidas por los CAFs mediante microscopía de fuerzas de tracción (TFM por sus siglas en inglés: Traction Force Microscopy) (Huang et al. 2019; Barbazan et al. 2021) para poder confirmar la existencia de fuerzas de compresión actuando sobre los agregados de células tumorales.

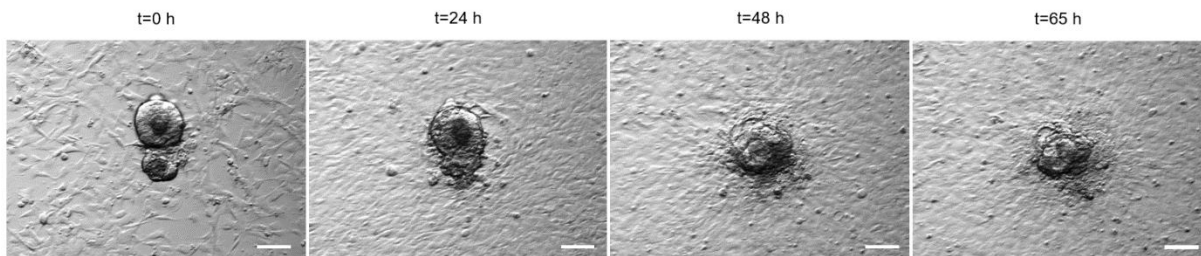


Figura. 5. Compresión, reorganización y alteración de la conformación del agregado de células tumorales por acción de los CAFs. Condiciones de microscopía idénticas a figura 3.

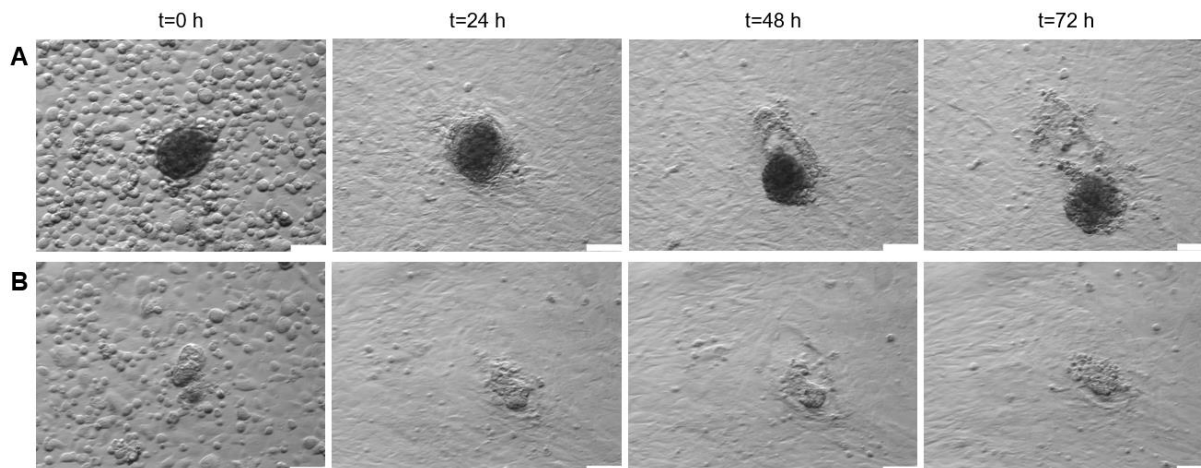


Figura. 6. Ensayos con CAFs derivados de paciente. (A) Liberación del organoide de la cápsula de CAFs. (B) Apertura y cierre de CAFs alrededor del organoide.

Por último, se hizo el mismo ensayo de videomicroscopía time-lapse pero con CAFs derivados de paciente (figura 6) donde se observó una liberación del organoide de la barrera de CAFs que lo rodeaban (figura 6A) además de sucesivos cierres y aperturas por parte de los CAFs (figura 6B).

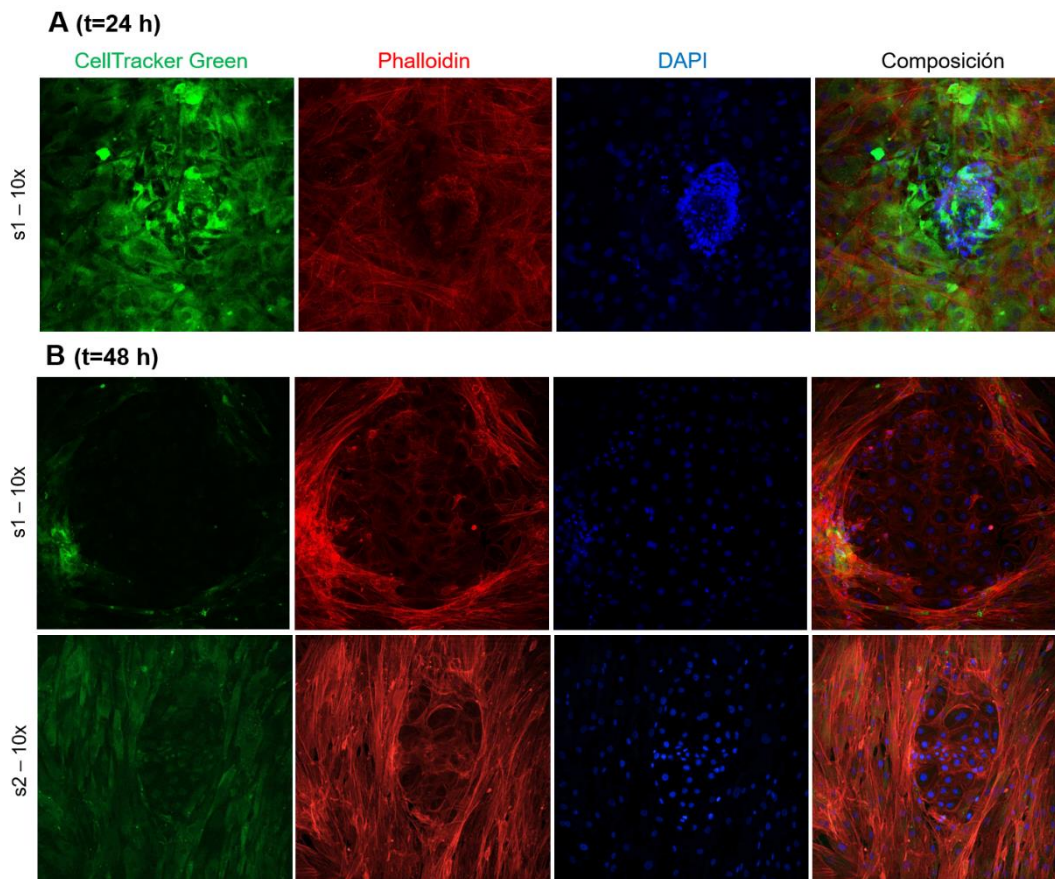
En lo que respecta a los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia realizados para complementar aquellos obtenidos con videomicroscopía time-lapse, se encuentran recogidos en las figuras 7 y 8. Las imágenes correspondientes a las placas que fueron fijadas a distintos tiempos ( $t=24$  h;  $t=48$  h;  $t=96$  h) y marcadas con los correspondientes biomarcadores, han permitido identificar

fácilmente los filamentos de actina (en rojo, marcados con Phalloidin) que interconectan los distintos CAFs (en verde, marcados con CellTracker Green) que se encuentran alrededor de las células tumorales, así como los distintos núcleos (en azul, marcados con DAPI), tanto de las células tumorales como de los propios CAFs. Se puede ver cómo, en mayor o en menor medida, los CAFs se sitúan alrededor de las células tumorales, rodeándolas y en algunos casos recubriéndolas por encima. A las 96 h (Fig. 7C), en la imagen correspondiente a la segunda muestra (s2) se puede ver como los filamentos de actina se introducen en el cúmulo de núcleos de las células tumorales. Esto puede ser un mecanismo por parte de los CAFs para retirar células de este agregado y dispersarlas, sin embargo, esto es solo una hipótesis que necesita confirmación.

### *Control de las condiciones de crecimiento con plantillas de PDMS*

En el caso del co-cultivo de organoides con CAFs sobre gel de acrilamida se puede observar una diferencia clara entre los resultados correspondientes al uso de las plantillas de 300 y de 500  $\mu\text{m}$ . En el primer caso, los CAFs se encuentran recubriendo las células tumorales al completo (figura 8A), mientras que al utilizar las plantillas de 500  $\mu\text{m}$  se puede ver un espacio en negro en el centro de la imagen (figura 8B) el cual indica que los CAFs no han podido recubrir a las células tumorales debido, probablemente, al mayor tamaño de estos agujeros de las plantillas de PDMS.

Los ensayos de videomicroscopía time-lapse e inmunofluorescencia que se han llevado a cabo en cultivos *in vitro* de organoides derivados de pacientes y CAFs han permitido determinar la importancia de los CAFs en la agrupación de diferentes agregados de células tumorales presentes en los cultivos y en la formación de barreras alrededor de dichas agregados, llegando a modificar su conformación en algunos casos; si bien es cierto que estas barreras no impiden por completo la expansión de las células tumorales, las cuáles provocan la formación de anillos de expansión debido a la retracción de los CAFs, llegando incluso a romper en ocasiones esta barrera. Esto puede ser indicativo de la gran capacidad de expansión que presentan las células tumorales de cáncer de ovario, ya que, al contrario de lo observado en cáncer colorrectal (Barbazan et al. 2021), los CAFs no son capaces de ejercer la suficiente fuerza sobre estas células como para impedir su diseminación.



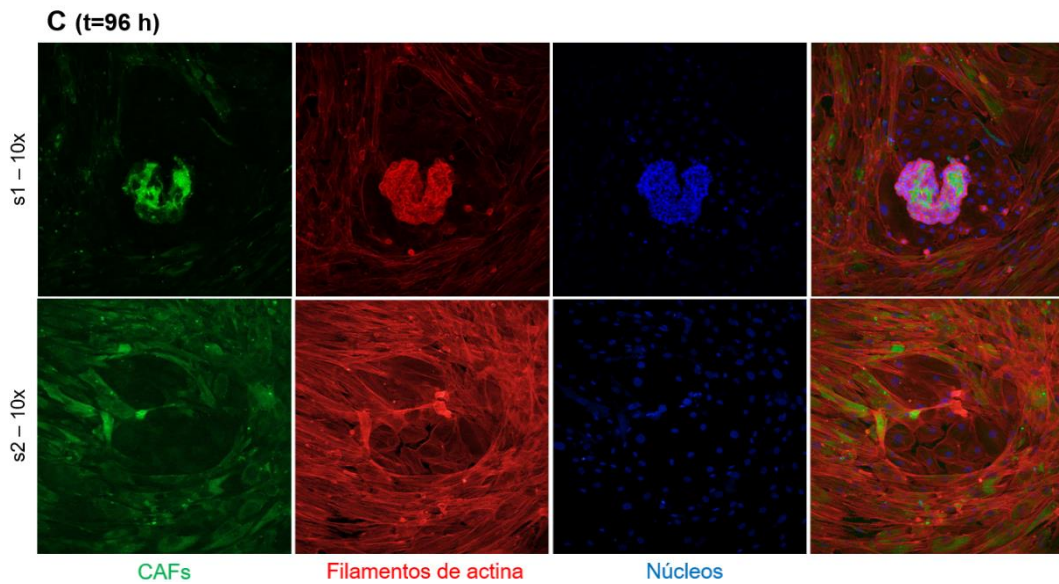
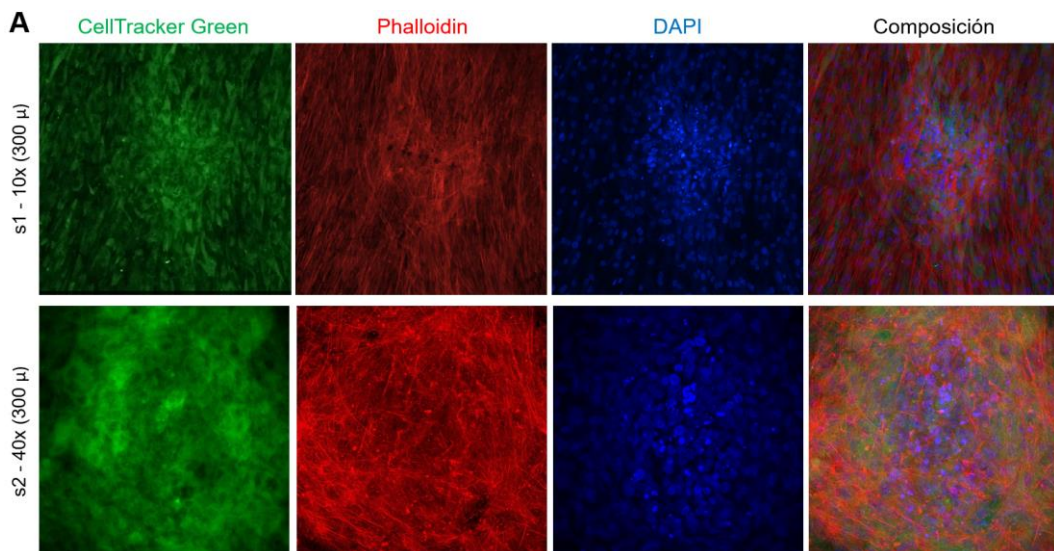


Figura 7. Resultados de los ensayos de inmunofluorescencia con microscopía confocal de las placas de 35 mm de diámetro tratadas con una solución de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Colágeno I en PBS, donde se sembraron CAFs obtenidos a partir de una muestra de peritoneo de una paciente con cáncer de ovario y organoides densos obtenidos a partir de una muestra de líquido ascítico, también de una paciente con cáncer de ovario. Estas placas fueron fijadas a distintos tiempos: 24 h (A), 48 h (B) y 96 h (C). En verde se representan los CAFs (CellTracker Green); en rojo, los filamentos de actina (Phalloidin); y en azul los núcleos celulares (DAPI).



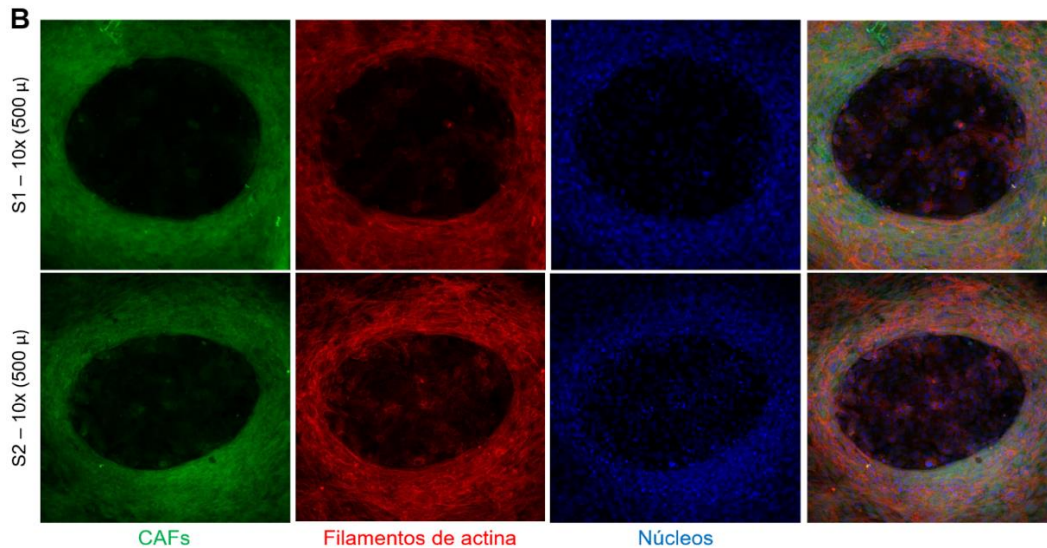


Figura. 8. Resultados de los ensayos de inmunofluorescencia con microscopía confocal del cultivo de organoides en placas de 35 mm de diámetro con gel de acrilamida de 11 kPa. En verde se representan los CAFs (CellTracker Green); en rojo, los filamentos de actina (Phalloidin); y en azul los núcleos celulares (marcados con DAPI). (A) Co-cultivo con CAFs humanos, procedentes de una muestra de peritoneo de una paciente con cáncer de ovario y plantillas de PDMS de 300 µm. (B) Co-cultivo con CAFs murinos, procedentes de una muestra de peritoneo de ratón y plantillas de PDMS de 500 µm.

## Conclusiones

1. Los CAFs agrupan de forma activa diferentes agregados de células tumorales en agregados de mayor tamaño.
2. Los CAFs forman barreras alrededor de las células tumorales de cáncer de ovario, en ocasiones recubriéndolas y modificando su conformación.
3. Se han observado dos patrones principales en esta interacción entre los CAFs y las células tumorales: uno de expansión de células tumorales y otro de retención.
4. Esto puede ser indicativo, por un lado, de la gran capacidad de expansión y proliferación que presentan las células tumorales de cáncer de ovario. Por otro lado, de la capacidad de los CAFs de controlar la expansión de las células tumorales.

Las implicaciones que esto puede llegar a tener en la progresión de la enfermedad todavía se desconocen, pero se cree que los resultados de este estudio pueden aportar algo de luz sobre los mecanismos responsables del proceso de metástasis en peritoneo en cáncer de ovario, además de servir de base para el desarrollo de nuevas aproximaciones a la hora de lidiar con el tumor ginecológico con mayor mortalidad en todo el mundo.

Los siguientes pasos que se deben dar en este ámbito para terminar de tener una visión clara y global del proceso de diseminación peritoneal incluyen aspectos como:

1. Ampliar el número de ensayos y de cultivos, tanto de CAFs como de células tumorales.
2. Determinar qué les sucede a las células tumorales tras interaccionar con los CAFs.
3. Estudiar la capacidad de los CAFs de ejercer fuerzas de tracción mediante el uso de microscopía de fuerzas de tracción.
4. Pasar a modelos *in vivo*.

## Agradecimientos

A todas las pacientes que han participado de forma desinteresada en este estudio y a los servicios de oncología y ginecología del Hospital Clínico Universitario de Santiago (Santiago de Compostela).

## Referencias

- Ahmed N, Pansino F, Clyde R, Murthi P, Quinn MA, Rice GE, Agrez MV, Mok S, Baker MS. 2002. Overexpression of alpha(v)beta6 integrin in serous epithelial ovarian cancer regulates extracellular matrix degradation via the plasminogen activation cascade. *Carcinogenesis* 23: 237–244.
- Amadori D, Sansoni E, Amadori A. 1997. Ovarian cancer: natural history and metastatic pattern. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 2: 8–10.
- Arias-Diaz AE, Ferreiro-Pantin M, Barbazan J, Perez-Beliz E, Ruiz-Bañobre J, Casas-Arozamena C, Muínelo-Romay L, Lopez-Lopez R, Vilar A, Curiel T, Abal M. 2023. Ascites-Derived Organoids to Depict Platinum Resistance in Gynaecological Serous Carcinomas. *International journal of molecular sciences* 24: 13208–13224.
- Asem M, Young A, Oyama C, ClaudeDeLaZerda A, Liu Y, Ravosa MJ, Gupta V, Jewell A, Khabele D, Stack MS. 2020. Ascites-induced compression alters the peritoneal microenvironment and promotes metastatic success in ovarian cancer. *Scientific reports* 10: 11913–11927.
- Attieh Y, Vignjevic DM. 2016. The hallmarks of CAFs in cancer invasion. *European journal of cell biology* 95: 493–502.
- Ayhan A, Gultekin M, Taskiran C, Dursun P, Firat P, Bozdag G, Celik NY, Yuce K. 2007. Ascites and epithelial ovarian cancers: a reappraisal with respect to different aspects. *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society* 17: 68–75.
- Barbazan J, Matic Vignjevic D. 2019. Cancer associated fibroblasts: is the force the path to the dark side? *Current opinion in cell biology* 56: 71–79.
- Barbazan J, Pérez-González C, Gómez-González M, Dedenon M, Richon S, Latorre E, Serra M, Mariani P, Descroix S, Sens P, Trepát X, Vignjevic DM. 2021. Cancer-associated fibroblasts actively compress cancer cells and modulate mechanotransduction. *BioRxiv*.
- Corps AN, Sowter HM, Smith SK. 1997. Hepatocyte growth factor stimulates motility, chemotaxis and mitogenesis in ovarian carcinoma cells expressing high levels of c-met. *International journal of cancer* 73: 151–155.
- Czekay RP, Loskutoff DJ. 2004. Unexpected role of plasminogen activator inhibitor 1 in cell adhesion and detachment. *Experimental biology and medicine* 229: 1090–1096.
- Eisenhauer EA. 2017. Real-world evidence in the treatment of ovarian cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 28: viii61–viii65.
- Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, Tropé CG, Kvalheim G, Goldberg I, Reich R, Davidson B. 2005. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 103: 1631–1643.
- Faleiro-Rodrigues C, Macedo-Pinto I, Pereira D, Lopes CS. 2004. Prognostic value of E-cadherin immunoexpression in patients with primary ovarian carcinomas. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 15: 1535–1542.
- Fidler IJ. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews. Cancer* 3: 453–458.
- Fucikova J, Coosemans A, Orsulic S, Cibula D, Vergote I, Galluzzi L, Spisek R. 2021. Immunological configuration of ovarian carcinoma: features and impact on disease outcome. *Journal for immunotherapy of cancer* 9.
- Glentis A, Oertle P, Mariani P, Chikina A, El Marjou F, Attieh Y, Zaccarini F, Lae M, Loew D, Dingli F, Sirven P, Schoumacher M, Gurchenkov BG, Plodinec M, Vignjevic DM. 2017. Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane. *Nature communications* 8: 924–937.

- Han Q, Huang B, Huang Z, Cai J, Gong L, Zhang Y, Jiang J, Dong W, Wang Z. 2019. Tumor cell-fibroblast heterotypic aggregates in malignant ascites of patients with ovarian cancer. *International journal of molecular medicine* 44: 2245–2255.
- Huang H, Li YJ, Lan CY, Huang QD, Feng YL, Huang YW, Liu JH. 2013. Clinical significance of ascites in epithelial ovarian cancer. *Neoplasma* 60: 546–552.
- Huang Y, Schell C, Huber TB, Şimşek AN, Hersch N, Merkel R, Gompper G, Sabass B. 2019. Traction force microscopy with optimized regularization and automated Bayesian parameter selection for comparing cells. *Scientific reports* 9: 539–555
- Jiang Y, Wang C, Zhou S. 2020. Targeting tumor microenvironment in ovarian cancer: Premise and promise. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer* 1873: 188361.
- Joo YE, Rew JS, Park CS, Kim SJ. 2002. Expression of E-cadherin, alpha- and beta-catenins in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology* 2: 129–137.
- Joyce JA, Pollard JW. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews. Cancer* 9: 239–252.
- Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119: 1420–1428.
- Kalluri R. 2016. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature reviews. Cancer* 16: 582–598.
- Kipps E, Tan DS, Kaye SB. 2013. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nature reviews. Cancer* 13: 273–282.
- Lengyel E. 2010. Ovarian cancer development and metastasis. *The American journal of pathology* 177: 1053–1064.
- Lisio MA, Fu L, Goyeneche A, Gao ZH, Telleria C. 2019. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *International journal of molecular sciences* 20: 952–985.
- Mei S, Chen X, Wang K, Chen Y. 2023. Tumor microenvironment in ovarian cancer peritoneal metastasis. *Cancer cell international* 23: 11–24.
- Pankov R, Momchilova A, Stefanova N, Yamada KM. 2019. Characterization of stitch adhesions: Fibronectin-containing cell-cell contacts formed by fibroblasts. *Experimental cell research* 384: 111616–111644.
- Patel IS, Madan P, Getsios S, Bertrand MA, MacCalman CD. 2003. Cadherin switching in ovarian cancer progression. *International journal of cancer* 106: 172–177.
- Ritch SJ, Telleria CM. 2022. The Transcoelomic Ecosystem and Epithelial Ovarian Cancer Dissemination. *Frontiers in endocrinology* 13: 886533–886552.
- Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, Fearon D, Greten FR, Hingorani SR, Hunter T, Hynes RO, Jain RK, Janowitz T, Jorgensen C, Kimmelman AC, Kolonin MG, Maki RG, Powers RS, Puré E, Ramirez DC, Scherz-Shouval R, Sherman MH, Stewart S, Tlsty TD, Tuveson DA, Watt FM, Weaver V, Weeraratna AT, Werb Z. 2020. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nature reviews. Cancer* 20: 174–186.
- Sawada K, Mitra AK, Radjabi AR, Bhaskar V, Kistner EO, Tretiakova M, Jagadeeswaran S, Montag A, Becker A, Kenny HA, Peter ME, Ramakrishnan V, Yamada SD, Lengyel E. 2008. Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target. *Cancer research* 68: 2329–2339.
- Schoutrop E, Moyano-Galceran L, Lheureux S, Mattsson J, Lehti K, Dahlstrand H, Magalhaes I. 2022. Molecular, cellular and systemic aspects of epithelial ovarian cancer and its tumor microenvironment. *Seminars in cancer biology* 86: 207–223.
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. 2022. *Cancer statistics, 2022*. CA: a cancer journal for clinicians 72: 7–33.
- Staneva R, El Marjou F, Barbazan J, Krndija D, Richon S, Clark AG, Vignjevic DM. 2019. Cancer cells in the tumor core exhibit spatially coordinated migration patterns. *Journal of cell science* 132.
- Tan DS, Agarwal R, Kaye SB. 2006. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *The Lancet. Oncology* 7: 925–934.

- Thomakos N, Diakosavvas M, Machairiotis N, Fasoulakis Z, Zarogoulidis P, Rodolakis A. 2019. Rare Distant Metastatic Disease of Ovarian and Peritoneal Carcinomatosis: A Review of the Literature. *Cancers* 11: 1044-1061
- van Baal JOAM, van Noorden CJF, Nieuwland R, Van de Vijver KK, Sturk A, van Driel WJ, Kenter GG, Lok CAR. 2018. Development of Peritoneal Carcinomatosis in Epithelial Ovarian Cancer: A Review. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 66: 67-83.
- Yokoi A, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda SI, Kato T, Kiyono T, Takeshita F, Kajiyama H, Kikkawa F, Ochiya T. 2017. Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. *Nature communications* 8: 14470-14485.