

UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA



TESIS DOCTORAL

EFECTO ANTITUMORAL DEL SELENITO SÓDICO SOLO Y EN COMBINACIÓN CON GEMCITABINA EN CÁNCER DE PÁNCREAS: ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Memoria presentada por **D. Kevin Doello González** para optar
al grado de Doctor por la Universidad de Granada

Directores de tesis:

José Carlos Prados Salazar

Raúl Ortiz Quesada

Granada, 15 de diciembre de 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Kevin Doello González
ISBN: 978-84-1117-263-9
URI: <http://hdl.handle.net/10481/73959>

El doctorando, **Kevin Doello González** y los directores de la tesis, Jose Carlos Prados Salazar y Raúl Ortiz Quesada al firmar esta tesis doctoral, declaran que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 15 de diciembre de 2021

Directores de la tesis

Fdo. Jose Carlos Prados Salazar

Fdo. Raúl Ortiz Quesada

Doctorando

Fdo. Kevin Doello González

Dr. Jose Carlos Prados Salazar,

CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

Hace constar:

Que D. Kevin Doello González ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: “EFECTO ANTITUMORAL DEL SELENITO SÓDICO SOLO Y EN COMBINACIÓN CON GEMCITABINA EN CÁNCER DE PÁNCREAS: ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*”.

Una vez redactada la presente memoria que ha sido revisada por mí y se corresponde fielmente con los resultados obtenidos, la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 1 de septiembre de 2021.

Fdo: Dr. Jose Carlos Prados Salazar

Catedrático de Universidad

Dr. Raúl Ortiz Quesada,

PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

Hace constar:

Que D. Kevin Doello González ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: “EFECTO ANTITUMORAL DEL SELENITO SÓDICO SOLO Y EN COMBINACIÓN CON GEMCITABINA EN CÁNCER DE PÁNCREAS: ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*”.

Una vez redactada la presente memoria que ha sido revisada por mí y se corresponde fielmente con los resultados obtenidos, la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 1 de septiembre de 2021.

Fdo: Dr. Raúl Ortiz Quesada

Profesor Titular de Universidad

Agradecimientos

Realizar una tesis doctoral y cualquier trabajo de investigación no es sencillo. Existen una gran cantidad de dificultades de diferente tipo como económicas, burocráticas, laborales, epidemiológicas, humanas que se sobreañaden como jarros de agua fría a la sacrificada labor del científico. La investigación biomédica no es un proceso que pueda realizarse en solitario. De forma tanto directa como indirecta intervienen multitud de personas que, a mi juicio, merecen ser reconocidas no sólo por su labor investigadora sino también por su apoyo a nivel académico, laboral y personal.

Primero quería destacar a mis padres José Antonio y Mónica quienes desde que era pequeño me apoyaron y me continúan apoyando incondicionalmente en todos los objetivos y metas que me propongo y que han velado siempre porque tuviera los medios para conseguirlos incluso en los momentos más difíciles. Dedicar estas palabras y esta tesis doctoral también a mis hermanos Óscar y Mónica quienes me han acompañado y apoyado durante todos estos años.

Si a alguien quiero dedicar esta tesis doctoral es a mi Cristina a la que quiero con todo mi corazón. Cualquier palabra que pueda decir de ella es insuficiente para agradecer su apoyo e inestimable ayuda, a nivel

investigador y personal. Mis palabras se quedan cortas en describir el aprecio y el cariño que tengo hacia ella. Sin duda alguna ha supuesto un punto de inflexión muy importante en mi vida desde que la conocí.

Al profesor José Carlos Prados, profesor, mentor y amigo. He recibido de él la base y la sabiduría tanto científica (Anatomía y Biomedicina) como humana para ser un buen médico e investigador desde que pisé por primera vez la Facultad de Medicina de Granada. Aún recuerdo sus clases de Anatomía tanto teóricas como prácticas en la sala de disección y su capacidad de inspiración. Agradecerle el inmenso apoyo recibido estos años desde que me permitió incorporarme en el grupo de investigación hasta ahora con la realización de la tesis doctoral y sus sabios consejos.

A la profesora Consolación Melguizo por su inestimable apoyo y dedicación desde que me incorporé al grupo de investigación y en la realización de la tesis doctoral. Agradecerle a Conso y a José Carlos todos los desvelos y festivos que han tenido que trabajar para que este y todos los proyectos pudieran salir adelante. Gracias.

Si alguien merece un lugar destacado en estos agradecimientos es el profesor Raúl Ortiz. El que este trabajo de investigación haya llegado a buen puerto es en gran parte gracias a él. Darle las gracias por su

dedicación, su inmenso apoyo y buen talante investigador, su capacidad para buscar soluciones a los problemas que iban surgiendo durante el desarrollo de las experiencias. Ha sido una enorme suerte y privilegio para mí poder toparme con su profunda sabiduría en investigación biomédica y en gran parte gracias a ello se han obtenido estos buenos resultados. La publicación del artículo pareció los doce trabajos de Hércules (él sabe a qué me refiero).

A todos los compañeros de aventuras de este apasionante camino. A todos los compañeros del grupo de investigación: Gloria Perazzoli, Laura Cabeza, Cristina Mesas, Francisco Quiñonero (Frank), Marco Fuel (Mark), Beatriz García Pinel (Beyta), Merche, Ana, Cristina... y a los profesores del Departamento de Anatomía que no he nombrado todavía, Celia, Octavio, Ana Rosa... También dedicarla a los compañeros de investigación del grupo de extractos naturales con quien tenemos una relación inmejorable, el profesor Jesús Porres, Rosario Martínez (Chari) y su marido Luismi, Ana Guzmán y Alejandro.

Y a mis compañeros de trabajo. Si ha habido un lugar con relaciones intensas y momentos complicados sobre todo por nuestra actividad asistencial y la pandemia por Covid es el Hospital Virgen de las Nieves y el Servicio de Oncología Médica donde tengo la suerte de poder trabajar. Si algo me ha hecho crecer como persona y médico ha sido trabajar con

ellos. Hemos pasado muy buenos momentos pero también algunos muy malos. Somos compañeros de trinchera pero si algo demostramos es que al final se encuentran soluciones y lo malo pasa. Agradecer estos magníficos años de tesis a mis compañeros del Servicio de Oncología Médica: a mi jefe Juan Ramón Delgado, Javier Valdivia, Víctor Amezcua, Javier García, Vero, Encarna, Cristina Alba, Lucía Castillo, Lucía Ochoa, Julia, Joaqui, Raquel y a los que fueron mis compañeros de residencia (Rafa, María, Amelia...).

Como dije al principio hay personas de forma directa como indirecta que posibilitan el desarrollo de trabajos de investigación y tesis como la presente. Agradecer a mi maestro de la escuela Don Rafael su dedicación y sabiduría estimulante; a Juan Valentín Fernández de la Gala, profesor de Biología de Instituto y paleopatólogo quien potenció en mí la inspiración por las Ciencias Biológicas y con el que estaré eternamente agradecido. Agradecer al Ministerio de Educación y a la Universidad de Granada las becas recibidas para poder cursar mis estudios. También mencionar a la Compañía de Jesús, a las misioneras del Santo Sacramento y al padre José Villena por su acogida y alojamiento durante mis años de estudiante universitario. Agradecer también a Fernando de Teresa la preparación MIR recibida que me permitió realizar la especialidad deseada y en el lugar que quería.

ÍNDICE

Índice

RESUMEN	1
SUMMARY.....	26
1. INTRODUCCIÓN	32
1. 1. Cáncer. Generalidades y características del cáncer	34

1. 2. Cáncer de Páncreas	38
1. 2. 1. Epidemiología del cáncer. Cáncer de Páncreas	38
1.2.2. Cáncer pancreático. Histopatología.	43
1.2.3. Biología molecular del adenocarcinoma ductal pancreático	47
1.2.4. Factores de riesgo del adenocarcinoma ductal pancreático	49
1.2.5. Estadía de del adenocarcinoma ductal pancreático.....	52
1.2.6. Manifestación clínica y diagnóstico del adenocarcinoma ductal pancreático.....	56
1.2.7. Tratamientos del adenocarcinoma ductal pancreático	
57	
1.2.8. Nuevos tratamientos del adenocarcinoma ductal pancreático	60
1.3. Selenito sódico	60
1.3.1 Estructura y propiedades químicas	61
1.3.2 Actividad biológica y toxicidad	62
1.3.3 Actividad antitumoral y mecanismos de acción. Efecto sobre el sistema de detoxificación de ROS.....	64
1.3.4 Selectividad por los tejidos y células tumorales	66
1.3.5 Otros compuestos de selenio con actividad antitumoral	

2.	OBJETIVOS	70
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	75
3.1.	Cultivos celulares	77
3.2.	Fármacos y compuestos químicos.	78
3.3.	Análisis de viabilidad celular	79
3.4.	Estudios de ciclo celular	81
3.5.	Análisis de potencial de membrana mitocondrial	85
3.6.	Ensayos de inhibición de PARP	85
3.7.	Ensayos de Inmunofluorescencia para valorar el factor inductor de apoptosis (AIF).....	86
3.8.	Ensayos de Western-Blot para la determinación de la forma fosforilada de p38.	88
3.9.	Ensayos de cierre de la herida (migración).....	90
3.10.	Ensayos con esferoides tumorales multicelulares.....	91
3.11.	Ensayos de formación de colonias	92
3.12.	Formación de esferoides de CSCs.....	93
3.13.	Ensayos de angiogénesis	93
3.14.	Análisis de crecimiento tumoral <i>in vivo</i>.....	95
3.15.	Bioimagen	97
3.16.	Análisis histológico	98
3.17.	Análisis estadístico	99

4. RESULTADOS	102
4.1. El selenito sódico reduce la viabilidad de las células de cáncer pancreático	104
4.2 El selenito sódico interacciona con la GMZ para mejorar el efecto <i>in vitro</i> del tratamiento combinado.....	107
4.3. Efectos del selenito sódico en el ciclo celular y el potencial de membrana mitocondrial.....	108
4.4. Análisis de los mecanismos moleculares implicados en la muerte celular inducida por selenito sódico y en la sinergia con gemcitabina	111
4.5. El selenito sódico disminuye la migración y la formación de colonias de las células de cáncer pancreático.....	115
4.6. El selenito sódico disminuye la angiogénesis tumoral <i>in vitro</i> 119	
4.7. El selenito sódico inhibe el crecimiento de los esferoides multicelulares de cáncer de páncreas.....	121
4.8. El selenito sódico disminuye la formación de esferas de CSCs.....	125
4.9. El selenito sódico inhibe el crecimiento <i>in vivo</i> de tumores pancreáticos generados en animales de experimentación y mejora la supervivencia de los mismos	127

4.10. El tratamiento con el selenito incrementa la muerte celular y reduce marcadores tumorales en los tejidos tumorales <i>in vivo</i>	133
5. DISCUSIÓN	139
6. CONCLUSIONES	157
7. BIBLIOGRAFÍA	163

RESUMEN

El cáncer de páncreas y, sobre todo, el adenocarcinoma pancreático es uno de los más mortíferos que existen con una supervivencia a los 5 años de menos del 5% en estadios avanzados (III y IV). Este hecho se debe en gran mayoría a retraso en su diagnóstico y a su gran agresividad y quimiorresistencia.

El selenito sódico es una oxo-sal inorgánica fuente de selenio. Se trata de un compuesto tóxico para el ser humano a dosis elevadas pero con un rango terapéutico que permite su utilización como antitumoral en diversos tumores sólidos como demuestran diversas investigaciones realizadas en los últimos años. El daño celular ocasionado por el selenito sódico se atribuye a su capacidad para deplecionar el glutatión reducido y la tiorredoxina reducida y, por tanto, con la desprotección celular frente a las especies reactivas de oxígeno lo que activa mecanismos de muerte celular por daño sobre las proteínas y ácidos nucleicos celulares. Este poder antitumoral se ha descrito como selectivo con las células tumorales y sobre todo con aquellas que expresan mecanismos de resistencia a agentes quimioterápicos.

Dado que no existen estudios con selenito sódico en células y tumores pancreáticos y teniendo en cuenta la quimiorresistencia, pronóstico ominoso y eficacia limitada de los tratamientos sistémicos, el objetivo de la presente tesis doctoral es testar el selenito sódico sólo y en combinación con quimioterapia (gemcitabina) en cáncer de páncreas *in vitro* e *in vivo*.

Para ello se llevaron a cabo estudios *in vitro*: de proliferación celular y citotoxicidad con sulforrodamina B con las líneas celulares

PANC-1 (humana) y Pano2 (murina), estudios de ciclo celular con yoduro de propidio y DIIc1, ensayos de inmunofluorescencia para la translocación de AIF e inhibición con benzamida (B, estudios de Western-Blott para detectar fosfo-p38, ensayos de colonias y migración celular, estudios de formación de esferos de CSCs, estudios sobre esferoides tumorales multicelulares (MTS) y ensayos de angiogénesis tumoral. Por otro lado, se desarrollaron estudios *in vivo* con animales de experimentación (ratones albinos) a los que se inocularon tumores subcutáneos con la línea Pano2 y se trataron durante 10 ciclos de tratamiento con selenito, gemcitabina y combinación de ambos. Se llevaron a cabo estudios de volumen tumoral, crecimiento tumoral, actividad metabólica tumoral, supervivencia e histología tumoral con técnicas histológicas básicas e inmunofluorescencia.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la potente capacidad antitumoral *in vitro* del selenito sódico solo y sinérgica en combinación con gemcitabina. Estos estudios mostraron asimismo que la actividad antitumoral del selenito no ocasiona paradas destacables en el ciclo celular y sí afecta a la despolarización mitocondrial. Al analizar el mecanismo de muerte celular pudo comprobarse que es dependiente de la activación de la enzima reparadora PARP y de la traslocación nuclear del factor mitocondrial AIF. Por otro lado, pudo comprobarse

que la sinergia entre el selenito y la gemcitabina se encuentra relacionado con que el selenito es capaz de activar el factor p38 que se encuentra íntimamente relacionado con la muerte celular tumoral ocasionada por la gemcitabina. Al analizar parámetros de agresividad tumoral pudo comprobarse como el selenito tanto solo como en combinación con la gemcitabina es capaz de disminuir la migración celular tumoral, la formación de colonias, la formación de esferos de CSCs, el crecimiento de los MTS y la angiogénesis tumoral.

Todos estos hechos quedaron demostrados con los estudios con animales de experimentación donde se comprobó que el selenito tanto solo como en combinación con gemcitabina, en este último caso, de forma más acentuada, inhibe el crecimiento tumoral, la actividad tumoral, incrementa la supervivencia de los ratones y además disminuye *in vivo* los parámetros de agresividad tumoral como marcadores proliferativos, de invasividad y angiogénesis.

Es por ello, que el selenito sódico tanto solo como en combinación con gencitabina posee una prometedora actividad antitumoral contra el cáncer de páncreas tanto *in vitro* como *in vivo* con animales de experimentación, justificándose por ello la realización de ensayos clínicos en humanos de cara a confirmar estos hallazgos.

SUMMARY

Pancreatic cancer and, above all, pancreatic adenocarcinoma is one of the deadliest with a 5-year survival of less than 5% in advanced stages (III and IV). This fact is largely due to a delay in its diagnosis and its great aggressiveness and chemoresistance.

Sodium selenite is an inorganic oxo-salt source of selenium. It is a compound toxic to humans at high doses but with a therapeutic range

that allows its use as an antitumor in various solid tumors, as shown by various investigations carried out in recent years. The cellular damage caused by sodium selenite is attributed to its ability to deplete reduced glutathione and reduced thioredoxin and, therefore, with the cellular deprotection against reactive oxygen species, which activates mechanisms of cell death due to protein damage. and cellular nucleic acids. This antitumor power has been described as selective with tumor cells and especially with those that express resistance mechanisms to chemotherapeutic agents.

Given that there are no studies with sodium selenite in pancreatic cells and tumors and taking into account the chemoresistance, ominous prognosis and limited efficacy of systemic treatments, the objective of this doctoral thesis is to test sodium selenite alone and in combination with chemotherapy (gemcitabine) in pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo*.

For this, *in vitro* studies were carried out: cell proliferation and cytotoxicity with sulforhodamine B with the PANC-1 (human) and Pano2 (murine) cell lines, cell cycle studies with propidium iodide and DiIC₁, immunofluorescence assays for AIF translocation and inhibition with benzamide, Western-Blott studies to detect phospho-p38, colony

and cell migration assays, CSC spherical formation studies, multicellular tumor spheroids (MTS) studies, and tumor angiogenesis assays. On the other hand, *in vivo* studies were carried out with experimental animals (albino mice) which were inoculated with subcutaneous tumors with the Pano2 line and were treated for 10 treatment cycles with selenite, gemcitabine and a combination of both. Tumor volume, tumor growth, tumor metabolic activity, survival and tumor histology studies were carried out with basic histological techniques and immunofluorescence.

The results obtained showed the potent *in vitro* antitumor capacity of sodium selenite alone and synergistically in combination with gemcitabine. These studies also showed that selenite's antitumor activity does not cause notable cell cycle stops and does affect mitochondrial depolarization. When analyzing the mechanism of cell death, it was found that it is dependent on the activation of the repairing enzyme PARP and the nuclear translocation of the mitochondrial factor AIF. On the other hand, it was found that the synergy between selenite and gemcitabine is related to the fact that selenite is capable of activating factor p38, which is closely related to tumor cell death caused by gemcitabine. When analyzing tumor aggressiveness parameters, it was possible to verify how selenite both alone and in combination with gemcitabine is capable of reducing tumor cell migration, colony

formation, CSC spherical formation, MTS growth and tumor angiogenesis.

All these facts were demonstrated with studies with experimental animals where it was found that selenite both alone and in combination with gemcitabine, in the latter case, in a more accentuated way, inhibits tumor growth, tumor activity, increases survival of the mice and also decreases *in vivo* tumor aggressiveness parameters such as proliferative markers, invasiveness and angiogenesis.

That is why sodium selenite both alone and in combination with gemcitabine has promising antitumor activity against pancreatic cancer both *in vitro* and *in vivo* with experimental animals, thus justifying the performance of clinical trials in humans in order to confirm these findings.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Cáncer. Generalidades y características del cáncer

El cáncer consiste un conjunto de enfermedades que se caracterizan por presentar diversas alteraciones a nivel celular y molecular que provocan un exceso de proliferación y supervivencia de las células malignas (American Cancer Society, 2021).

La apoptosis o muerte celular programada consiste en una serie de procesos moleculares que lesionan, destruyen y eliminan células alteradas o envejecidas con el objetivo de mantener la celularidad habitual de los tejidos. Cuando este proceso se ve alterado, por causas moleculares o genéticas, las células proliferan de forma descontrolada dando lugar a tumoraciones benignas que pueden desembocar en una transformación maligna (carcinogénesis) (Peters y González, 2018; Zhang y Weinberg, 2018).

Los tumores, además de presentar una proliferación celular desmedida, establecen un microambiente tumoral donde se producen interacciones celulares que promueven su crecimiento, supervivencia, agresividad y quimiorresistencia. Este microambiente se encuentra compuesto por células tumorales, estroma tumoral, vasos sanguíneos, células inflamatorias y otras células asociadas (Arneth, 2019; Wu y Dai, 2017). Este microambiente le proporciona al tumor la capacidad para

evadir al sistema inmune (Whiteside, 2008) habiéndose incluso propuesto que la pérdida de la inmunovigilancia tumoral es uno de los pasos necesarios en la aparición de los tumores malignos (Binnewies y cols., 2018). Las células tumorales secretan factores como citoquinas o quimiocinas que son capaces de reprogramar las células estromales inmunes pertenecientes a la respuesta inmune innata (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células linfoides innatas, células supresoras derivadas de mieloides y células *natural killer*) y a la respuesta inmune adaptativa (células T y células B). Estas células podrían establecer una comunicación intercelular con las células tumorales que favorecería su agresividad (Hinshaw y Shevde, 2019).

Por otra parte, las células tumorales son capaces de influir sobre su propio microambiente para favorecer la formación de nuevos vasos (angiogénesis) y mejorar la irrigación y el aporte nutricional al tumor. El equilibrio existente entre moléculas anti- y pro-angiogénicas, que regulan este proceso en tejidos no tumorales, se encuentra inclinado hacia el lado de la angiogénesis en el tumor y su microambiente, donde se secretan gran cantidad de factores pro-angiogénicos. (Viallard y Larrivé, 2017) provocando una neo-vascularización desorganizada y bizarra. Entre estos factores destacan el VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), el factor de crecimiento derivado de plaquetas

(PDGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) (Li y cols., 2018; Zanutelli y Reinhart-King, 2018).

Dentro de las poblaciones celulares heterogéneas que componen un tumor, destacan las células madre tumorales (CSCs) que son responsables de la autorrenovación de la población celular, de la recurrencia tumoral y de la generación de metástasis. Estas células poseen marcadores de superficie propios como ALDH, CD44, CD24 o CD133 y se caracterizan por ser resistentes a los tratamientos habituales de quimioterapia y radioterapia. Actualmente gran parte de los esfuerzos en investigación oncológica se focalizan en buscar métodos que inhiban o destruyan estas poblaciones celulares (Barbato y cols., 2019; Nassar y Blanpain, 2016; Yu y cols., 2012) (Figura 1).

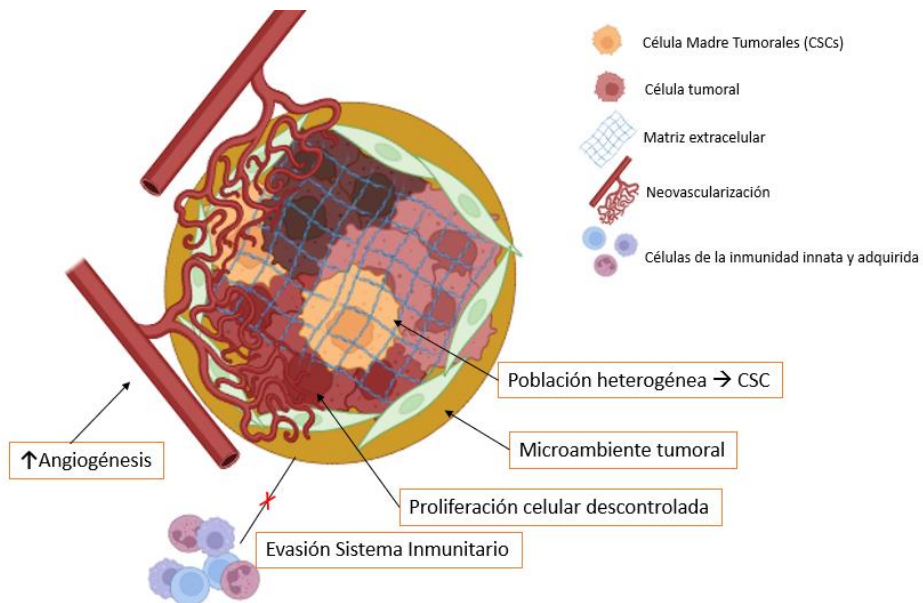


Figura 1. Representación gráfica de las principales características tumorales: proliferación celular desmedida, incremento de la angiogénesis, población celular heterogénea con presencia de CSCs, presencia de un microambiente tumoral y evasión inmune. Figura generada con BioRender.

Hanahan y Weinberg (2011) resumieron de forma muy acertada los conocidos como “hallmarks of cáncer” o características de una célula o tejido tumoral que incluyen la proliferación desmedida, la inactivación de supresores tumorales, la inactivación de la apoptosis celular, la disregulación energética, la inmortalidad celular, la hipermutación e inestabilidad genómica, la angiogénesis, la migración e invasividad celular, la evasión del sistema inmune y las CSCs (Figura 2).

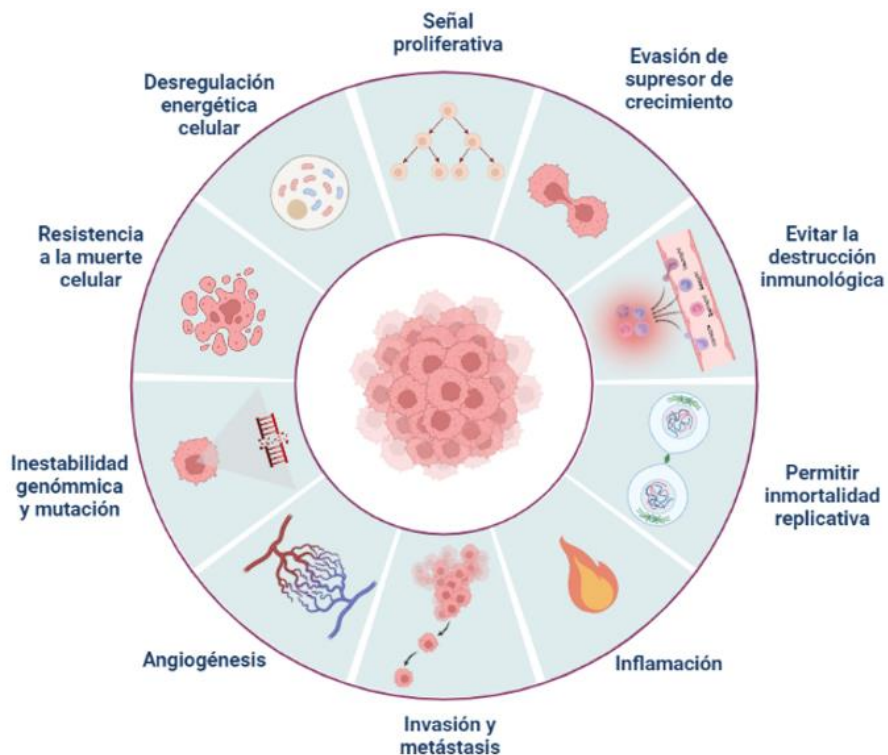


Figura 2. Resumen de los principales “*hallmarks of cáncer*”. Figura generada con BioRender.

1. 2. Cáncer de Páncreas

1. 2. 1. Epidemiología del cáncer. Cáncer de Páncreas

El cáncer constituye una de las principales causas de morbi-mortalidad del mundo. En 2020 se detectaron unos 19 millones de casos nuevos de cáncer a nivel mundial, estimándose unos 30 millones de casos anuales para el año 2040 (Cancer today, 2021). Entre los tumores

más frecuentemente diagnosticados en el año 2020 se encuentran los de mama (primera posición), pulmón, colon y recto, próstata y estómago, (Siegel y cols., 2020). En España, la incidencia de esta patología es también muy elevada, estimándose para el año 2021 el diagnóstico de 276.239 casos (REDECAN, 2021), siendo los de colon y recto, próstata, mama, pulmón, los más frecuentes si tenemos en cuenta ambos sexos (Figura 3).

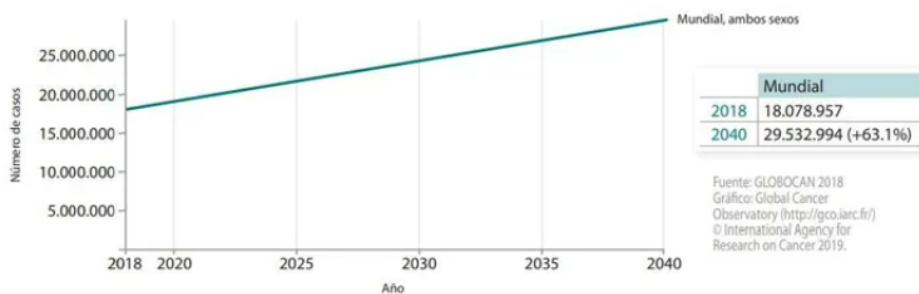


Figura 3. Número estimado de casos de cáncer a nivel mundial en 2020 y 2040. Adaptado de Cancer Today, 2018 (gco.iarc.fr/today).

Por otra parte, y a pesar de los avances en investigación básica y clínica, el cáncer sigue siendo una de las primeras causas de muerte a nivel mundial. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer fue la segunda causa de fallecimiento a nivel mundial

con más de 8 millones de defunciones en 2017 (Cancer Today, 2021) (Figura 4).

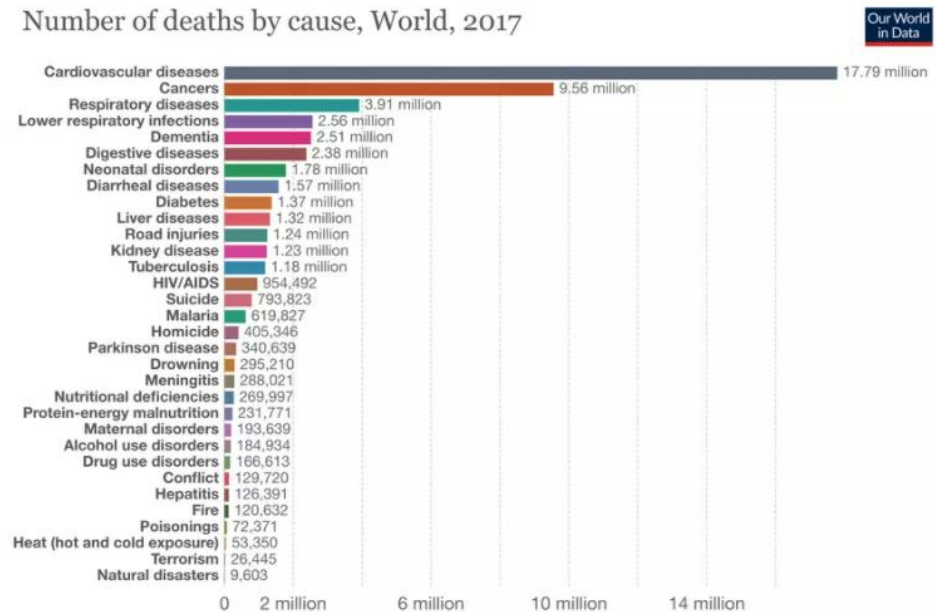


Figura 4. Principales causas de muerte a nivel mundial en 2017. Our World in data (database). Tomado de Cancer Today, 2017 (gco.iarc.fr/today)

Según los datos de la OMS en 2020, los 5 cáncer con mayor mortalidad son el cáncer de pulmón (1,79 millones), seguido del cáncer colorrectal (935.173), cáncer hepático (830.180), cáncer gástrico (768.793) y cáncer de mama (684.996) (Cancer Today, 2021) (Figura 5).

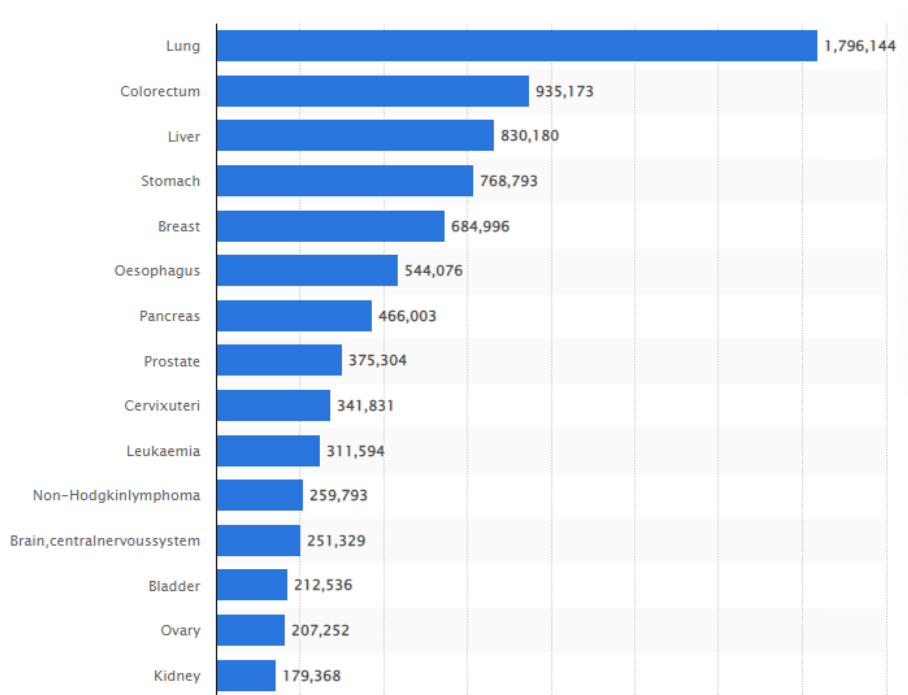


Figura 5. Número estimado de fallecimientos a nivel mundial por tipo tumoral. Tomado de Statista, 2020 ([statista.com/statistics/288580/number-of-cancer-deaths-worldwide-by-type](https://www.statista.com/statistics/288580/number-of-cancer-deaths-worldwide-by-type)).

En este contexto, el **cáncer de páncreas** no es uno de los cánceres más frecuentes a nivel mundial (noveno según datos de la OMS) pero sí uno de los que causan mayor mortalidad, situándose en cuarto lugar tanto en hombres como mujeres. Unas 57000 personas son diagnosticadas al año en el mundo de cáncer de páncreas, de las que fallecen unas 47000. En España, el número de casos nuevos cada año

ronda los 4000 (*American Cancer Society/Information and Resources about for Cancer, 2021*) (Figura 6).

La elevada mortalidad de cáncer de páncreas se encuentra relacionado con la dificultad diagnóstica que plantea en fases precoces, ya que las $\frac{3}{4}$ partes de los casos se diagnostican es estadios irresecables o metastásicos. Asimismo, este tipo tumoral se caracteriza por ser resistente a los tratamientos habituales en fases avanzadas (quimioterapia). De hecho, la terapia en cáncer de páncreas no ha cambiado sustancialmente en los últimos 20 años. Todo ello se relaciona con una supervivencia a 5 años que apenas alcanza el 5% (Malvezzi y cols., 2014).

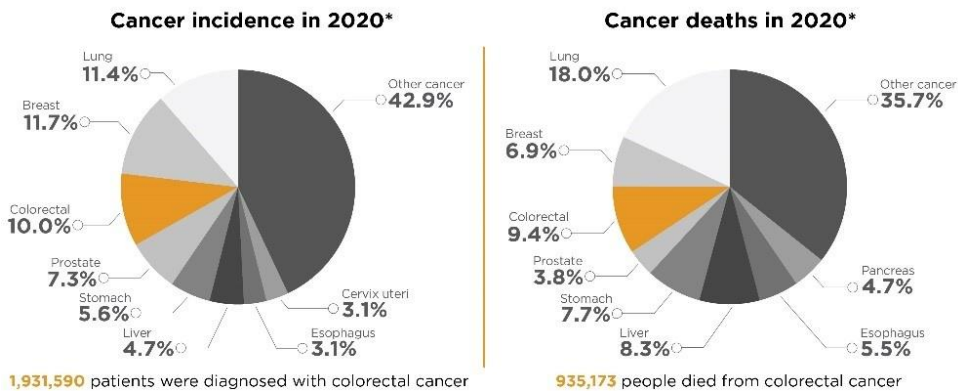


Figura 6. Representación gráfica de la incidencia y mortalidad del cáncer de páncreas a nivel mundial (año 2020). A) Número de muertes por tipo

de tumor en 2020. B) Número de nuevos casos en diferentes tipos de tumores en el año 2020. Tomado de Cancer Today, 2020 (gco.iarc.fr/today).

1.2.2. Cáncer pancreático. Histopatología.

El cáncer pancreático comprende diversos tipos histológicos con pronósticos muy dispares. Los tumores pancreáticos pueden dividirse en exocrinos y endocrinos. Los tumores pancreáticos endocrinos se derivan del tejido de los islotes de Langerhans y comprenden los subtipos histológicos correspondientes a insulinoma, el glucagonoma, el VIPoma, el tumor carcinoide y los tumores neuroendocrinos de alto grado. Exceptuando este último grupo, estos tumores presentan buen pronóstico y una supervivencia global superior al 90% a los 5 años.

Por el otro lado, los tumores exocrinos se dividen en los grupos, el adenocarcinoma ductal pancreático (PADC) y el adenocarcinoma acinar pancreático. El primero es un tumor pancreático derivado de las células de los ductos de secreción exocrina del páncreas y presenta una gran agresividad y pronóstico ominoso incluso en estadios precoces. El segundo, que deriva de las células de los acinos glandulares de secreción enzimática exocrina del páncreas, representa el 10% de los tumores pancreáticos y presenta unas cifras de supervivencia y un pronóstico

algo mejor que el PADC. Otros subtipos más extraños comprenden el adenocarcinoma coloide y el medular. Asimismo, existen tumores de estirpe mucinosa con mejor pronóstico (coloides) entre los que se encontrarían la neoplásia mucinosa intraductal o el cistoadenoma pancreático (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los tumores pancreáticos exocrinos y endocrinos de la Organización Mundial de la Salud (WHO). Modificado de WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 2010 (pathologyoutlines.com/topic/pancreaswho.html).

Tumores epiteliales
Benignos
Cistoadenoma de células acinares Cistoadenoma seroso
Lesiones premalignas
Neoplasia intraepitelial pancreática, grado 3 (PanIN-3) Neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN) con grado de displasia bajo o intermedio Neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN) con alto grado de displasia Neoplasia tubulopapilar intraductal (ITPN) Neoplasia quística mucinosa (MCN) con grado de displasia bajo o intermedio Neoplasia quística mucinosa (MCN) con alto grado de displasia
Malignos
Adenocarcinoma ductal <i>Carcinoma adenoescamoso</i> <i>Adenocarcinoma mucinoso</i> <i>Carcinoma hepatoide</i> <i>Carcinoma medular</i> <i>Carcinoma de células en anillo de sello</i> <i>Carcinoma indiferenciado</i> <i>Carcinoma indiferenciado con células tipo osteoclastos</i>
Carcinoma de células acinares Cistoadenocarcinoma de células acinares Carcinoma mucinoso papilar intraductal (IPMN) con un carcinoma invasivo asociado Carcinoma ductal-acinar mixto Carcinoma acinar-neuroendocrino mixto Carcinoma acinar-neuroendocrino-ductal mixto Carcinoma ductal-neuroendocrino mixto Neoplasia quística mucinosa (MCN) con un carcinoma invasivo asociado Pancreatoblastoma Cistoadenocarcinoma seroso Neoplasia sólida pseudopapilar
Neoplasias neuroendocrinas
Microadenoma neuroendocrino pancreático Tumor neuroendocrino de grado 1 (NET G1) Tumor neuroendocrino de grado 2 (NET G2) Carcinoma neuroendocrino <i>Carcinoma neuroendocrino de células grandes</i> <i>Carcinoma neuroendocrino de células pequeñas</i>
Tumor neuroendocrino (NET) de células enterocromafines (EC) (productor de serotonina) Gastrinoma maligno Glucagonoma maligno Carcinoma productor de insulina (insulinoma) Somatostatina maligno Vipoma maligno

Histológicamente, el PDAC destaca por la presencia de una profunda matriz extracelular compuesta fundamentalmente de proteoglicanos destacando el ácido hialurónico y proteínas de unión como la fibronectina. Es de destacar la presencia de islotes celulares de células con morfología de adenocarcinoma que son positivas para citoqueratina 7 y negativos para citoqueratina 20, vimentina, CD45 y S100 (Dudeja & Allen, 2015; Rishi y cols., 2015; Wisnoski y cols., 2008) (Figura 7).

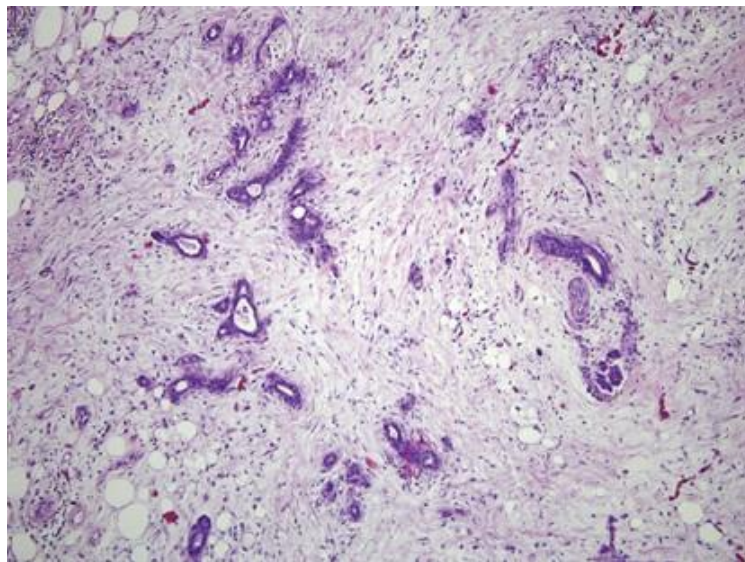


Figura 7. Imagen histológica de hematoxilina-eosina de PDAC. Tomado de Pancreatic adenocarcinoma: update on the surgical pathology of carcinomas of ductal origin and PanINs, Hruban and Fukushima, 2007 (<https://www.nature.com/articles/3800685>).

1.2.3. Biología molecular del adenocarcinoma ductal pancreático

La mayor parte (85%) de los PDAC son esporádicos, quiere decir que no se asocian a mutaciones genéticas en línea germinal que lo relacionen con la iniciación o progresión del cáncer. En ellos, las alteraciones genéticas más frecuentes son la mutación de KRAS (90% de los casos) aunque también se han visto implicados el silenciamiento o mutación del gen supresor INK4 o p16 y las mutaciones en los genes del sistema de reparación de ADN mismatch repair (MMR) como hMLH1 o MSH2. Dentro del 15% restante, se describen multitud de mutaciones entre las que destacan las mutaciones de BRAC2, que se asocia al cáncer de páncreas familiar (5-10% de los casos), STK11, ATM o PALB2. Muchas de ellas son mutaciones en genes relacionados con los mecanismos de reparación de ADN por recombinación homóloga (Blackford y cols., 2009; Chmielecki y cols., 2014; Greenhalf y cols.,

2014; Hidalgo & Maitra, 2009; Klumpen y cols., 2011; Ormanns y cols., 2014; Yachida y cols., 2010).

Como en otros tipos de tumores, aunque han sido menos estudiado, en los PDAC también se describen lesiones precursoras como la neoplasia intraductal pancreática (PIn) o la neoplasia intraductal mucinosa, las cuales tras sufrir diversas alteraciones moleculares acaban desembocando en el desarrollo del tumor (Esposito y cols., 2014; Waddell y cols., 2015) (Figura 8).

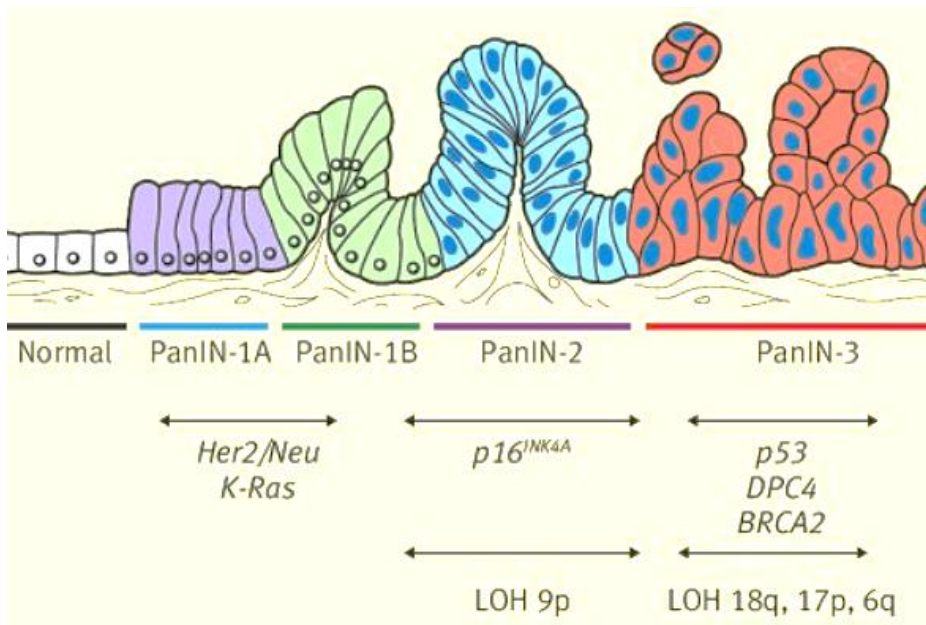


Figura 8. Cambios moleculares relacionados con la progresión de las lesiones malignas en cáncer de páncreas. Tomado de Rosas CA, Medwave 2009 (medwave.cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/Cursos/3988).

1.2.4. Factores de riesgo del adenocarcinoma ductal pancreático

La causa o causas que originan el desarrollo de un PDAC son aún desconocidas, aunque se han determinado diferentes factores de riesgo asociados a esta neoplasia.

Edad y sexo. La probabilidad de padecer PDAC aumenta a partir de los 55 años, siendo la media de edad de los pacientes en el momento de su diagnóstico 66 años (Yu y cols., 2015) Por otra parte, la incidencia de PDAC es ligeramente mayor en hombres que en mujeres aunque la incidencia en estas últimas se ha incrementado probablemente por el aumento en su hábito tabáquico (*American Cancer Society | Information and Resources about for Cancer, 2021*).

Tabaco y alcohol. Alrededor del 25% de los casos de PDAC se deben al consumo de tabaco con un aumento del riesgo de un 75% de los fumadores respecto a los no fumadores (Yadav & Lowenfels, 2013). Por otra parte, la discutida asociación entre alcohol y PDAC sigue sin estar dilucidada. No obstante, el consumo de alcohol se ha relacionado con la pancreatitis y diabetes *mellitus* tipo II, que a su vez se han correlacionado con PDAC (Clinton y cols., 2020; van de Wiel, 2004).

Dieta y obesidad La dieta basada en la ingesta de grasas saturadas, carnes rojas y alimentos procesados, se ha asociado al riesgo de desarrollar la enfermedad. El déficit de frutas y verduras en la dieta también se asocian a PDAC (Larsson & Wolk, 2012; Maisonneuve & Lowenfels, 2015; Nöthlings y cols., 2005; Yeo, 2015),

Además, un índice de masa corporal elevado ($ICM > 30$) parece incidir en una mayor tasa de mortalidad en los enfermos con PDAC (20-40%) (Ducreux y cols., 2015).

Otras patologías. Se estima que los pacientes con pancreatitis crónica tienen 13 veces más riesgo de desarrollar PDAC y que esta enfermedad está relacionada con hasta el 3% de estos tumores. Muchas de estas pancreatitis crónicas se asocian al consumo de alcohol (Raimondi y cols., 2010). Por otra parte, las alteraciones del metabolismo de la

glucosa se han relacionado con un mayor riesgo de padecer PDAC ya que las elevadas concentraciones de insulina en el microambiente de las células ductales pancreáticas podrían contribuir a su transformación maligna. De hecho, varios estudios ya han demostrado que la diabetes *mellitus* tipo II se asocia al desarrollo de PDAC. La asociación con la diabetes tipo 1 presenta una OR de 2 y la tipo 2, una OR de 1.8. (Huxley y cols., 2005). Por último, existen varios síndromes familiares relacionados con un mayor riesgo de desarrollar esta patología (Bartsch y cols., 2012) (Tabla 2).

Tabla 2. Patologías hereditarias y PDAC. *Abreviaturas:* PDAC, adenocarcinoma ductal pancreático; FPG, familiares de primer grado afectados. Modificado de Bartsch y cols. (2012)

Predisposición heredada a PDAC	Gen afectado	Riesgo de PDAC hasta los 70 años (%)
Síndrome de Peutz–Jeghers	<i>LKB1</i>	36
Síndrome de melanoma familiar con lunares atípicos múltiples	<i>CDKN2, CDK4</i>	17
Síndrome de cáncer hereditario de mama y de ovario	<i>BRCA1, BRCA2</i>	3-8
Síndrome de Li–Fraumeni	<i>TP53</i>	<5
Síndrome de Lynch	<i>MLH1, MLH2</i>	<5

Poliposis adenomatosa familiar	<i>APC</i>	<5
Pancreatitis hereditaria	<i>PRSS1, SPINK1</i>	40
Fibrosis quística	<i>CFTR</i>	<5
Cáncer de páncreas familiar	<i>BRCA2, PALB2, ATM</i>	8-12 (2 FPG) 16-38 (> 3FPG)

Infecciones. La exposición a determinados agentes infecciosos como el *Helicobacter pylori*, el virus de la hepatitis B o el virus de inmunodeficiencia humana se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollar PDAC (Ducreux y cols., 2015).

Grupo sanguíneo. Se ha sugerido que el grupo sanguíneo B es el que presenta mayor riesgo, seguido por los grupos A y AB, que muestran un riesgo intermedio (Wolpin y cols., 2009).

Exposición a agentes químicos. Multitud de compuestos químicos también se han relacionado con un riesgo incrementado de PDAC como el clorobenzoílo, níquel y sus compuestos, compuestos de cromo, polvo de sílice o nitrosaminas (Ojajärvi y cols., 2000).

1.2.5. Estadíaaje del adenocarcinoma ductal pancreático

La estadificación del PDAC se realiza con el sistema TNM. En esta clasificación, se emplean los resultados de las pruebas diagnósticas

para describir la localización del cáncer y la posible diseminación ganglionar y si presenta enfermedad metastásica a distancia (Freeman, 2013; NIH, 2011). De esta manera, las siglas TNM junto a una numeración nos proporciona la información necesaria para conocer lo avanzado que se encuentra el tumor (Edge y cols., 2010) (Figura 9):

1. **Tumor (T):** Localización, número de tumores y desarrollo del mismo.
 - TX: Tumor primario no evaluable.
 - T0: Sin evidencia de cáncer en colon o recto.
 - Tis: cáncer in situ.
 - T1: El cáncer está confinado en el páncreas y no mide más de 2 cm (0.8 pulgadas) de ancho (T1).
 - T2: El cáncer está confinado en el páncreas y mide más de 2 cm (0.8 pulgadas) pero no más de 4 cm (1.6 pulgadas) de ancho (T2).
 - T3: El cáncer está confinado en el páncreas y mide más de 4 cm (1.6 pulgadas) de ancho (T3).
 - T4: El cáncer está creciendo fuera del páncreas y en los vasos sanguíneos principales adyacentes (T4).
2. **Nodo (N):** Presencia de diseminación a ganglios linfáticos regionales (cerca del colon y recto), localización y número de afectados.
 - NX: Ganglios linfáticos regionales no evaluables.
 - N0: No invasión de ganglios linfáticos regionales.
 - N1: se ha propagado a no más de 3 ganglios linfáticos adyacentes (N1).

- N2: e ha propagado a 4 o más ganglios linfáticos adyacentes (N2).
3. **Metástasis (M):** Hace referencia a la diseminación del tumor a otras partes del cuerpo, metástasis a distancia.
- M0: no existen metástasis.
 - M1: El cáncer se ha propagado a sitios distantes tales como el hígado, el peritoneo (la membrana que recubre la cavidad abdominal), los pulmones o los huesos

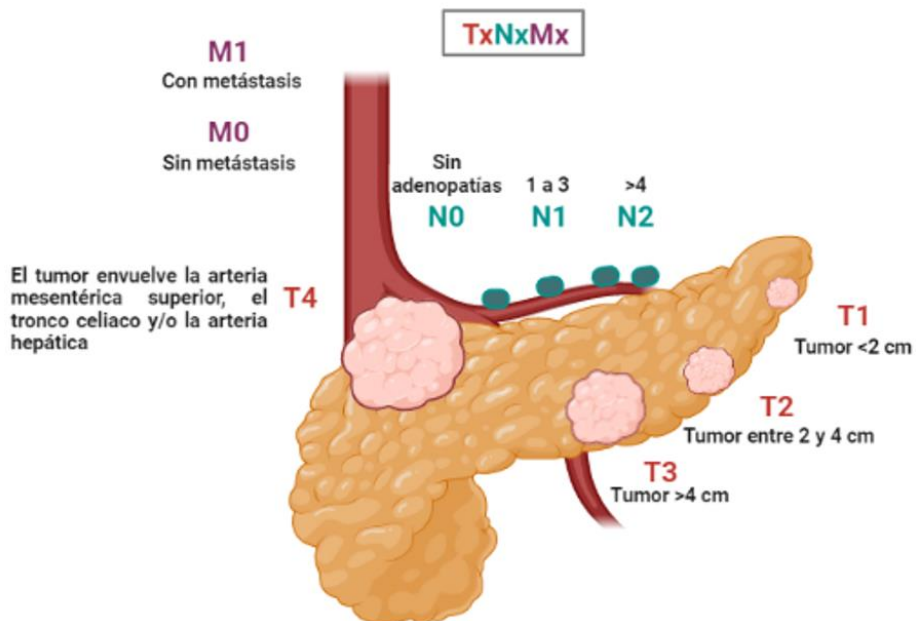


Figura 9. Representación de la clasificación del PDAC basada en el sistema TNM. Figura generada con BioRender.

En combinación con la clasificación TNM, existe una clasificación por estadios (Edge y cols., 2010):

Estadio 0: se trata del cáncer in situ. El tumor se localiza en la mucosa o revestimiento interno del colon o recto

- Tis, No, Mo

Estadio IA: el tumor mide hasta 2 cm o menos y está en el páncreas. No se ha diseminado a los ganglios linfáticos u otras partes del cuerpo (T1, No, Mo).

Estadio IB: el tumor que afecta al páncreas mide más de 2 cm. No se ha diseminado a los ganglios linfáticos u otras partes del cuerpo (T2, No, Mo).

Estadio IIA: el tumor mide más de 4 cm y se extiende más allá del páncreas. No se ha diseminado a las arterias, las venas, los ganglios linfáticos u otras partes del cuerpo (T3, No, Mo).

Estadio IIB: el tumor, de cualquier tamaño, no se ha diseminado a las arterias o venas cercanas. Se ha diseminado a 1 a 3 ganglios linfáticos regionales, pero no a otras partes del cuerpo (T1, T2 o T3; N1; Mo).

Estadio III: cualquiera de estas situaciones:

- Un tumor, de cualquier tamaño, que se ha diseminado a 4 o más ganglios linfáticos regionales, pero no a las arterias, las venas u otras partes del cuerpo cercanas (T1, T2 o T3; N2; Mo).
- Un tumor que se ha diseminado a las arterias y venas cercanas y es posible que se haya diseminado a ganglios linfáticos regionales. El cáncer no se ha diseminado a otras partes del cuerpo (T4, cualquier N, Mo).

Estadio IV: cualquier tumor que se ha diseminado a otras partes del cuerpo (cualquier T, cualquier N, M1).

1.2.6. Manifestación clínica y diagnóstico del adenocarcinoma ductal pancreático

El PDAC es un cáncer bastante paucisintomático hasta fases avanzadas (estadios III y IV), uno de los hechos que explica el porqué de su baja tasa de resecabilidad y baja supervivencia a 5 años. Entre sus síntomas y signos destacan el dolor epigástrico con extensión lumbar, la febrícula vespertina, la ictericia obstructiva (acompañada de acolia y coluria), el síndrome constitucional y fenómenos paraneoplásicos como la triada de Schmidt que se caracteriza por paniculitis, poliartritis y eosinofilia. Todos estos síntomas pueden variar o asociarse a otros en función de la extensión del tumor y de la localización del mismo. Así, la ictericia o la obstrucción duodenal es más frecuente en los pacientes con tumores de la cabeza pancreática mientras que el dolor en hipocondrio izquierdo aparece generalmente en los pacientes con tumores de la cola pancreática (Ducreux y cols., 2015).

Ante la sospecha de un paciente con PDAC, el diagnóstico se basa en la realización de pruebas complementarias que comenzarían con una ecografía abdominal y un TAC toraco-abdominal con contraste en fase arterial abdominal. En caso de observarse una masa pancreática se procedería, si es posible, a obtener una biopsia con aguja gruesa de la

misma por eco-endoscopia. En caso de duda sobre la existencia de enfermedad metastásica, se procedería a la realización de un PET-TAC de extensión. En los casos de M1 se podría proceder a biopsiar alguno de los territorios metastásicos de acceso más sencillo. Los marcadores tumorales CEA y Ca19.9 no son diagnósticos, sino que se utilizan como forma de monitorizar la respuesta al tratamiento. La RMN abdominal se reserva únicamente para los casos de duda cuando se visualizan lesiones pequeñas o quísticas (Al-Hawary y cols., 2014; Bipat y cols., 2005; Nawaz y cols., 2013; Ngamruengphong y cols., 2015; Wong y Lu, 2008).

1.2.7. Tratamientos del adenocarcinoma ductal pancreático

El tratamiento del PDAC varía dependiendo de su carácter localizado o metastásico en el momento del diagnóstico. En el caso de la enfermedad localizada resulta de vital importancia determinar si se trata de una enfermedad resecable de entrada, borderline, es decir, que requiere neoadyuvancia y posterior reevaluación o irresecable. De todos los PDAC sólo un 20% con resecables al diagnóstico y de ellos sólo el 20% sobrevive a los 5 años (Ducreux y cols., 2015; Gómez-España y cols., 2021). El parámetro fundamental que determina su

irresecabilidad es la infiltración de la arteria mesentérica (mayor a 180°) y del tronco celiaco. La infiltración de la vena porta, vena mesentérica u otras estructuras venosas son criterios de tumor borderline y de neoadyuvancia. En los casos de resección de entrada, se contempla la realización de duodenopancreatectomía cefálica con linfadenectomía regional en los tumores de la cabeza pancreática y de pancreatectomía corporocaudal con linfadenectomía regional en los de cola pancreática (Abrams y cols., 2009; Bockhorn y cols., 2014; Callery y cols., 2009; Delperio y cols., 2014, 2015; Kooby y cols., 2010; Mitchem y cols., 2012; Ragulin-Coyne y cols., 2012; Ricci y cols., 2015; Tol y cols., 2014; van der Gaag y cols., 2010). En todos los PDAC está indicada la adyuvancia preferible con FOLFIRINOX durante 12 ciclos especialmente si la resección es R1 o N+. Cuando el estado del paciente no lo permite, se puede realizar tratamiento con Gemcitabina-Capecitabina o Gemcitabina (GMZ) en monoterapia. La radioterapia no se contempla en este escenario considerándose incluso deletérea. En los casos de tumores borderline o irresecables se realiza un tratamiento con Gemcitabina-Abraxane durante 3 meses con reevaluación posterior. En caso de resultar irresecables se realiza RT con IMRT de consolidación con Capecitabina oral concomitante (Assifi y cols., 2011; Chauffert y cols., 2008; Denost y cols., 2013; Gillen y cols., 2010; Hammel y cols., 2016; Landry y cols., 2010; Loehrer y cols., 2011; Maréchal y cols., 2012;

Mukherjee y cols., 2013; Neoptolemos y cols., 2001, 2010; Oettle y cols., 2007; Shinchí y cols., 2002; Sultana y cols., 2007).

En los casos de PDAC metastásico los tratamientos de primera línea comprenden FOLFIRINOX, GMZ-Abraxane o GMZ en monoterapia en función del estado general del paciente. La supervivencia se encuentra entre 9 y 13 meses. En sucesivas líneas se consideran esquemas de tratamiento como el Naliri-5-FU y el FOLFOX. En caso de pacientes con inestabilidad de microsatélites tumoral podría considerarse el empleo de Pembrolizumab en monoterapia. Asimismo, en caso de mutaciones germinales en BRCA2 puede considerarse terapia de mantenimiento con Olaparib en pacientes con respuesta de primera línea a platinos (Burris y cols., 1997; Ciliberto y cols., 2013; Conroy y cols., 2018; Dykewicz y cols., 2001; Golan y cols., 2019; Marabelle y cols., 2020; Moore y cols., 2005; Oettle y cols., 2014; Ripamonti y cols., 2012; Sonnenblick y cols., 2011; Stark & Hines, 2015; Von Hoff y cols., 2014).

1.2.8. Nuevos tratamientos del adenocarcinoma ductal pancreático

En los últimos años, han sido muchos los intentos para mejorar el tratamiento del PDAC mediante nuevos esquemas de tratamiento y/o nuevos agentes terapéuticos. A pesar de la extensa investigación realizada los resultados han sido en general, poco satisfactorios. Así, podemos destacar los ensayos realizados con GMZ-Abraxane (fase III) y FOLFIRINOX (fase I/II) combinados con hialuronidasa pegilada que han mostrado resultados negativos en cuanto a incrementos de supervivencia global respecto a los esquemas tradicionales (Doherty y cols., 2018; Ramanathan y cols., 2019). En este contexto, el selenito sódico se presenta como una posible alternativa para la mejora de la terapia del cáncer en general y del PDAC en particular.

1.3. Selenito sódico

El selenito es un anión inorgánico que se compone de un átomo de selenio y tres de oxígeno presentando un número de oxidación de 2-. Al combinarse con el sodio catiónico en forma de oxosal se obtiene el compuesto conocido como selenito sódico.

El selenito de sodio posee capacidades quimioprotectoras y antitumorales a dosis no tóxicas (Kieliszek y cols., 2017; Satoh y cols., 1992). Algunos estudios han demostrado de la suplementación de la quimioterapia con selenito a dosis bajas podría reducir sus efectos secundarios (Dennert & Horneber, 2006; Noori & Mahboob, 2011; Satoh y cols., 1992). Además, el selenito posee una potente capacidad antitumoral y selectividad por las células tumorales, que ha sido demostrada *in vitro*, en líneas celulares de linfoma, leucemia, carcinoma gástrico, colorrectal y mesotelioma (Z. Li y cols., 2013; Olm, 2009, 2009; Spyrou y cols., 1996; Tan y cols., 2019; Wallenberg y cols., 2014), e *in vivo*, utilizando ratones con inóculos de tumores de ovario, próstata y colon, con resultados satisfactorios (Caffrey & Frenkel, 2012; Thamilselvan y cols., 2016; Yang y cols., 2016). Por el contrario, no se han desarrollado suficientes ensayos clínicos para evaluar la repercusión de la incorporación del selenito al tratamiento del cáncer en la mejora en el pronóstico de los pacientes.

1.3.1 Estructura y propiedades químicas

El selenito de sodio (Na_2SeO_3), que aparece como un sólido cristalino de color blanco, es una sal que en su forma de pentahidrato ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_5$) (PM 172,95) es soluble en agua (Figura 10). Generalmente se prepara mediante la reacción del dióxido de selenio

con hidróxido de sodio: $\text{SeO}_2 + 2 \text{NaOH} \rightarrow \text{Na}_2\text{SeO}_3 + \text{H}_2\text{O}$. El hidrato se convierte en sal anhidra al calentarlo a 40°C . El Na_2SeO_3 presenta un dianión piramidal SeO_3^{2-} (Wickleder, 2002) que cuando se oxida produce selenato de sodio, Na_2SeO_4 .

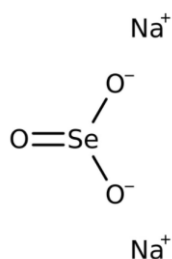


Figura 10. Fórmula química del selenito de sódico. Tomado de Fisher Scientific (fishersci.es/shop/products/sodium-selenite-44-46-se-anhydrous-thermo-scientific/10318340).

1.3.2 Actividad biológica y toxicidad

El selenio es un elemento esencial para las funciones biológicas (Ying & Zhang, 2019). El selenito de sodio se ha convertido en un ingrediente habitual en los suplementos dietéticos, productos multivitamínicos y/o minerales. Los suplementos que solo proporcionan selenio usan L-selenometionina o una levadura enriquecida con selenio. No obstante, el selenito de sodio presenta

toxicidad pudiendo irritar la piel, los ojos y las membranas mucosas siendo tóxico por ingestión, inhalación y absorción cutánea. La dosis tóxica crónica para los seres humanos se sitúa entre 2,4 a 3 mgr/día (Wilber, 1980). En el año 2000, el Instituto de Medicina de EE. UU estableció los niveles máximos de ingesta tolerable (UL) para adultos (a partir de alimentos, agua potable y suplementos dietéticos) en 400 µg/día (Institute of Medicine (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, 2000).

Dentro de las diferentes actividades biológicas en las que se ha demostrado que participa esta molécula, destaca su potencial actividad antineoplásica. El selenio, administrado en forma de selenito de sodio, se reduce a seleniuro de hidrógeno (H_2Se) en presencia de glutatión (GSH) y posteriormente genera radicales superóxido al reaccionar con oxígeno. Este hecho se ha relacionado con su actividad antitumoral en diferentes tipos tumores. Así, en diversos tumores como el cáncer de ovario, leucemias o linfomas (Olm, 2009; Spyrou y cols., 1996) el selenito sódico ha demostrado actividad antitumoral *in vitro*. En estudios realizados en cáncer de colon, cáncer de ovario conjuntamente con cisplatino y en cáncer de próstata junto a carmustina, el selenito sódico ha demostrado actividad antitumoral tanto *in vivo* como *in vitro*

en animales de experimentación (Caffrey y Frenkel, 2012; Thamilselvan y cols., 2016; YANG y cols., 2016).

1.3.3 Actividad antitumoral y mecanismos de acción. Efecto sobre el sistema de detoxificación de ROS.

El selenito de sodio es una oxo-sal inorgánica que se utiliza como fuente de selenio, que está presente en selenoproteínas, como la glutatión peroxidasa y la tiorredoxina reductasa (Mehdi y cols., 2013). Estas proteínas participan en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son libres radicales que inducen daño por estrés oxidativo a proteínas y ADN. Sin embargo, en dosis elevadas, el selenito se vuelve muy tóxico para las células, especialmente para las células tumorales. El selenito es un anión extremadamente reactivo que es rápidamente metabolizado por la célula usando una gran cantidad de poder reductor en forma de glutatión reducido (GSH) y tiorredoxina reducida (TRX-H) que realizan funciones vitales a nivel celular, siendo la más importante la desintoxicación de ROS. Por lo tanto, el agotamiento de GSH y TRX-H mediado por el selenito deja a la célula indefensa contra ROS, lo que resulta en la muerte celular debido al daño del ADN, ARN o proteínas (Ganther, 1999).

De hecho, se ha demostrado que ROS pueden generar daño por (i) un desajuste de base nitrogenada que activa el sistema MMR (*missmatch repair*) que conduce a ciclos de reparación fútiles y apoptosis, tanto dependiente como independiente de p53 (p.e. p73) (Qi y cols., 2010; Rudolf y cols., 2008); (ii) roturas de doble hebra que, si no se reparan, activan la vía de apoptosis p53; y (iii) estrés oxidativo capaz de inducir daño mitocondrial provocando liberación del citocromo C, activación de la apoptosis (vía mitocondrial) y autofagia.

Además, el agotamiento mediado por selenito de la TRX-H, causa la liberación del factor ASK1, lo que activa muerte celular dependiente de p38/JNK (Rudolf y cols., 2008), mientras que la reducción mediada por selenito del GSH, que inactiva ciertos agentes tóxicos intracelulares, evita que la célula se defiendan de ciertas toxinas (p.e. fármacos quimioterápicos) (Ganther, 1999). Según algunos autores el selenito también podría bloquear directamente el centro activo de la glutatión reductasa y la tiorredoxina. reductasa, que son responsables de la regeneración de GSH y TRX-H, disminuyendo así la capacidad de las células tumorales para defenderse del efecto de los ROS (Olm, 2009) (Figura 11).

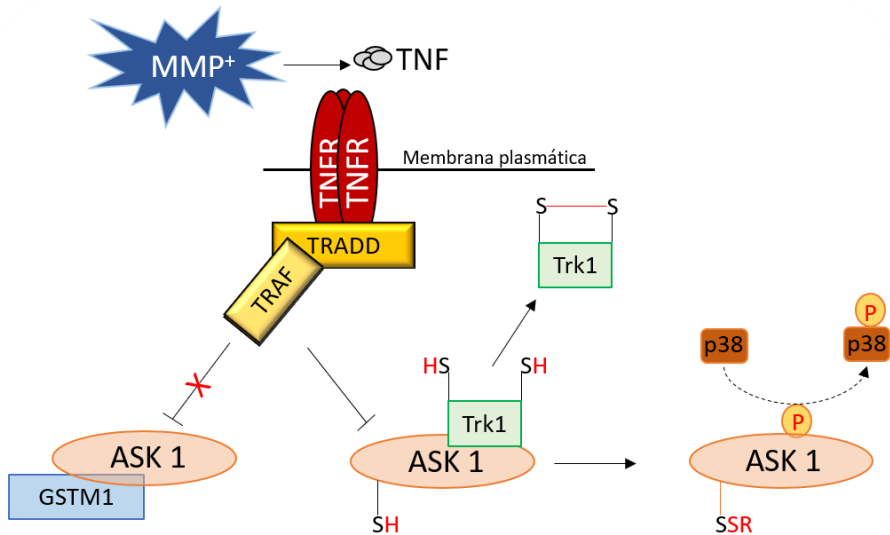


Figura 11. Apoptosis mediada por selenito, depleción de TRX-H, liberación de ASK1 y activación de p38. Figura generada con BioRender.

1.3.4 Selectividad por los tejidos y células tumorales

Curiosamente, los estudios *in vitro* e *in vivo* mostraron que las células tumorales son más sensibles que las células normales al selenito. Paradójicamente, se ha descubierto que las células altamente resistentes a la quimioterapia tradicional dentro de los tumores son las más sensibles a la exposición al selenito. Olm y cols. (2009) explicaron este fenómeno por los mecanismos de resistencia de canal basados en MRP (Olm, 2009). La presencia de estas proteínas en las células tumorales permite que los agentes quimioterapéuticos se expulsen junto con GSH

(por separado o conjugado). En el entorno de estas células tumorales y debido al poder reductor del GSH, el selenito es reducido a anión biselenuro (HSe^-), que se incorpora en mayor medida a las células tumorales. Por lo tanto, las células tumorales quimiorresistentes (que expulsan más poder reductor, en este caso, GSH) incorporarían mejor el selenito y sufrirían más daño (Olm, y cols., 2009) (Figura 12).

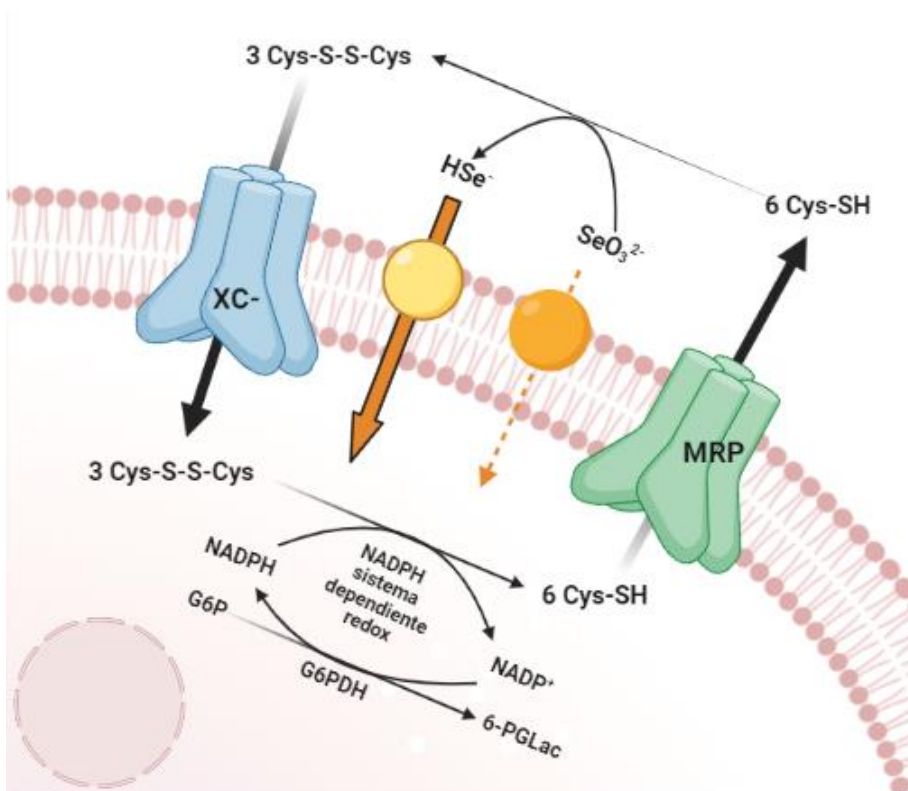


Figura 12. Mecanismos de selectividad del selenito por las células tumorales. El glutatión reducido expulsado por el sistema MRP conjugado con diferentes tóxicos o fármacos reduce el selenito a biselenuro el cual es mucho más permeable a la membrana celular penetrando de forma mucho más cuantiosa, por ello, en aquellas células que sobreexpresan sistemas de detoxificación de fármacos MRP (quimiorresistencia) siendo con ello el selenito más citotóxico sobre estas células. Figura generada con BioRender.

1.3.5 Otros compuestos de selenio con actividad antitumoral

Otros compuestos de selenio también han demostrado actividad antitumoral basada en redox, como el ácido metilselenico, la selenometionina y el selenato de sodio. De hecho, Qiu y cols (2019) utilizó ácido metilselenico contra el cáncer de mama *in vitro* e *in vivo* con resultados positivos que demostraron una inhibición significativa (Qiu y cols., 2019). Goel y cols (2006), indujeron la apoptosis a través de la vía p53 en células de cáncer de colon HCT116 y RKO con selenometionina (Goel y cols., 2006). Choi y cols. (2015) utilizaron células de cáncer oral KBV20C para demostrar el efecto quimiosensibilizador del selenato de sodio con el agente quimioterapéutico vincristina (Choi y cols., 2015). Estos autores

también demostraron que este efecto era independiente de la inhibición de la p-glicoproteína.

2. OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo es avanzar en la terapia antitumoral del adenocarcinoma pancreático mediante el uso del selenito sódico sólo y en combinación con otros agentes quimioterápicos (gemcitabina)

Como **objetivos específicos** nos planteamos:

1. Valorar el poder antitumoral del selenito sódico *in vitro* utilizando líneas celulares establecidas de cáncer de páncreas
2. Analizar la capacidad del selenito sódico *in vitro* para potenciar el efecto de la gemcitabina, un agente quimioterapéutico de uso habitual en el tratamiento del cáncer de páncreas.
3. Vislumbrar Determinar los mecanismos de acción antitumoral del selenito sódico en cáncer de páncreas y los mecanismos implicados en la potenciación del efecto de la gemcitabina.
4. Determinar acción del selenito sódico sobre la migración, invasividad, angiogénesis de células de cáncer de páncreas y sobre las células madre de este tipo tumoral *in vitro*.
5. Valorar el efecto antitumoral del selenito sódico solo y en combinación en gemcitabina *in vivo* usando animales de experimentación.

6. Determinar la capacidad del selenito sódico solo y en combinación con gemcitabina *in vivo* para inhibir los mecanismos moleculares relacionados con la agresividad del cáncer de páncreas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivos celulares

Las líneas objeto de estudio de la presente tesis doctoral han sido la línea celular de cáncer de páncreas humano PANC-1, suministrada por el Centro de Instrumentación Científica (Universidad de Granada), y la línea celular de cáncer de páncreas murina Pan02, proporcionada amablemente por el Dr. Lars Ivo Partecke, Universidad de Greifswald, Alemania (Figura 13). Ambas líneas celulares se cultivaron usando medio DMEM suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y una mezcla de estreptomicina y anfotericina B (ATB) al 1%. Las células se mantuvieron en un incubador en condiciones estériles al 5% de CO₂ y 37 °C (Mesas y cols., 2021) en atmósfera humidificada en frascos de cultivo, y una vez alcanzada la subconfluencia de las mismas, fueron despegadas con tripsina al 0,25% y EDTA al 0,02%, para volver a cultivarse o congelarse.

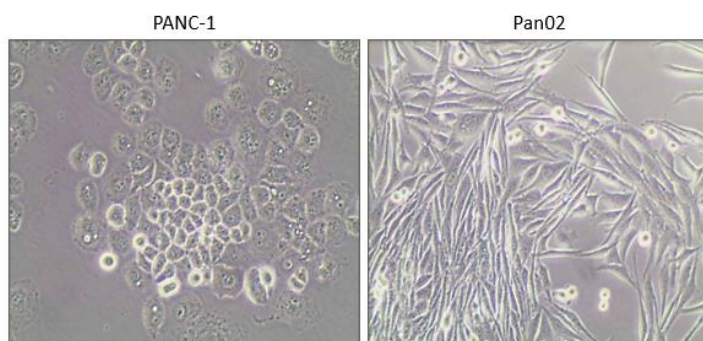


Figura 13. Imágenes de microscopía óptica (10x) de las líneas de cáncer de páncreas PANC-1 y Pan02.

3.2. Fármacos y compuestos químicos.

El Selenito (214485, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.) se disolvió en DMEM a una concentración del stock de 578,03 mM. La GMZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) se disolvió en agua destilada a una concentración del stock de 379,94 mM. La benzamida (BNZ) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.) se disolvió en DMEM a la concentración de stock de 1981,18 μ M (Tabla 3).

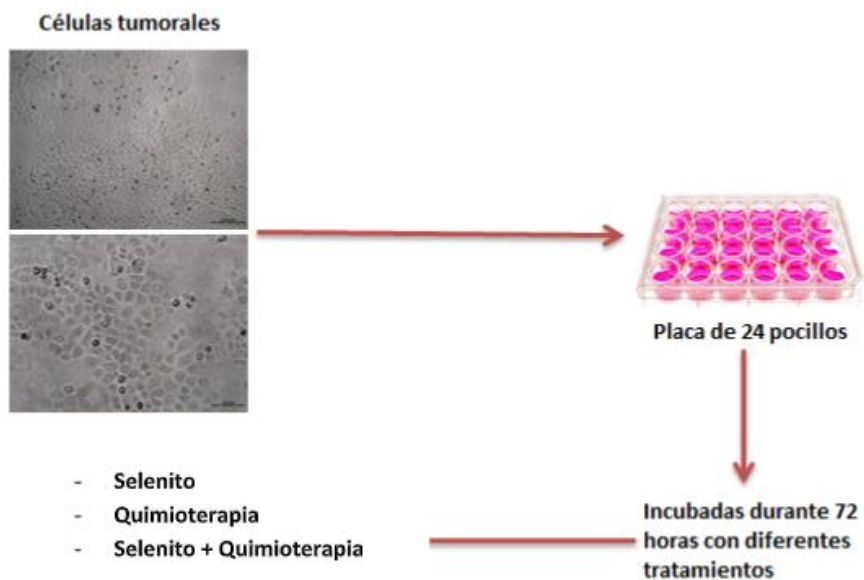


Figura 14. Esquema del procedimiento de los ensayos cultivo *in vitro* con diferentes fármacos llevados a cabo.

3.3. Análisis de viabilidad celular

El estudio de la viabilidad celular (Figuras 14 y 15) aporta información sobre cómo afecta un determinado estímulo a nuestro cultivo celular, siendo por tanto muy importante analizarla para ver la efectividad de los tratamientos farmacológicos. Para estos ensayos, las células se sembraron en placas de 24 pocillos con 400 μL medio de cultivo, a diferentes concentraciones según la línea celular: 5×10^3 células / pocillo en el caso de PANC-1 y 4×10^3 células / pocillo en Pano2. Al día siguiente, una vez adheridas las células a los pocillos, se añadió selenito de sodio (de 1 a 30 μM), GMZ (de 0.025 a 5 μM) o combinaciones de ambos compuestos (a diferentes concentraciones) por triplicado. A los pocillos control no se le añadió ningún compuesto. Tras 72 horas de exposición a los tratamientos, las células se fijaron utilizando ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 20 min a 4 °C. Se lavaron 3 veces con agua destilada y una vez secas, las placas se tiñeron con sulforrodamina B (SRB) al 0,4% en ácido acético al 1% durante 20 min en agitación suave. Después, se lavaron tres veces con ácido acético al 1% para retirar el exceso de SRB y se dejaron secar de nuevo. Una vez secas, se solubilizó la SRB con Trizma® (10 mM, pH 10,5), pasándose la mezcla a placas de 96 pocillos de fondo plano. Finalmente, se midió la absorbancia o densidad óptica (DO) a 492 nm de la muestra en un lector de placas Titertek Multiskan (Flow, Irvine, CA, EE. UU.). Los

porcentajes de proliferación (P%) y citotoxicidad (Ct%) se calcularon con las siguientes ecuaciones:

$$P\% = \left(\frac{DO \text{ de la muestra}}{DO \text{ del control negativo}} \right) * 100$$

$$CO\% = 100 - P\%$$

Además, se determinó la CI₅₀ (concentración de fármaco a la cual se inhibe el 50% de la proliferación celular) usando para ello el software GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, EE. UU.) Se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Supervivencia celular (\%)} = \frac{\text{células tratadas OD} - \text{Blanck}}{\text{Control OD} - \text{Blanck}} * 100$$

Para estudiar las interacciones farmacológicas que se pudieran dar en el uso combinado del selenito de sodio y la GMZ, se utilizó el software CompuSyn (Chou y Martin, 2005), con el cual se obtuvo el índice de combinación (CI) para las diferentes concentraciones usadas. En función del valor de este CI podemos definir 3 interacciones: sinergismo, con un (CI <1); efecto aditivo, con un (CI = 1); y el antagonismo con un (CI > 1).

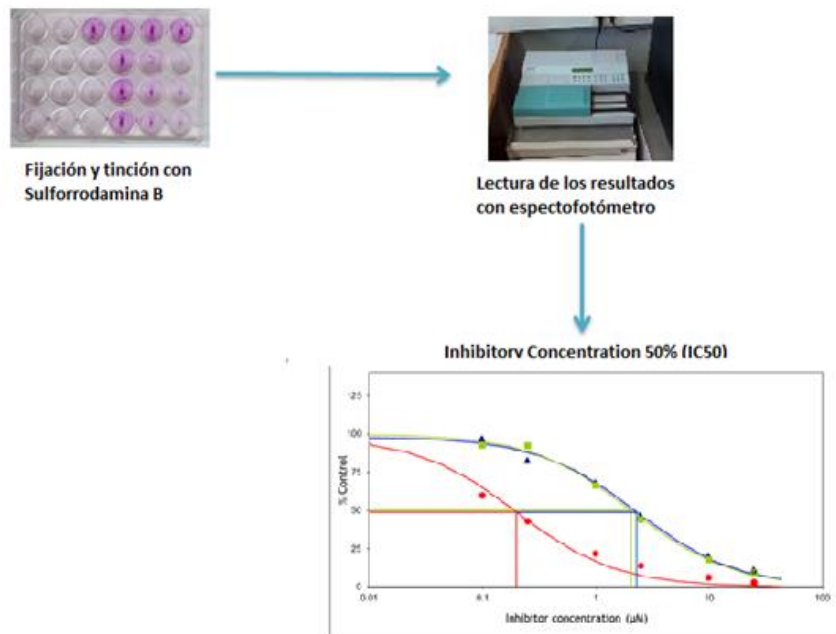


Figura 15. Esquema del procedimiento de los ensayos de proliferación celular y citotoxicidad.

3.4. Estudios de ciclo celular

La valoración de la fase del ciclo celular en la que se encuentran las células es de gran relevancia, ya que la acumulación de estas en determinadas fases del mismo puede hacerlas más susceptibles a fármacos y diferentes tratamientos antitumorales. En estos estudios, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 15×10^4 células / pocillo en PANC-1 y de 10×10^4 células / pocillo en Pano2, en un volumen de 1,5 ml de DMEM completo por pocillo. Después de 24 h,

se retiró el medio de cultivo y se añadió un medio de cultivo libre de suero para sincronizar el ciclo celular de todas las células del cultivo. Tras esto, se añadió de nuevo medio completo y, las células del cultivo fueron expuestas a los diferentes tratamientos farmacológicos (Tabla 3). Tras 48 de tratamiento, se recogió el sobrenadante, las células fueron tripsinizadas, centrifugadas (1500 rpm, 3 min) y fijadas en etanol al 70% (4 °C, 60 min). Después de eliminar el etanol por centrifugación (1500 rpm, 3 min), los *pellets* se procesaron utilizando el kit de solución de PI / RNasa (Immunostep, Salamanca, España). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto, BD (Becton Dickinson, San José, CA, EE. UU.) utilizando el software FlowJo (Figura 16).

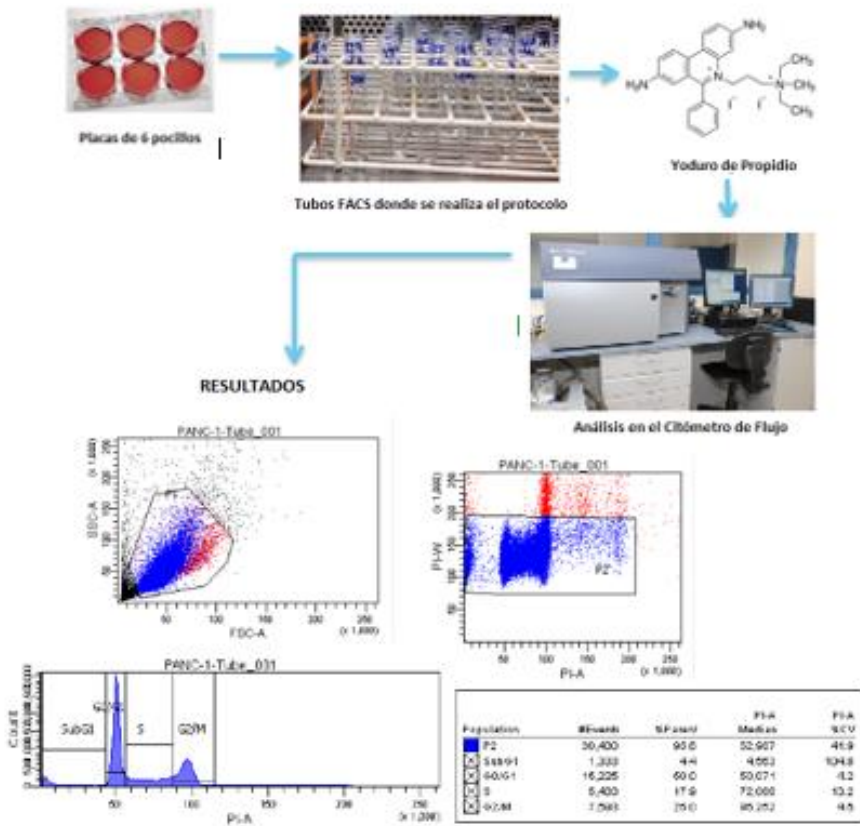


Figura 16. Esquema resumen de los ensayos de citometría de flujo.

Tabla 3. Resumen de las dosis de fármacos empleados.

Línea celular	Fármacos	Dosis (μM)	Fármacos Combinados	Dosis (μM)
Pan02	SEL	1 3 3.6 4.6	SEL+GMZ	1+0.1 1+0.15 1+0.25 3+0.1 3+0.15 3+0.25 3.6+0.1 3.6+0.15 3.6+0.25 4.6+0.1 4.6+0.15 4.6+0.25
	GMZ	0.1 0.15 0.25		
PANC-1	SEL	1 3 4 5.6	SEL+GMZ	1+0.05 1+0.25 1+0.75 3+0.05 3+0.25 3+0.75 4+0.05 4+0.25 4+0.75 5,6+0.05 5+0.25 5+0.75
	GMZ	0.05 0.25 0.75		

3.5. Análisis de potencial de membrana mitocondrial

La mitocondria es una organela clave en el metabolismo celular y el mantenimiento del potencial de membrana de la misma es vital para su funcionamiento. El fundamento de estos análisis es la utilización de la 1,1',3,3,3',3'-hexametilindodicarbo-cianine (DiIC1), un colorante fluorescente que se acumula en las mitocondrias con potencial de membrana despolarizadas y que se asocia con las células de tipo apoptótico. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 10×10^4 células / pocillo, se expusieron a diferentes tratamientos (48 h), se tripsinizaron y lavaron en PBS y se centrifugaron (2500 rpm, 3 min). Luego, los sedimentos se resuspendieron en DMEM (sin FBS ni ATB) y se incubaron con DiIC1 (10 μ M) y PI (1 mg / ml) durante 20 min en oscuridad (ImmunoStep, Salamanca, España). Finalmente, las células se centrifugaron (1500 rpm, 3 min), se resuspendieron en PBS y se analizaron con un citómetro de flujo de BD FACSCanto (Becton Dickinson, San José, CA, EE. UU.) utilizando el software FlowJo.

3.6. Ensayos de inhibición de PARP

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 15×10^3 células / pocillo en PANC-1 y 4×10^3 células / pocillo en Pano2 y se trataron con el inhibidor de poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP)

benzamida (de 10 a 30 μM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y con benzamida en asociación con selenito (diferentes concentraciones) durante 72 h. Luego, se llevó a cabo un ensayo de proliferación de sulforrodamina B como se describió anteriormente.

3.7. Ensayos de Inmunofluorescencia para valorar el factor inductor de apoptosis (AIF)

EL AIF (*apoptosis inducing factor*) es una proteína mitocondrial que se encarga de desencadenar la muerte celular conocida como PARP-tanatos o muerte celular inducida por PARP. Estos mecanismos son activados por diferentes agentes físicos o químicos que ocasionan daño celular y activan la reparación del daño génico por PARP. Esto conlleva la traslocación de AIF de la mitocondria al núcleo celular y con ello se desencadena la fragmentación del ADN nuclear por AIF y la muerte celular por PARP-tanatos. Para valorar su presencia, se utilizó un ensayo de inmunofluorescencia. Para ello las células (PANC-1 y Pan02) fueron sembradas a una densidad de 30.000 células por pocillo y fueron sometidas a tratamientos con selenito, GMZ en monoterapia, BNZ en monoterapia y selenito + BNZ. Tras 24 horas, las células se fijaron en sus *chambers* con formaldehído al 4% en PBS a temperatura ambiente (TA) durante 10 min, se lavaron 2 veces con PBS y se neutralizaron para eliminar el paraformaldehído residual usando NH_4Cl 50 mM en PBS (10

min, TA). Tras este bloqueo se volvieron a lavar de nuevo con PBS (5 min, 4 °C) para permeabilizarse después con Triton 10-100 al 0,5% en PBS (5 min, 4 °C). Una vez las células estaban fijadas y permeabilizadas, las preparaciones celulares se incubaron con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS (10 min, RT) para bloquear las uniones inespecíficas y se incubaron con el anticuerpo anti-AIF primario a una dilución 1/200 durante una hora a temperatura ambiente (Cell Signaling Technologies, Barcelona, España). Tras incubar con el primario, se procedió a lavar 3 veces con PBS las muestras, y tras ello, se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa-488® (Cell Signaling Technologies, Barcelona, España) a una dilución 1/500 durante 30 minutos a TA. Por último, las muestras se volvieron a lavar 3 veces con PBS para retirar el secundario no unido y el tercer lavado se incorporó al PBS la 4,6-diamidino-2-fenilindol (Hoestch) (dilución 1/1000) para teñir las estructuras nucleares. Todas las muestras se montaron con medio de montaje (Invitrogen™ ProLong™ Gold) y las células se observaron mediante un microscopio de fluorescencia (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

3.8. Ensayos de Western-Blot para la determinación de la forma fosforilada de p38.

Como habíamos visto antes, p38 es crucial para iniciar la apoptosis inducida por algunos fármacos quimioterápicos, como la GMZ, y su forma fosforilada es reflejo de la activación de la misma. Para determinar su presencia se utilizó la técnica de Western-Blot. Células de las líneas PANC-1 y Pano2 fueron sembradas en frascos de 25 cm² a 350.000 células/frasco. Las células expuestas a diferentes tratamientos (72 h) (ver en apartados anteriores) se recolectaron y centrifugaron, y las proteínas totales se extrajeron con tampón de lisis RIPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Para determinar la concentración de proteínas se llevó a cabo la técnica de Bradford consistente en la realización de una curva patrón con albúmina a diferentes concentraciones y cuantifican por interpolación las proteínas de nuestra muestra problema utilizando el colorante Bradford. Para la electroforesis de proteínas, se calentaron 40 mg de proteína de cada muestra a 95 °C durante 5 min y se cargaron en geles SDS-PAGE al 10% para separar las proteínas de las muestras en función de su peso molecular, junto con un patrón de peso molecular (Spectra Multicolor High Range Protein Ladder, ThermoFisher) para controlar el proceso y los pesos en todo momento. Las muestras estuvieron corriendo a las

condiciones de voltaje 20v durante 2 horas. Tras la separación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro de 45 μm) (Millipore, Burlington, MA, EE. UU.) mediante una transferencia que duró 1 hora a 0.2 A. Una vez transferidas las proteínas a la membran, esta se bloqueó con una solución de leche al 5% en PBS suplementado con Tween-20 al 0,1% (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) durante 1 hora a TA en una agitación suave. Tras el bloqueo se lavaron 3 veces las membranas con PBS suplementado con Tween-20 al 0,1% y se incubaron con el anticuerpo primario de conejo anti-p38 (Cell Signaling Technologies, Barcelona, España) a una dilución (1/1000) durante toda la noche a 4 °C en agitación suave. A la mañana siguiente se volvieron a lavar las membranas y se añadió un anticuerpo secundario específico frente al primario combinado con HRP (Hot Rabbit Peroxidasa)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) (dilución 1/5000, 1 h, TA). Finalmente, se lavarón 3 veces las membranas con PBS suplementado con Tween-20 al 0,1% y fueron reveladas por quimioluminiscencia usando un kit de revelado (Amersham Biosciences, Saint Louis, MO, EE. UU.) y usando el aparato LAS-4000 mini (GE Healthcare). Como control de carga, se utilizó la detección de la β -actina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Los geles se analizaron utilizando el software analítico Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.).

3.9. Ensayos de cierre de la herida (migración)

Para determinar la capacidad de migración de las células tumorales y, por tanto, su invasividad, se realizó un ensayo de migración *in vitro*. Este consistió en realizar una discontinuidad en el cultivo celular a una confluencia alta mediante una punta de pipeta, despegando así las células y realizando un seguimiento de la capacidad para volver a cerrar esa "herida" mediante la migración de las células a esa zona. Para ello, se sembraron células de cáncer de páncreas (PANC-1 y Pan02) en placas de 6 pocillos y se cultivaron hasta una confluencia del 90% en condiciones de cultivo estándar. Se realizó una "herida" manualmente con una punta estéril siguiendo el protocolo descrito por Grada y cols., (Grada y cols., 2017) y el medio se reemplazó con DMEM sin suero. A continuación, se trataron con selenito de sodio o GMZ (1 y 3 μM de selenito (IC₁₀ e IC₂₅) y 0.05 μM de GMZ (IC₁₀)) durante 72 h. Se obtuvieron imágenes en diferentes momentos (24, 48 y 72 h) para evaluar el porcentaje de migración midiendo el área libre de células tumorales (v.1.53i software Image J, NIH, Bethesda, 1500, EE. UU.) ([Http: // imagej.nih.gov/](http://imagej.nih.gov/), consultado el 14 de octubre de 2020) (Figura 17).

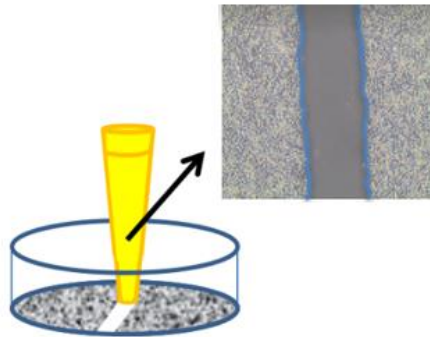


Figura 17. Ensayo de cierre de la herida y formación de la misma en el pocillo de cultivo.

3.10. Ensayos con esferoides tumorales multicelulares

Los esferoides tumorales multicelulares (MTS) son acúmulos de gran cantidad de células tumorales en 3D que permiten llevar a cabo en cultivo estudios de citotoxicidad antitumoral de forma más parecida a lo que parecía a un estudio *in vivo*. Los MTS de PANC-1 y Pano2 se basándonos en el protocolo de Prados y cols., (2010). Este consiste en que se sembraron células PANC-1 y Pano2 (15×10^3 y 25×10^3 células / pocillo, respectivamente) en una placa de 96 pocillos recubierta con agarosa al 1% (w / v) y con 150 μ l de DMEM completo. Para la formación de MTS, el protocolo se modificó ligeramente (Ware y cols., 2016) suplementando DMEM con metilcelulosa (0,24%). Los MTS de PANC-1 y Pano2 fueron tratados con selenito de sodio, GMZ y tratamientos

combinados durante dos ciclos de 72 h. Se utilizaron MTS como controles sin tratar. Además, también se estudió la inhibición del crecimiento celular de los MTS utilizando el ensayo de CCK8 (Cell Counting Kit 8) (Abcam, Cambridge, Reino Unido).

3.11. Ensayos de formación de colonias

La formación de colonias es otra forma para valorar la agresividad de las células tumorales y consiste en cuantificar el número de colonias que pueden formar las células cuando se siembran a una baja densidad. Para realizar este protocolo, las células de PANC-1 y Pano2 se trataron con selenito de sodio, GMZ y tratamientos combinados. Después de 72 h, las células supervivientes se sembraron en placas de 12 pocillos (600 células / pocillo) con 1 ml de DMEM. Tras tres y seis días en incubación, se obtuvieron colonias de Pano2 y PANC-1. A continuación, los pocillos se lavaron dos veces con 1 ml de PBS y se fijaron con 1 ml / pocillo de metanol frío al 70% (TA, 30 min). Luego, las células se lavaron dos veces con agua y las placas se secaron durante la noche. Las colonias se tiñeron usando 1 ml / pocillo de cristal violeta al 0,5% en metanol al 70% (15 min) en un agitador orbital. Después de ello, las placas se lavaron tres veces con agua y se secaron durante la noche. Finalmente, se contaron el número de colonias.

3.12. Formación de esferoides de CSCs.

Como hemos apuntado anteriormente, las CSCs son poblaciones celulares muy importantes para la dinámica tumoral y responsables en gran parte de la resistencia a los tratamientos, por lo que probar el efecto de los tratamientos sobre estas poblaciones en concreto es vital para las nuevas terapias. Para generar cultivos puros de esferas de estas y ver como los tratamientos previos afectan a su formación, las células de PANC-1 y Pano2 se incubaron con diferentes tratamientos (selenito de sodio, GMZ y tratamiento combinado) durante 72 h. Luego, se recolectaron las células restantes y se sembraron 3000 células en placas de 24 pocillos recubiertas con agarosa al 1% (peso/volumen) y con 300 μ L de medio condicionado (compuesto de HAM F12, estreptomicina-penicilina al 1%, hidrocortisona 1 mg / mL, heparina 4 ng / ml, insulina-transferrina-selenito (ITS) 10 mg / mL, B27 1x y EGF, 10 mg / mL, FGF 20 mg / mL) para células madre de cáncer de páncreas (CSCs). Después de 10 días, una vez formados los esferoides, se contaron en los diferentes grupos de tratamiento.

3.13. Ensayos de angiogénesis

Los ensayos de angiogénesis se llevaron a cabo utilizando células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs), que se compraron de la ATCC (Rockville, MD, EE. UU.). Las HUVEC se cultivaron en

pocillos recubiertos con gelatina al 0,1% y medio de crecimiento 2 (EGM-2) (Lonza Bioscience, Barcelona, España) suplementado con Kit EGMTM-2 Endotelial SingleQuotes™ (Lonza Bioscience) que incluye FBS, Factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento similar a la insulina R3-1 (R3-IGF-1), ácido ascórbico, hidrocortisona, factor de crecimiento de fibroblastos humanos, Factor-Beta (hFGF-β), heparina y antibióticos (Sigma Aldrich, Madrid, España) a 37 °C en atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Células de la línea Pano2 fueron tratadas a diferentes concentraciones de selenito durante 24 horas. Después de 24 h de incubación, el medio se retiró y se reemplazó por nuevo medio (sin selenito). Luego, se sembraron HUVEC en placas de 96 pocillos (50 × 10³ células / pocillo) previamente recubiertos con 50 μL de matrigel (Corning, Nueva York, NY, USA) y se cultivaron (12 h) en un medio sin FBS. Las HUVEC fueron expuestas a medio acondicionado (obtenido de las células Pano2 tras ser tratadas con selenito). Se añadió calceína a las células y se visualizaron bajo microscopía óptica y de fluorescencia a las 3 h y 7 h. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ para evaluar el grado de crecimiento de la red microvascular.

3.14. Análisis de crecimiento tumoral *in vivo*

Para estos experimentos se usaron modelos subcutáneos de tumores de páncreas. Las cepas de ratón elegida fue la C57BL / 6 (Charles River Laboratories Inc, Wilmington, MA, EE. UU.), utilizándose hembras de 6-8 semanas de edad (18-20 g de peso) y de tipos: negros y albinos (en función de los análisis posteriores). Para la inducción de los tumores se utilizaron ratones hembra albinos pardos C57BL / 6 (18-20 g, peso, 6 semanas de edad). Los animales se dispusieron en jaulas de colonias con acceso libre al agua y la comida antes de los experimentos, y con luz y temperatura controlados (22 ± 2 °C de T^a y ciclo de luz-oscuridad de 12 h). Todos los estudios en animales contaron con la aprobación por parte del Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Granada (03-09-2017-118) y se realizaron de acuerdo con las normas internacionales (Directiva 2010/63 del Consejo de las Comunidades Europeas). subcutáneos se utilizó la línea celular Pano2: se despegaron las células en condiciones de esterilidad y se resuspendieron en suero salino a una densidad de 5×10^6 células por mL, para finalmente inocular mediante una inyección subcutánea 100 µl de células (5×10^5 células) en el flanco trasero derecho de los ratones. A partir de aquí se realizó un seguimiento de los ratones, y cuando los tumores fueron palpables, los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos de tratamiento (n = 13

negros, n = 5 albinos para cada grupo en ambos casos): Controles (administración de salino), selenito (3 mg / kg), GMZ (25 mg / kg) y tratamiento combinado con selenito + GMZ (a dosis de 3 mg y 25 mg de tratamiento respectivamente). Cada grupo fue tratado cada tres días por un total de 10 dosis, mediante la administración vía intraperitoneal. Paralelamente en los días de tratamiento se realizó el seguimiento del peso de los ratones y del volumen de los tumores, mediante el uso de una báscula y de un calibre digital respectivamente. Para calcular el volumen tumoral se utilizó la siguiente fórmula:

$$Volumen (mm^3) = \frac{(a * b^2 * \pi)}{6}$$

donde "a" es el diámetro más grande del tumor y "b" es el diámetro más grande perpendicular a "a". Los valores de crecimiento tumoral se midieron en mm³ y también se realizó una medida del volumen/día. Además, se midió la supervivencia de los ratones realizando una curva Kaplan-Meyer y el estadístico logRank. Además, en algunos puntos del experimento se procedió a realizar extracción de sangre a los ratones para analizar las poblaciones sanguíneas en un contador Hematológico Mslab21 Medical Lab Fully Auto Hematology Analyzer/Cbc Test Machine (Medsinglong Global Group Co, China). El punto final del experimento se estableció a los 10 ciclos de tratamiento

o si existía algún signo de sufrimiento en los ratones: pérdida del 20% del peso o un volumen tumoral superior a 3000mm³. Una vez completados los ciclos de tratamiento se procedió a sacrificar los ratones con pentobarbital y se extirparon los tumores para valorar el efecto antitumoral mediante técnicas de microscopía.

3.15. Bioimagen

Una de las técnicas que se utilizó para valorar la progresión del tumor fue el seguimiento por imagen de los tumores, basándose en la mayor utilización de la glucosa por parte de estos. Para ello se utilizó glucosa marcada con un fluoróforo (RediJect 2-DeoxyGlucosone (DG) - 750, PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.). Esta experiencia se llevó a cabo en los ratones de albino para evitar la interferencia del pelo negro en la señal de la glucosa marcada. El procedimiento se realizó en los ratones después de 5 y 10 ciclos de tratamiento y consistió en la administración por la vena del seno venoso oftálmico de 100 μ L cantidad del marcador. Tras 3 horas los ratones se introdujeron en el scanner IVISpectrum (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) y se adquirieron las imágenes de fluorescencia emitidas por los tejidos tumorales.

3.16. Análisis histológico

Los tumores resecados se fijaron en formaldehído, se incluyeron en parafina y se cortaron con un micrótopo de rotación (Leica, Wetzlar, Alemania). Después de la desparafinización e hidratación, las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina y el método del pentacrómico (Doello, 2014). Se utilizó inmunofluorescencia para determinar la expresión de MMP9 y Ki67 (BD 550.609 y ab38898 a 1:50 y 1: 200, respectivamente) (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU. Abcam, Cambridge, Reino Unido). Se utilizaron Alexa-488® y 647® (Cell Signaling Technologies, Barcelona, España) como anticuerpos secundarios (1: 200 para ambos). Las imágenes de los tejidos teñidos con hematoxilina Y pentacrómico se obtuvieron con un microscopio fotográfico (Leica, Wetzlar, Alemania) mientras que para los marcadores MMP9 y Ki67 se utilizó un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 50i (Nikon Instruments Inc, Melville, NY) (Figura 18).

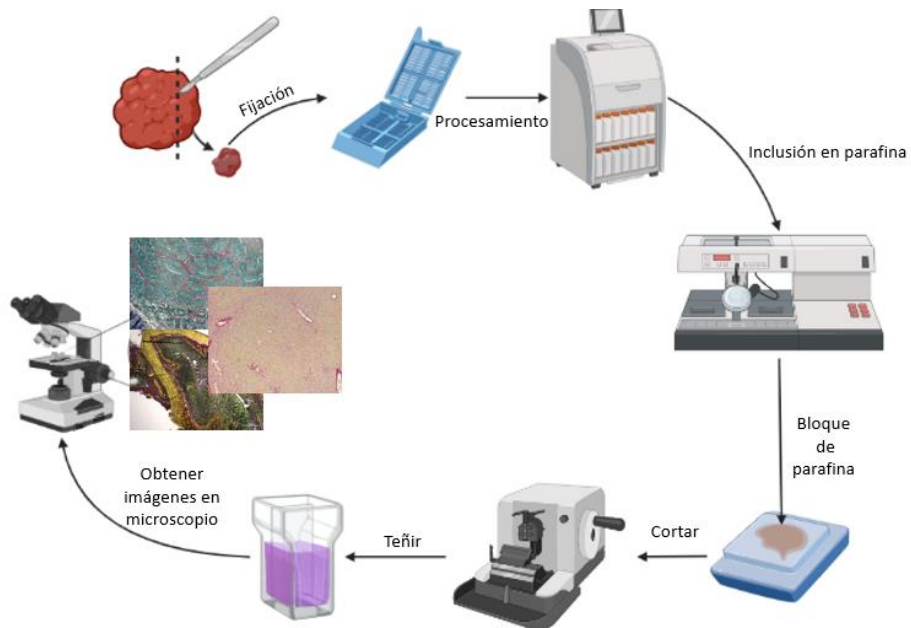


Figura 18. Esquema resumen del procesamiento histológico de una muestra. Figura realizada con BioRender.

3.17. Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE) de tres o más repeticiones. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student y ANOVA de una vía con pruebas de Tukey post hoc (SPSS v.15, SPSS, Chicago, IL, EE. UU.). La supervivencia de los ratones se evaluó con el método de Kaplan-Meier. Finalmente, se utilizó la prueba de logRank para comparar la proporción de ratones vivos entre grupos. Todas las pruebas se realizaron con el paquete estadístico para las ciencias sociales (SPSS) v. 15.0 y las

diferencias se consideraron estadísticamente significativas a un valor de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. El selenito sódico reduce la viabilidad de las células de cáncer pancreático

Tras analizar los ensayos de proliferación celular bajo los efectos del selenito a 72 horas de exposición, se demostró que el selenito de sodio inhibió significativamente la viabilidad de las células de cáncer de páncreas de manera dependiente del tiempo y de la dosis, mostrando valores de IC₅₀ a 72 horas de 5,6 y 4,6 μ M para las líneas celulares PANC-1 y Pano2, respectivamente (Figura 19). Se puede apreciar por los resultados que la línea Pano2 es ligeramente más sensible al tratamiento con el selenito sódico.

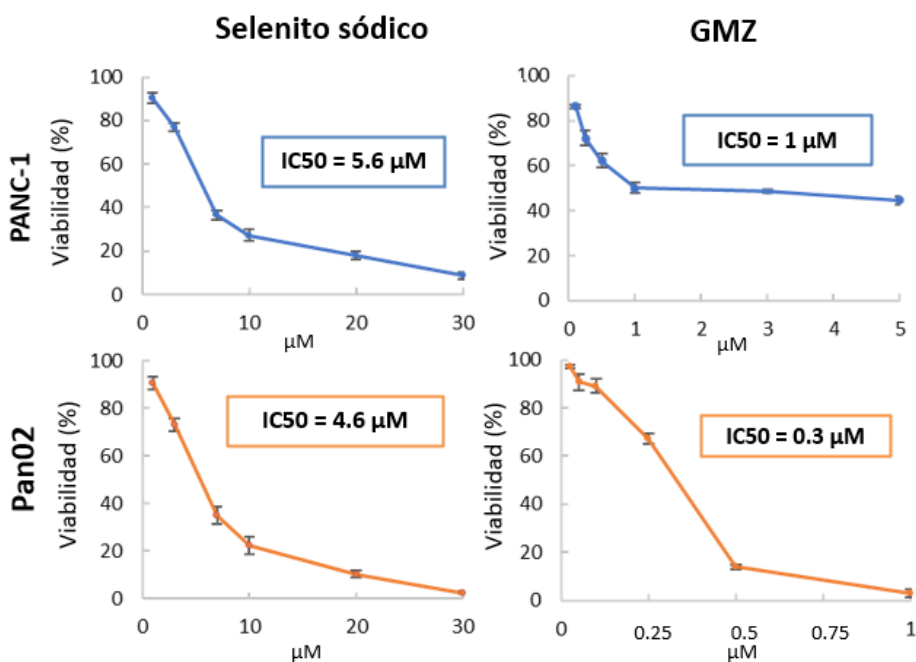


Figura 19. Gráficos de viabilidad celular y valores de IC₅₀ de selenito de sodio y GMZ en PANC-1 y Pan02. Las células se expusieron a selenito de sodio y GMZ a diferentes dosis durante 72 h.

Como era de esperar, al tratar las células con la GMZ también se vio la pérdida de viabilidad celular, calculándose la IC₅₀ de la GMZ a una dosis de 1 y 0.3 µM en las líneas PANC-1 y Pan02 respectivamente.

Al observar las células de ambas líneas de cáncer de páncreas tratadas con el selenito a las 72 horas a una dosis de IC₅₀, se apreció una disminución de la densidad que se acompañó de cambios morfológicos, incluida una clara pérdida de la forma poligonal plana de las células y

un desprendimiento de la placa de cultivo, señales que hacían pensar en un proceso apoptótico (Figura 20.a). La idea de este proceso cobró fuerza al teñir las células con Hoestch, pudiéndose apreciar formaciones en los núcleos similares a los cuerpos apoptóticos en ambas líneas celulares (Figura 20.b).

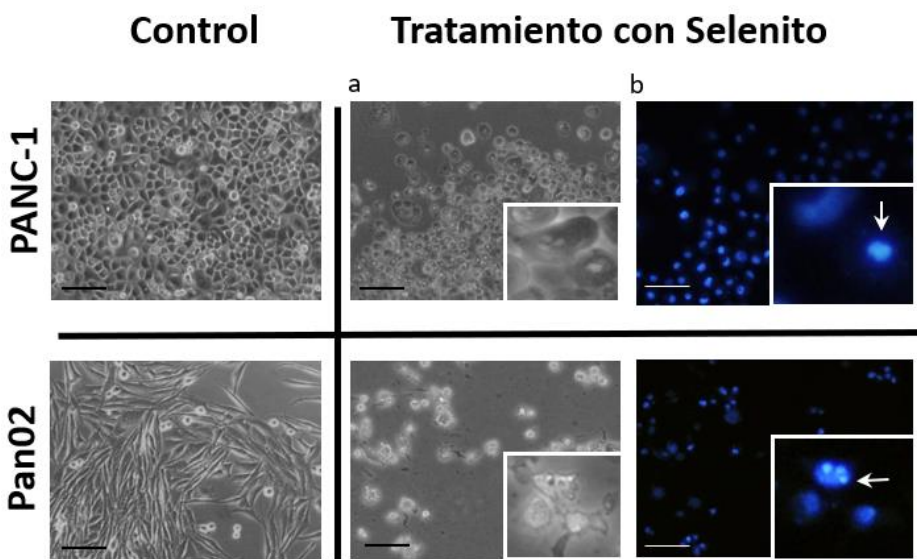


Figura 20. Cambios morfológicos en las células PANC-1 y Pan02 después de la exposición a selenito de sodio (aumento de 10 ×, aumento de 15 × detalle). La tinción de Hoestch mostró fragmentación nuclear (flechas) que indica la presencia de cuerpos apoptóticos (muerte celular de tipo apoptótico).

4.2 El selenito sódico interacciona con la GMZ para mejorar el efecto *in vitro* del tratamiento combinado

Cuando se combinó el uso del selenito y de la GMZ para valorar el posible efecto sinérgico de esta, observamos que se daba sinergia a diferentes combinaciones: en el caso de Pano2, la combinación de selenito a dosis de 0.05 (IC10), 0.25 (IC25) y 0.75 (IC40) μM junto con todas las dosis de GMZ empleadas (equivalentes a una IC10, IC25 e IC40), provocaba una sinergia moderada, con un índice de sinergia que oscilaba en 0,6 y 0,85. Esta sinergia se perdía, e incluso se obtenían resultados de antagonismo en la interacción (selenito $1\mu\text{M}$ + GMZ 0.1, 0.15 y 0.25), cuando las concentración de selenito era baja, en nuestro caso de $1\mu\text{M}$ (que equivaldría a una IC10). En el caso de PANC-1, se observó un efecto sinérgico en la combinación de selenito a dosis de 1 (IC10), 3 (IC25) y 4 (IC40) μM junto con todas las dosis de GMZ empleadas (equivalentes a una IC10, IC25 e IC40), lo que provocaba una sinergia moderada-alta, con un índice de sinergia que oscilaba en 0,4 y 0,7. Esta sinergia se perdía, pero sin resultados de antagonismo a las dosis de selenito $5.6\mu\text{M}$ + GMZ 0.05, 0.25 y 0.75, a diferencia con lo que sucede en Pano2 que es a la dosis baja de selenito (Figura 21).

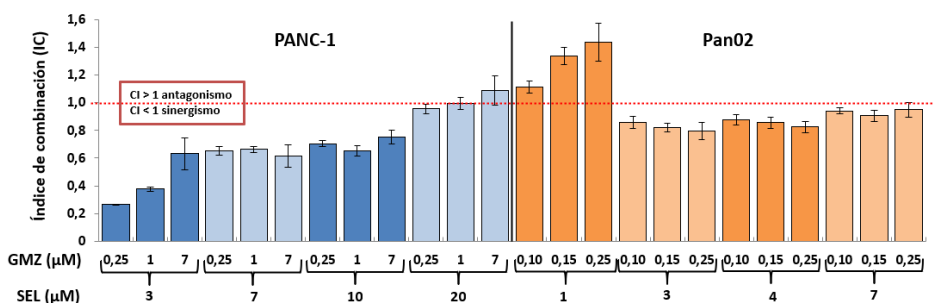


Figura 21. Índice de combinación (CI) de selenito de sodio y GMZ en las células PANC-1 y Pano2 (CI > 1, antagonismo; CI < 1, sinergismo). GMZ (gemcitabina); SEL (selenito de sodio).

4.3. Efectos del selenito sódico en el ciclo celular y el potencial de membrana mitocondrial

Al analizar los datos obtenidos por citometría de los porcentajes de células que se encontraban en cada fase del ciclo celular, tras los tratamientos podemos decir que las células pancreáticas PANC-1 y Pano2 tratadas con selenito de sodio, GMZ o selenito de sodio + GMZ no mostraron cambios sustanciales significativos en el ciclo celular (cifras aproximadas, 65% fase G₀ / G₁, 15% fase S, 20% fase G₂) respecto a la población control sin tratar (Figura 22).

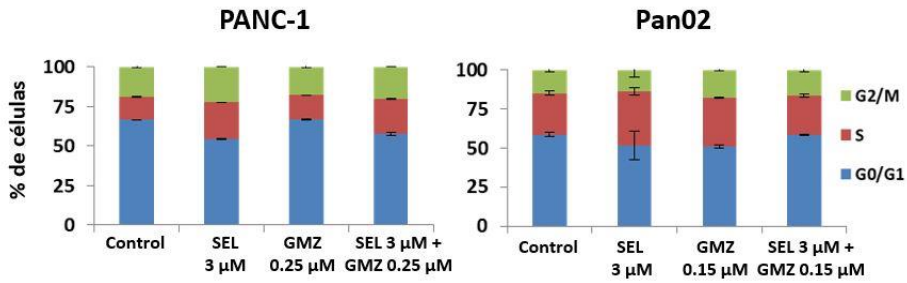


Figura 22. Modulación del ciclo celular por selenito de sodio. Se utilizó selenito de sodio solo y en asociación con GMZ en las células PANC-1 y Pan02 de cáncer de páncreas.

Otro de los estudios por citometría que se realizaron, fue la valoración del estado del potencial de la membrana mitocondrial, mediante el marcaje de las células con DiIC1. Los resultados mostraron que los tratamientos provocan una pérdida del marcaje en las células para el DiIC1, lo que se traduce en una pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Además, la combinación con el yoduro de propidio (PI) (para marcar células muertas), nos permitió establecer tres posibles tipos de población en nuestros experimentos: poblaciones celulares apoptóticas (bajo marcaje de DiIC1 y de PI-A), vivas (alto DiIC1 y bajo PI-A) y muertas (bajo DiIC1 y alto PI-A). En la figura 23 representamos los porcentajes de estas poblaciones. En el caso de las PANC-1, vemos como al tratar con selenito a 5,6 μ M (equivale a IC50) disminuyen las células viables un 35%, pasando sobre todo a estar en

fase apoptótica. Al incrementar la dosis a 10 (IC70) la disminución de la población viva baja a un 10%, pasando la mayoría de las células a estar muertas (70%). En el caso de la Pano2, la disminución de las células vivas respecto al control es de un 35% a selenito 4.6 (IC50) y no pasan por una fase apoptótica a ninguna dosis (Figura 23).

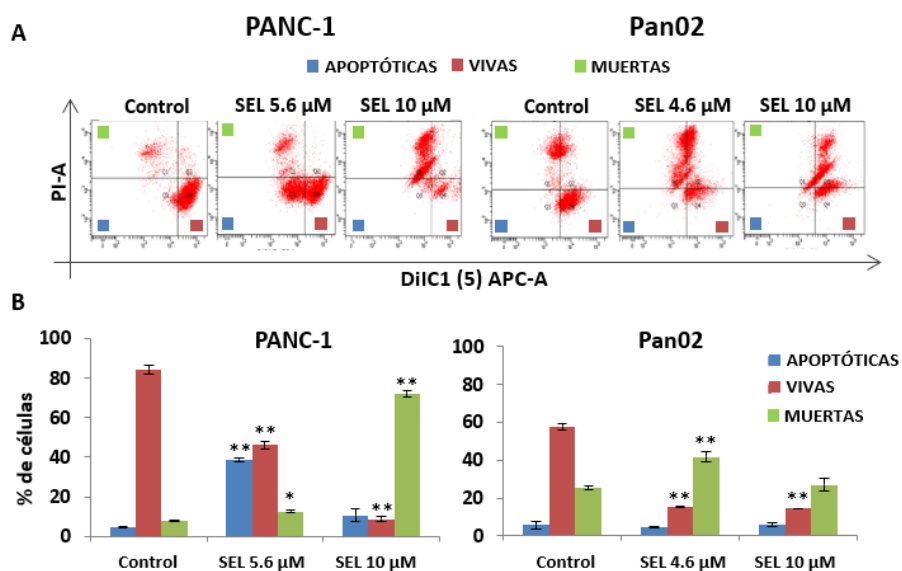


Figura 23. Cambios de tipo apoptótico (PI-A) y despolarización mitocondrial (DiIC1 (5)) en células de cáncer de páncreas PANC-1y Pan02 después del tratamiento con selenito (A). Porcentaje de células vivas, apoptóticas y muertas según los datos anteriores (B).

4.4. Análisis de los mecanismos moleculares implicados en la muerte celular inducida por selenito sódico y en la sinergia con gemcitabina

Con el fin de determinar los mecanismos moleculares implicados en el mecanismo de acción del selenito sódico y de qué manera podría ejercer la sinergia con la GMZ estudiamos una serie de moléculas claves en los mecanismos de muerte celular. Una de estas proteínas fue fosfo-p38, que como señalamos anteriormente, activa la apoptosis de forma independiente de p53. Al analizar la presencia de esta proteína mediante Western-Blot, en las células sometidas a tratamientos con selenito y GMZ (Figura 24) se detectó un aumento significativo de casi el doble en la expresión de fosfo-p38 en células de PANC-1 tratadas con IC25 de selenito de sodio en comparación con los controles, mientras que en las tratadas con IC25 de GMZ no solo no aumentó, sino que disminuyó aproximadamente un 50% la expresión. Sin embargo, la expresión de fosfo-p38 en las células Pano2 tratadas con IC25 de selenito mostró niveles más bajos que las células de control (%), mientras que las tratadas con GMZ mostraron niveles similares a los controles. Al combinar los tratamientos de selenito sódico y la GMZ, el incremento en los niveles de fosfo-p38 se disparó respecto a los tratamientos individuales, no dándose una suma de efectos, sino un potenciamiento

en la expresión: en PANC-1 pasó de 2 veces más y una disminución de 3 veces, en los tratamientos individuales de selenito y GMZ respectivamente, a un incremento de 3,5 veces respecto al control en la combinación. En el caso de Pan02 pasó de pasó de 4 veces menos y mantenerse igual, en los tratamientos individuales de selenito y GMZ respectivamente, a un incremento de 2 veces respecto al control en la combinación.

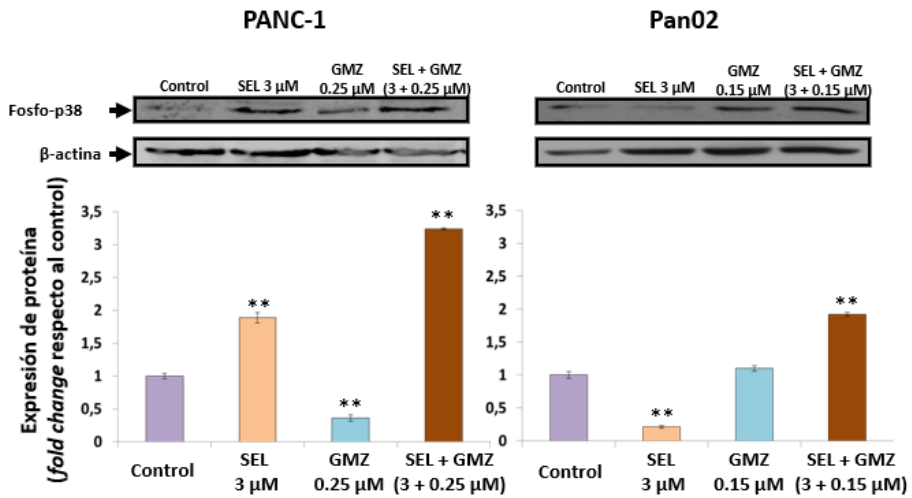


Figura 24. Western blot y análisis densitométrico representativo de la expresión de la proteína fosfo-p38 en células de cáncer de páncreas. Las células PANC-1 y Pan02 se trataron con selenito de sodio, GMZ y selenito de sodio + GMZ. Se utilizó beta-actina como control. Todos los datos se presentan como media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes; * $P < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs. en comparación con el grupo de control. GMZ (gemcitabina); SEL (selenito de sodio).

Otra de las proteínas que se analizó para dilucidar los mecanismos de acción del selenito fue AIF, como proteína efectora nuclear de la muerte por parp-tánatos. En este caso se determinó la presencia de esta proteína y su localización mediante un estudio de inmunofluorescencia. El tratamiento con selenito de sodio a dosis superiores a la IC₅₀ (durante 24h) mostró en las imágenes de microscopía que se producía una marcada localización nuclear de AIF en las células PANC-1 y Pano2 tratadas, respecto a las células sin tratar, en las cuales la localización de AIF era claramente citoplasmática (Figura 25).

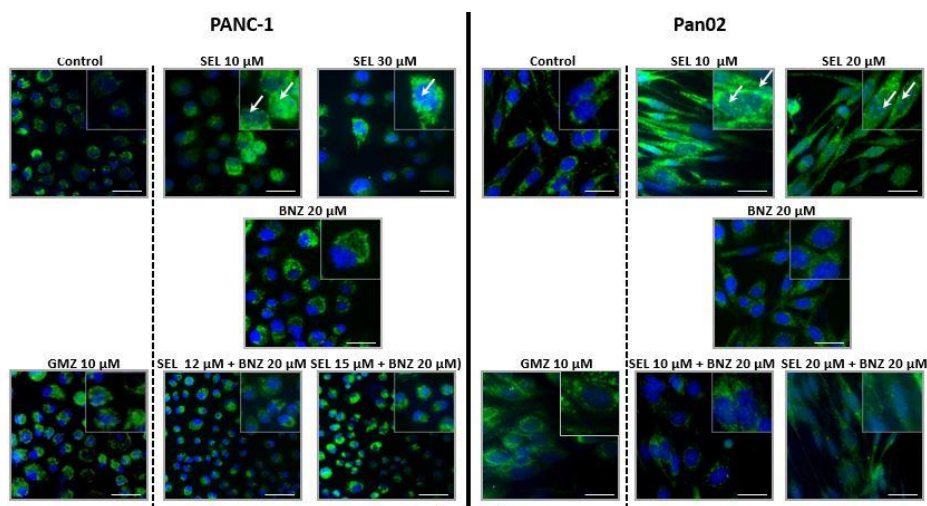


Figura 25. Análisis de inmunofluorescencia de la expresión de AIF en células pancreáticas PANC-1 y Pan02 tratadas con selenito, GMZ, BNZ y selenito + BNZ a diferentes concentraciones. Imágenes representativas de tinción

mitocondrial y translocación nuclear en función del tratamiento analizado. El cuadrado es la ampliación 2x de la imagen principal.

Por el contrario, el tratamiento con GMZ a dosis de 10 μM no indujo la ubicación nuclear de la proteína AIF, manteniendo su ubicación a nivel citoplasmático, como en los controles. Para seguir analizando los mecanismos moleculares, utilizamos la BNZ, un inhibidor de PARP (Figura 25), y valoramos de nuevo la ubicación de AIF tras los tratamientos con el selenito. En ambas líneas celulares, la BNZ pareció inhibir o disminuir la translocación nuclear de AIF que se había demostrado previamente por el tratamiento con el selenito (Figura 25), estando limitada la presencia de AIF al citoplasma (Figura 25). Paralelamente, no solo se analizó el efecto de la BNZ en la traslocación de AIF, sino que se analizaron también los efectos que tenía sobre la proliferación celular en combinación con el selenito. Como se muestra en la Figura 26, las concentraciones de BNZ inferiores a IC_{10} (como son las empleadas de 10, 20 y 30 μM) inhibieron la citotoxicidad del selenito de sodio en las líneas celulares PANC-1 y Pano2 en todas las dosis estudiadas en la combinación, con índices de combinación que iban desde aproximadamente 1 a 2, en el caso de PANC-1, y de 1 a 1.5, en el caso de Pano2. Todos estos índices fueron reflejo de la marcada caída en la inhibición celular producida por el selenito al usar BNZ. (Figura 26).

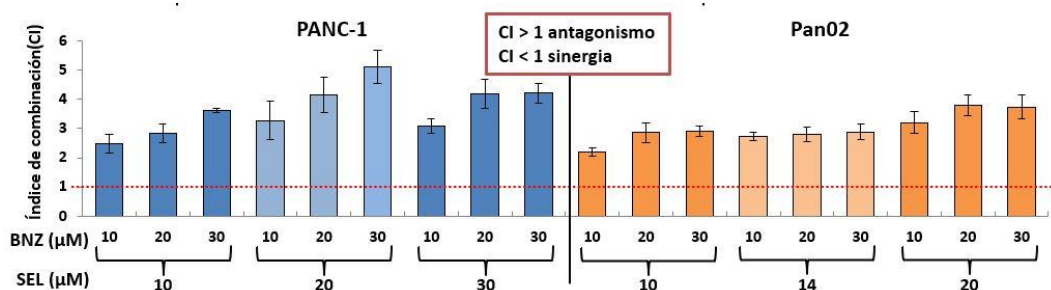


Figura 26. Índice de combinación (CI) de estudios de inhibición de PARP utilizando BNZ y selenito + BNZ. GMZ (gemcitabina); SEL (selenito de sodio); BNZ (benzamida).

4.5. El selenito sódico disminuye la migración y la formación de colonias de las células de cáncer pancreático

Al estudiar el comportamiento tras los tratamientos de las líneas pancreáticas objeto de estudio de esta tesis, en relación con su capacidad de formar colonias (Figura 27), observamos que el selenito de sodio redujo significativamente la formación de las mismas en todos los grupos de tratamiento (SEL, GMZ y combinación) en la línea celular Pan02. En esta línea se produjo hasta un 60-70% de reducción de la

formación de colonias con el uso de selenito a 3 μM (IC₂₅), de GMZ a 0.05 y 0.15 μM (valores aproximados de IC₁₀ e IC₂₅) y la combinación de ambos tratamientos. En PANC-1, los resultados no fueron significativos.

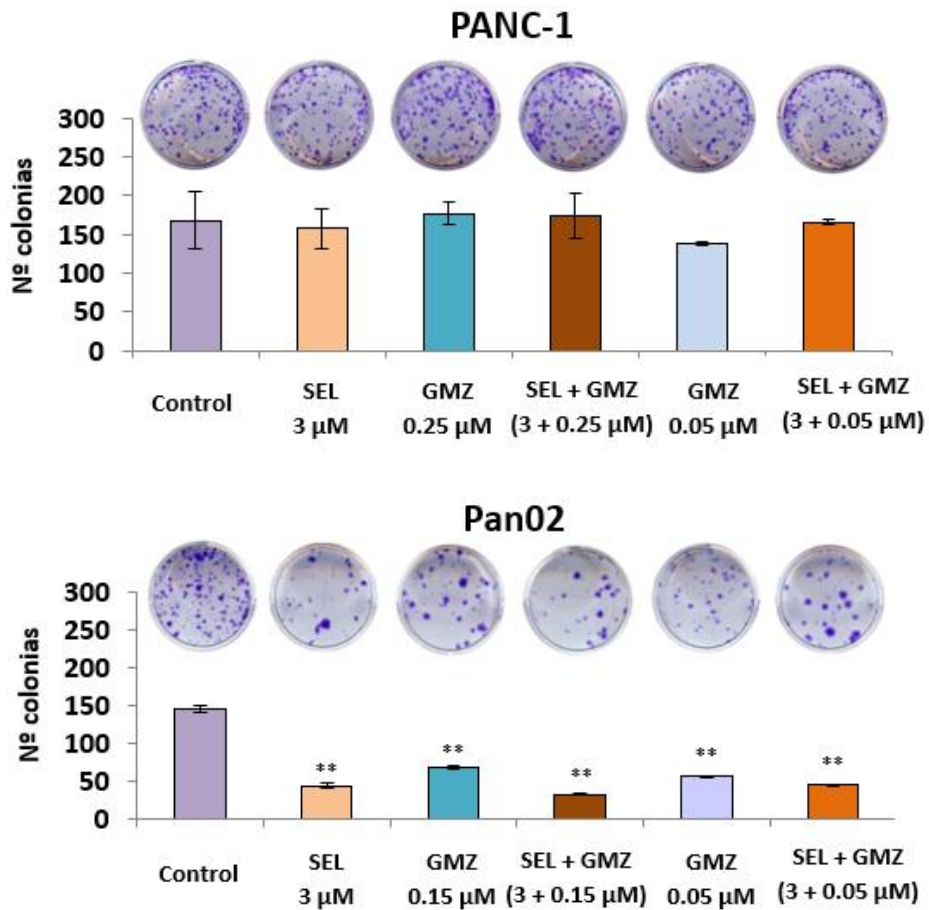


Figura 27. Análisis de crecimiento de colonias de PANC1 y Pan02 después del tratamiento con selenito, GMZ y combinación de selenito + GMZ (72 h).

Al analizar la capacidad migratoria de las células tras estos tratamientos, se apreció que la exposición al selenito de sodio disminuyó significativamente la capacidad de la migración tanto en la línea PANC-1 como Pano2. A las 24 y 48 horas se observan disminuciones significativas en la migración de las células de Pano2 pero no en PANC-1 con el tratamiento con selenito 1 y 3 μM . En el caso de la GMZ a 0.05 μM se observó una potenciación en la migración celular respecto al control desde las 24 horas en PANC-1. A las 72 horas, las dosis de selenito de sodio a 1 y 3 μM (valores aproximados de IC10 e IC25) redujeron la migración de células Pano2 (16,2 y 18,5%, respectivamente). En las células PANC-1 se detectó disminución de la migración en 10.6 y 19.6% con el uso de selenito en dosis de 1 y 3 μM , respectivamente, al mismo tiempo de estudio (Figura 28).

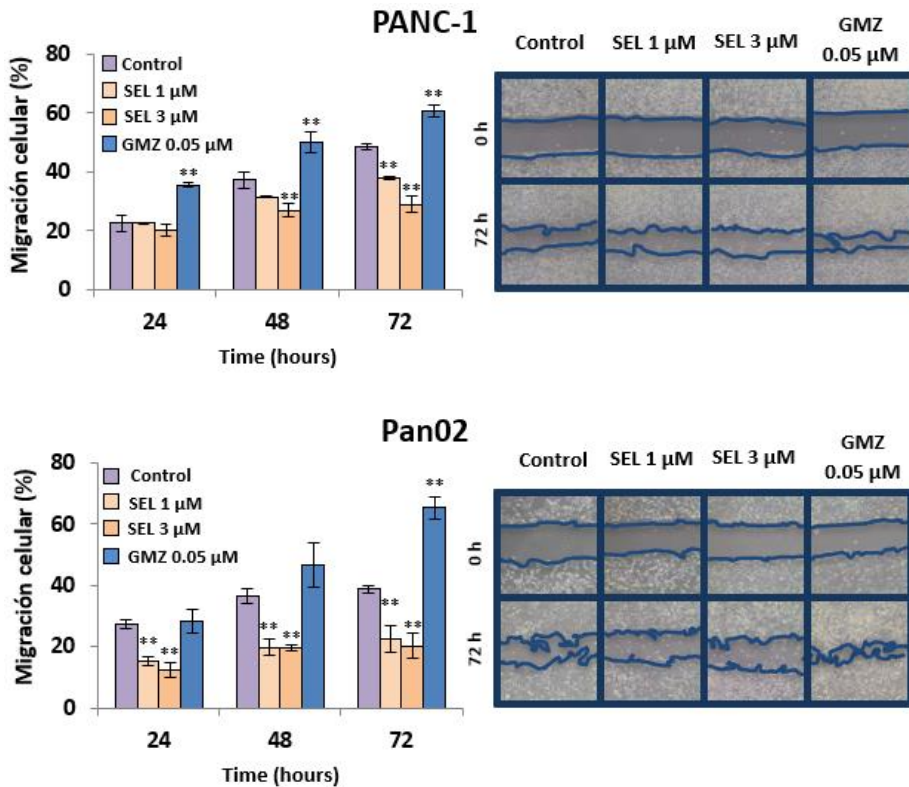


Figura 28. Análisis de migración celular. Imágenes representativas de microscopía óptica y representación gráfica de la modulación de la capacidad de migración de las células PANC-1 y Pan02 después de la exposición a selenito de sodio y GMZ en diferentes momentos (0 y 72 h). Todos los datos se presentan como media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes; ** $p < 0,01$ vs. en comparación con el grupo de control. GMZ (gemcitabina); SEL (selenito de sodio).

4.6. El selenito sódico disminuye la angiogénesis tumoral *in vitro*

Al estudiar la capacidad de formación de vasos en la línea HUVEC en presencia de medios condicionados procedentes de células Pano2 tratadas con selenito (1 y 10 μM), observamos una disminución significativa en la formación de vasos en las células HUVEC. Como podemos ver en las imágenes de microscopía la formación de los vasos es claramente menor, estando estos en menor número y más desestructurados (Figura 29) respecto a las HUVEC que han crecido con el medio de células tumorales sin tratar con el selenito. A partir de estas imágenes analizamos diferentes parámetros como el número de ramificaciones vasculares o el número de nodos. Los resultados obtenidos se caracterizan porque existe una reducción de los parámetros citados anteriormente tras el tratamiento con el selenito, siendo ésta significativa siempre cuando la dosis es de 10 μM , lo que indica una clara reducción de la capacidad de angiogénesis (Figura 29).

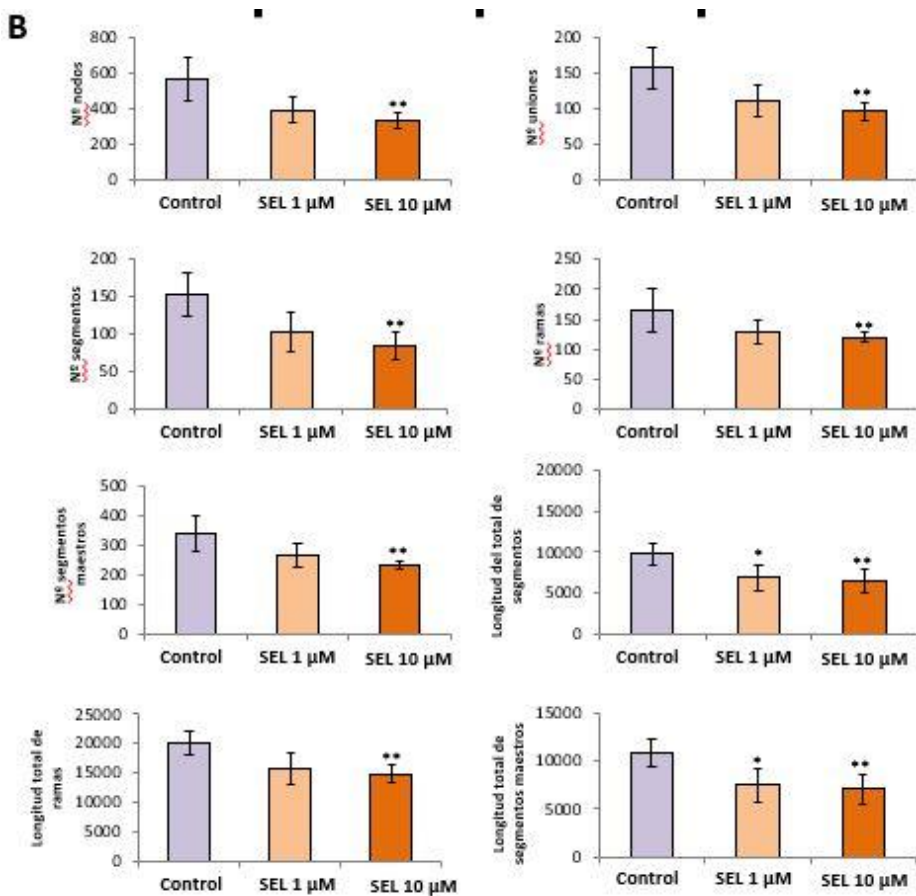
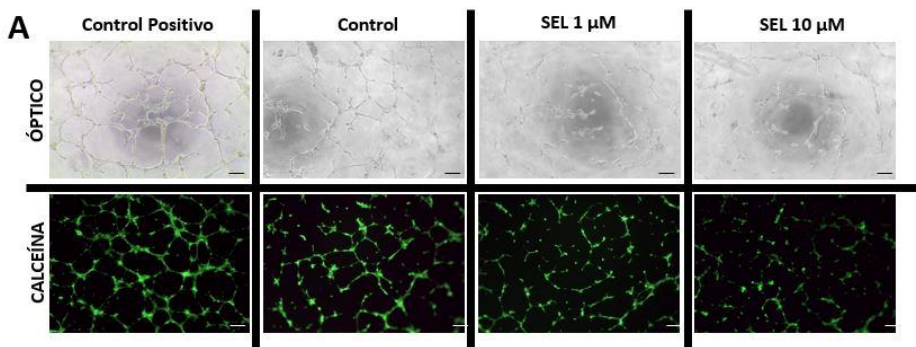


Figura 29. Efecto de los medios acondicionados con células de cáncer de páncreas después del tratamiento con selenito de sodio sobre la angiogénesis.

A. Imágenes de microscopía óptica y calceína de HUVEC expuestas a medios acondicionados obtenidos de pancreáticas de células cancerosas (Pano2) tratadas con selenito de sodio (1 y 10 μM). (B) Representación gráfica de diferentes parámetros de angiogénesis medidos en las imágenes de calceína, incluida la formación de nodos, ramas, segmentos o uniones. De lo que puede ser visto, el selenito en una dosis de 10 μM inhibe claramente la angiogénesis en las células HUVEC. Los datos se presentan como la media \pm estándar desviación de tres experimentos independientes; * P <0,05 y ** P <0,01 frente al grupo de control respectivo.

4.7. El selenito sódico inhibe el crecimiento de los esferoides multicelulares de cáncer de páncreas

Para analizar el efecto que tiene el selenito sódico, solo y en combinación, en sistemas 3D previos al uso de modelos animales, se utilizaron esferoides tumorales multicelulares de PANC-1 y Pano2, un modelo experimental que imita los tumores *in vivo* y permite la penetrabilidad y el efecto antitumoral de fármacos. Como se muestra en las Figuras 30 y 31, los MTS, tanto de PANC-1 como Pano2, mostraron una reducción significativa en su número de células viables, como determinaron los valores del CCK8 después de la exposición a selenito y selenito + GMZ. Concretamente, los MTS de PANC-1 tratados con selenito (5,6 μM , IC₅₀) y GMZ (1 μM y 4 μM , IC₅₀ e IC₅₀ \times 4) mostraron

una inhibición del crecimiento celular del 28,9, 18,5 y 24,3%, respectivamente, a las 144 h, al compararlos con los MTS sin tratar. Curiosamente, la combinación de ambos fármacos inhibió el crecimiento celular en un 36,4% a dosis bajas de GMZ (selenito 5,6 μ M + 1 μ M GMZ), pero cuando la combinación se hace con la dosis alta de GMZ (selenito 5,6 μ M + GMZ 4 μ M) esta inhibición se dispara al 78,03%, a las 144 h. En el caso de los MTS de Pano2, el selenito (4.6 μ M, IC₅₀) y las diferentes dosis de GMZ (0.3 μ M y 1.2 μ M, IC₅₀ e IC₅₀ × 4) mostraron 64.02, 47.14 y 25.7% de inhibición del crecimiento celular, respectivamente, a las 144 h. En este caso son contradictorios los resultados de la GMZ a dosis de 4 veces la IC₅₀, que presenta algo menos inhibición que el valor de GMZ correspondiente a la IC₅₀. Esto es debido quizás a que estas IC se refieren a cultivos en monocapa y su traslado a modelos 3D no tiene por qué dar resultados similares a los cultivos en monocapa. Finalmente, en el caso de Pano2 a las 144 h, la combinación del selenito con las dosis de GMZ, inhibió el 79,1% (4,6 μ M de selenito + GMZ 0,3 μ M) y el 83,2% (selenito 4,6 μ M + GMZ 1,2 μ M), ambos resultados de inhibición más altos que la terapia individual. El efecto visible a las 72 horas es similar al descrito a las 144 horas en CCK8 en las células de PANC-1 para las monoterapias siendo menor al obtenido a las 144 horas en todos los fármacos y combinaciones analizados en Pano2 y en las combinaciones en PANC-1.

En las imágenes de los MTS a 0 horas y 144 horas en Pano2 se observan disminuciones significativas en términos de volumen con los diferentes tratamientos (selenito, GMZ, selenito + GMZ) (Figura 31). Sin embargo, no se observan diferencias de volumen en PANC-1 lo cual se encuentra relacionado con la dificultad de agregación de las células de PANC-1 entre sí (Figura 30). Sin embargo, en la realización de los estudios de viabilidad celular por CCK8 los resultados obtenidos fueron positivos en todos los fármacos y combinaciones realizadas.

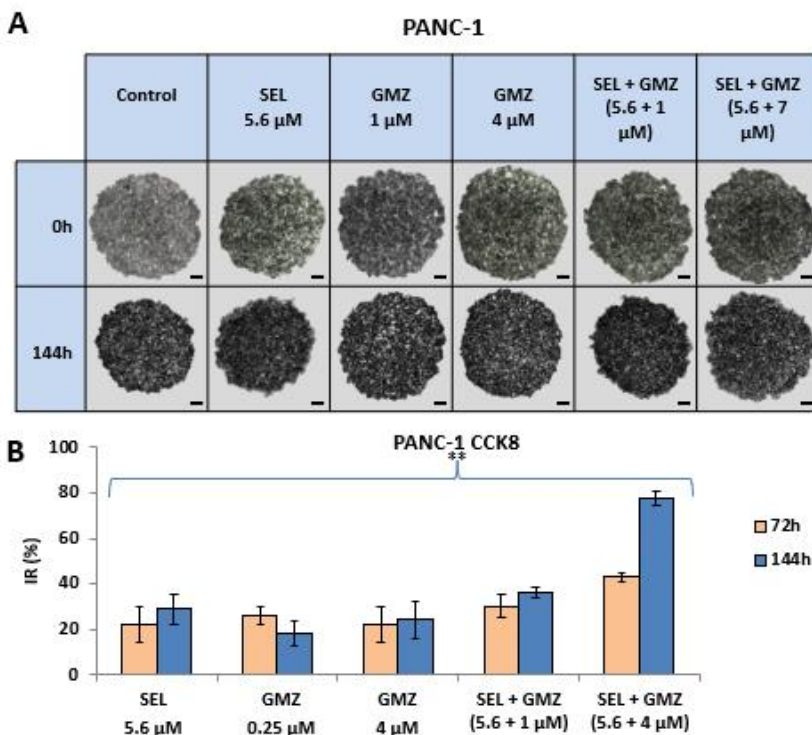


Figura 30. A. Cultivo de MTS de PANC-1 con los diferentes tratamientos a las 0 y 144 h. (B) Análisis de CCK8 en los MTS de PANC-1 a las 72 y 144 h. Los

datos de la inhibición relativa (IR) se presentan como media \pm DE de cultivos replicados. ** $p < 0,01$ vs. en comparación con el grupo de control.

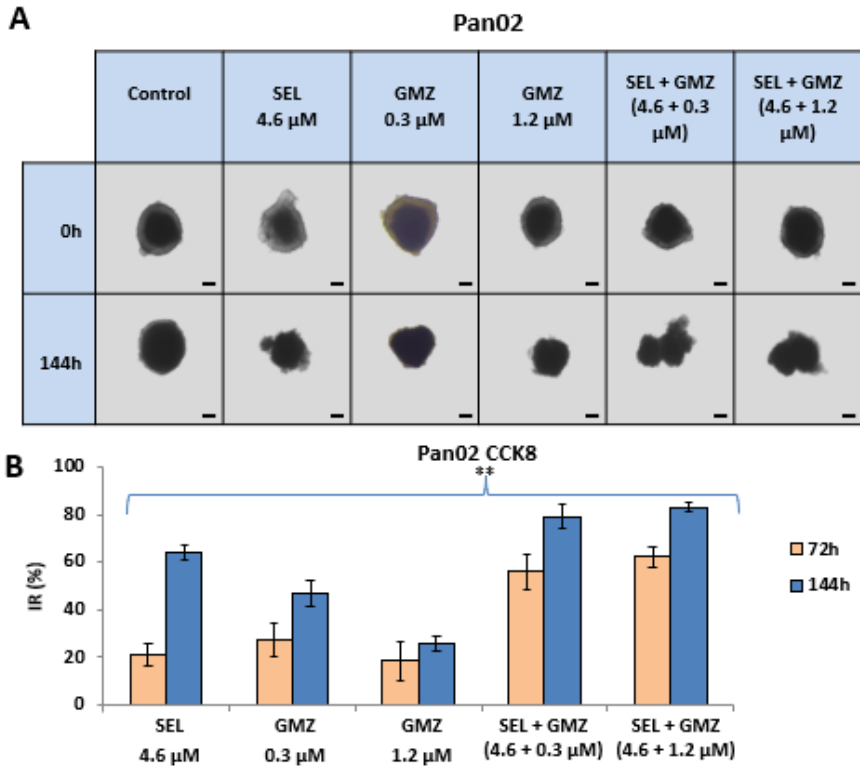


Figura 31. A. Cultivo de MTS de Pan02 con los diferentes tratamientos a las 0 y 144 h. (B) Análisis de CCK8 en los MTS de Pan02 a las 72 y 144 h. Los datos de la inhibición relativa (IR) se presentan como media \pm DE de cultivos replicados. ** $p < 0,01$ vs. en comparación con el grupo de control.

4.8. El selenito sódico disminuye la formación de esferas de CSCs

Como ya se ha comentado, las CSCs son claves para la progresión y el mantenimiento del tumor, por lo que en los últimos tiempos se han erigido como una novedosa diana terapéutica. Para analizar cómo la exposición de las células tumorales al selenito modificaría la capacidad de las CSCs para formar esferas, y por tanto la capacidad proliferativa de las mismas, se indujeron esferas pancreáticas de CSCs con medio condicionado a partir de células PANC-1 y Pano2 pretratadas con selenito y/o GMZ. A las 72h de la inducción, se procedió al contaje de las esferas como se muestra en la gráfica de la Figura 32, podemos apreciar que la formación de esferas disminuyó de forma significativa cuando las células se trataron previamente con selenito a 3 μM (IC25) y GMZ a 0,05 μM (IC10), así como con el tratamiento combinado a ambas dosis, en las dos líneas celulares. Por el contrario, cuando se usó GMZ a 0.25 μM (IC25) en PANC-1, no se observó una reducción significativa en la formación de esferas, algo que sí se observó en Pano2 a GMZ a 0.15 μM (IC25). Al combinar el selenito con ambas dosis de GMZ, se apreció una reducción significativa en la formación de esferoides de CSCs, con valores de 2 esferos/pocillo (selenito 3 μM + GMZ 0.05) respecto a un control que presentaba 5 esferos por pocillo en PANC-1 y de 1

esfero/pocillo en el tratamiento de selenito 3 μM + GMZ 0.05 μM respecto a un control de 10 esferos/pocillo en Pano2. En PANC-1, sin embargo, a pesar de la significación estadística, estas diferencias no fueron pronunciadas, probablemente debido al bajo número de esferoides de CSCs que forma la línea PANC-1 en el grupo control.

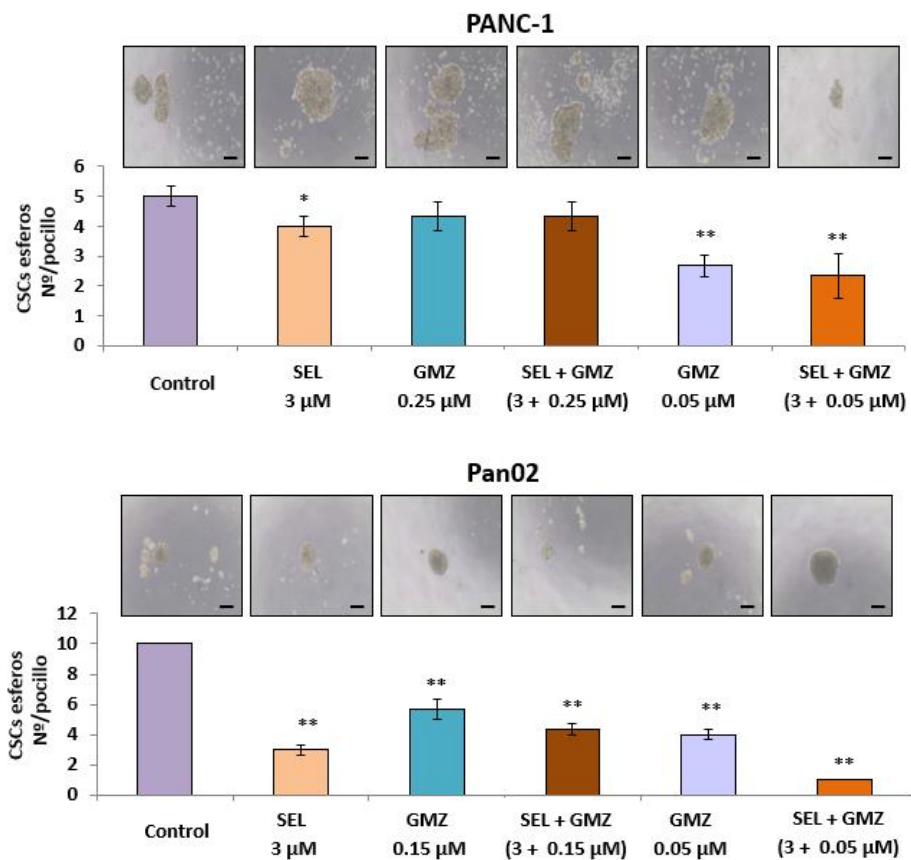


Figura 32. Estudio de la formación de esferas CSCs en PANC-1 y Pano2. Los datos se presentan como media \pm DE de tres experimentos independientes; * $P < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs. en comparación con el grupo de control. GMZ

(gemcitabina); SEL (selenito de sodio). Poner otra gráfica en % de disminución de CSCs.

4.9. El selenito sódico inhibe el crecimiento *in vivo* de tumores pancreáticos generados en animales de experimentación y mejora la supervivencia de los mismos

Al analizar los volúmenes de los tumores subcutáneos de Pan02 a los diferentes días de tratamiento sobre grupos de n=13 ratones cada uno, como se muestra en la Figura 33, los diferentes tratamientos retrasan el crecimiento del tumor a lo largo del tiempo, viéndose esta tendencia a partir del ciclo 6-7 de tratamiento (18-21 días), y traduciéndose la misma en resultados significativos ($p < 0.01$) de inhibición respecto al grupo control en los últimos puntos del experimento (27-30 días). Al analizar con más detenimiento, se comprobó que los ratones tratados con selenito tenían un crecimiento tumoral similar a los tratados con GMZ, lo que suponía un volumen aproximado de 1.100 mm³ al día 27, frente a un volumen de 2.000 mm³ del grupo control. Esta significativa diferencia del volumen se traduce en una reducción aproximada para ambos tratamientos del 40% en el crecimiento tumoral. Al analizar el grupo de ratones que reciben el

tratamiento combinado se observa que esta reducción del volumen es significativa y mayor que la que se obtiene con los tratamientos individuales, presentando los tumores en el grupo de tratamiento combinado un volumen de 650 mm³. Esto se tradujo en un 65% de reducción del crecimiento tumoral con el tratamiento combinado de GMZ con el selenito, frente al 40% que se consigue solo con los tratamientos en monoterapia. Se detectó una reducción significativa en el volumen tumoral de los ratones C57BL / 6 tratados con selenito de sodio + GMZ ($p < 0,01$) en comparación con el grupo no tratado (control) (Figura 33).

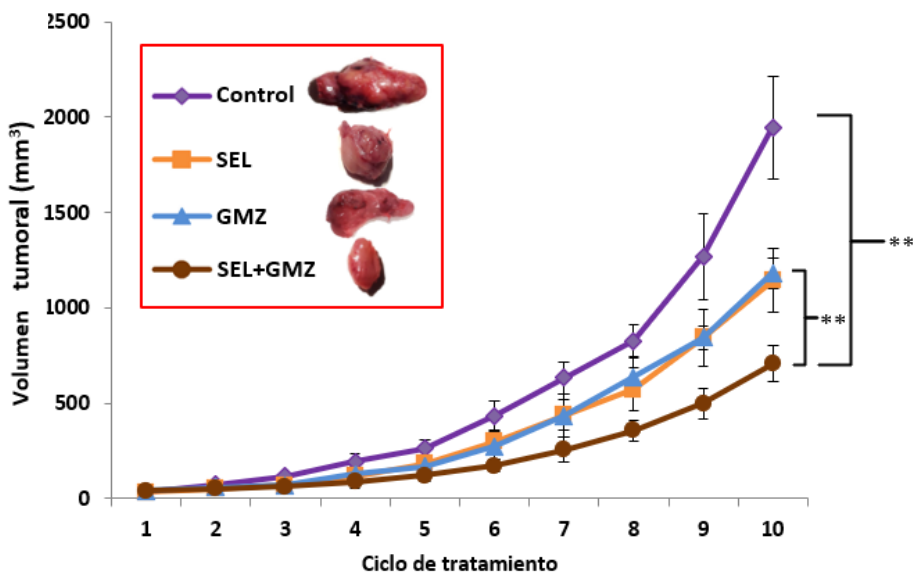


Figura 33. Representación gráfica del crecimiento del volumen del tumor pancreático (Pan02) en los ratones C57BL / 6. Los ratones se trataron con

selenito de sodio, GMZ y selenito de sodio + GMZ. Se utilizaron ratones no tratados como controles. Los datos se presentan como media \pm DE (n = 13). ** inhibición significativa del crecimiento tumoral comparando tratamientos y comparando tratamientos con control (p <0.01).

Al realizar el cálculo del índice volumen/tiempo en mm³/día usamos una medida que nos permitiese conocer la media de la velocidad de crecimiento tumoral en cada uno de los grupos de tratamiento analizados. En el caso de los valores de volumen / tiempo, se observó una reducción significativa en el grupo selenito + GMZ con respecto al resto de tratamientos en monoterapia y en selenito y GMZ en monoterapia con respecto al grupo control. En el grupo de combinación, la reducción del crecimiento tumoral en volumen / tiempo fue superior al 50% en relación con el control (Figura 34).

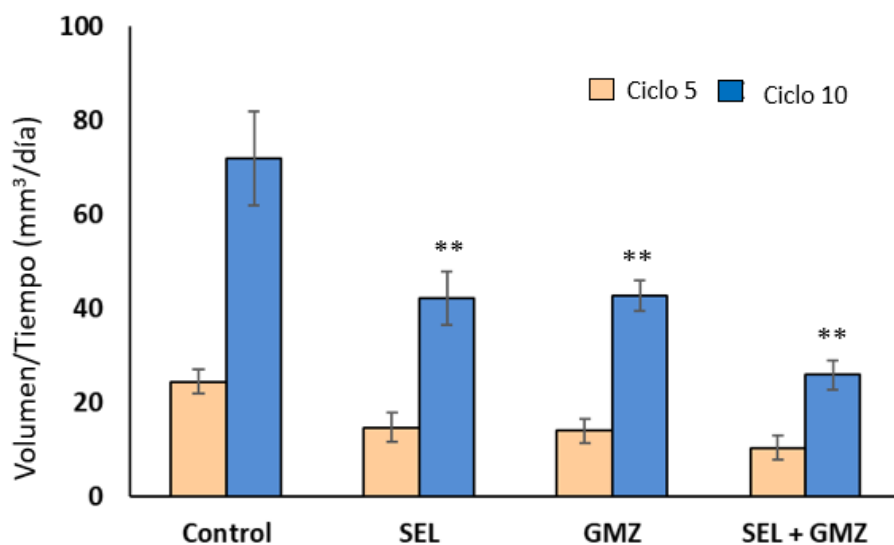


Figura 34. Representación gráfica de los valores de crecimiento tumoral en volumen/tiempo (mm³/día) en los diferentes grupos de tratamiento estudiados. Los datos se presentan como media \pm DE (n = 13). ** inhibición significativa del crecimiento tumoral comparando tratamientos y comparando tratamientos con control (p < 0.01).

En cuanto a supervivencia, tal y como se puede apreciar en la curva de Kaplan-Meier (Figura 35), la generación del tumor se asoció a una supervivencia del 20% en el grupo control al final del tratamiento (30 días). Esta tendencia mejora al aplicar los tratamientos con selenito, 60% de ratones vivos al final del experimento, y con GMZ (60%) por lo que los tratamientos individuales mejoraban la supervivencia. Además, la curva de Kaplan-Meier mostró un aumento de cuatro veces en la

fracción de ratones supervivientes cuando se trató con selenito + GMZ en comparación con los ratones no tratados (75% frente a 20% del control) y de 2,5 veces en con los tratados con monoterapia (GMZ o selenito) ($p < 0.05$) (Figura 35).

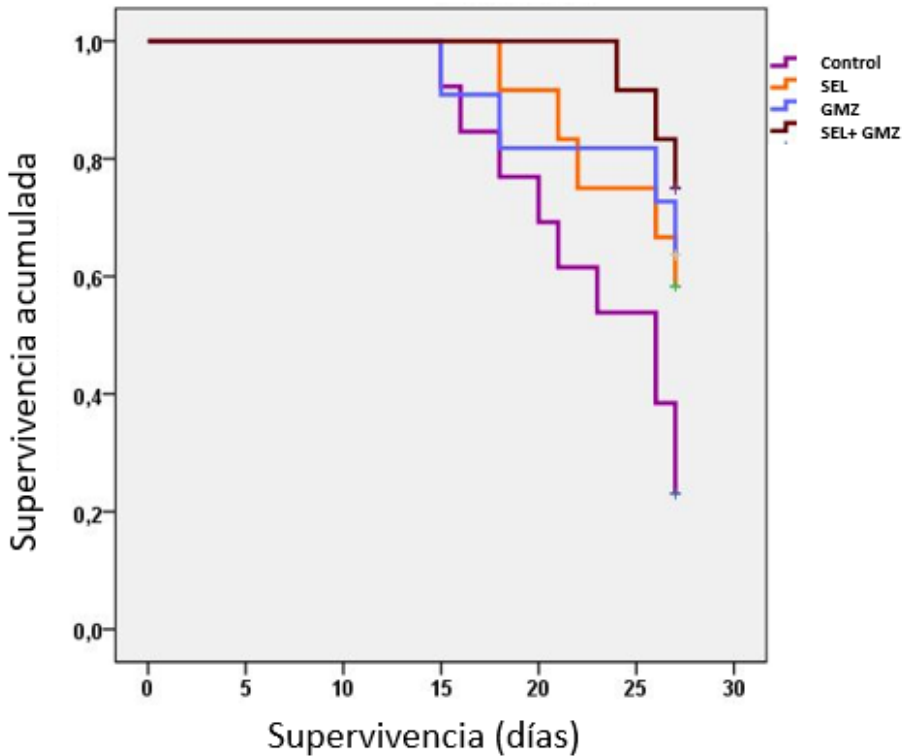


Figura 35. Curvas de Kaplan-Meier de los ratones de los diferentes grupos del ensayo. Los datos de supervivencia se analizaron para los ratones de cada grupo. La comparación entre los grupos de tratamiento se realizó mediante la prueba de rango logarítmico. GMZ (gemcitabina); SEL (selenito de sodio).

Por último, se analiza el estudio paralelo utilizando el sistema IVIS que se llevó a cabo en tumores generados en ratones albinos C57BL / 6 sometidos a los mismos tratamientos que los pardos. En las imágenes obtenidas en el IVIS, el tejido tumoral se pone de manifiesto con una tonalidad roja, reflejo del metabolismo de la glucosa marcada por parte de las líneas tumorales y que da señal fluorescente. Como se muestra en la Figura 36, aunque se detectó una respuesta parcial, que se traduce en una menor área marcada, en ratones tratados con ambas monoterapias (selenito de sodio y GMZ) después de 10 ciclos, la mayor respuesta se observó con el uso de selenito + GMZ. Este análisis por imagen se reflejó en el tamaño de los tumores extraídos a tiempo final (Figura 33), que demostró un tamaño significativamente menor de los tumores extirpados en ratones tratados con la terapia combinada (selenito de sodio + GMZ) en comparación con los tratamientos de monoterapia (Figura 36).

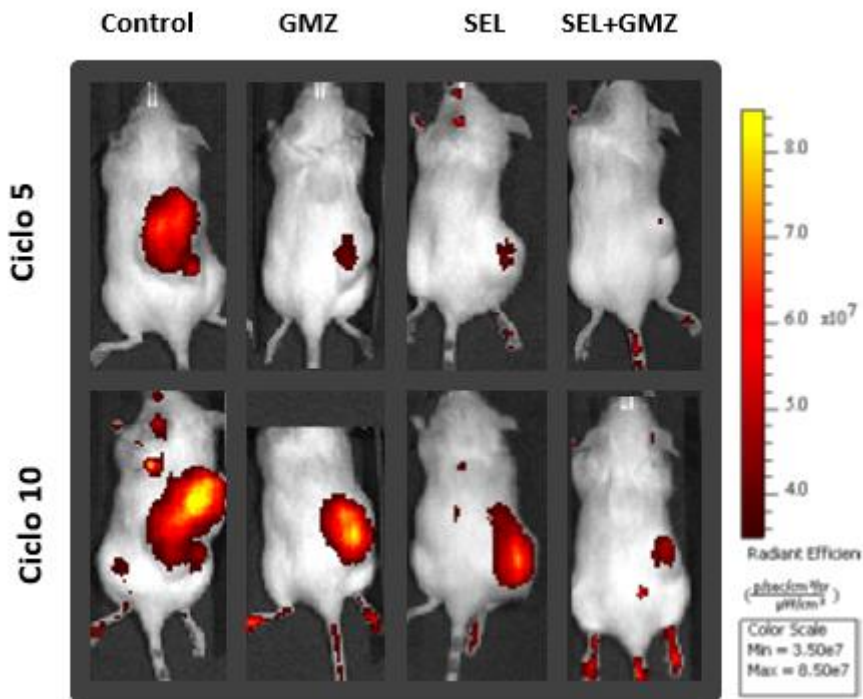


Figura 36. Análisis por IVISpectrum de ratones después de diferentes protocolos de tratamiento (5 y 10 ciclos). Las imágenes se obtuvieron después de 3 h de la inyección de (DG) -750.

4.10. El tratamiento con el selenito incrementa la muerte celular y reduce marcadores tumorales en los tejidos tumorales *in vivo*

Una vez reseca los tumores, se realizaron tinciones histológicas básicas (hematoxilina-eosina), histoquímica (nuevo

método pentacrómico), para visualizar la conformación tisular del tumor, e inmunofluorescencia para los marcadores tumorales Ki67 y MMP9. Al analizar los controles, se observa un tumor con gran celularidad que presenta vasos sanguíneos inmersos en una gran masa celular y una cápsula colágena. En los ratones tratados, la hematoxilina-eosina mostró el predominio de amplias áreas de necrosis acidófilas en los tumores tratados con selenito de sodio. Por el contrario, la monoterapia con GMZ indujo un número mucho mayor de vasos sanguíneos que no se detectaron con el empleo del tratamiento con selenito + GMZ. La tinción pentacrómica apoyó estos resultados, mostrando un aumento significativo en la angiogénesis después de una monoterapia con GMZ, pero no después del tratamiento con selenito + GMZ (Figura 37). Por tanto, en general se consigue un incremento de la necrosis con los tratamientos en los tejidos tumorales, pero en el caso de la GMZ este va asociado con un incremento en la vascularización. Al combinar la GMZ con el selenito, esta vascularización se pierde y además se mantiene el efecto antitumoral.

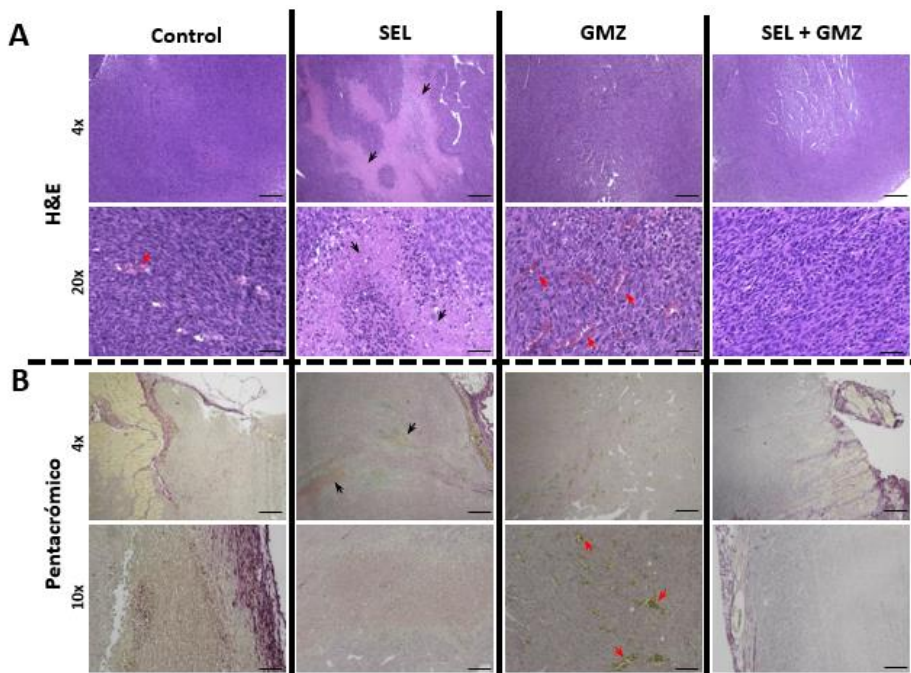


Figura 37 Análisis histológico de los tumores resecados mediante tinciones histológicas básicas. (A) Muestras teñidas con hematoxilina-eosina de los diferentes grupos de tratamiento (aumento de 4 × y 20 ×). (B) muestras teñidas con el nuevo método pentacrómico (4 × y 10 ×). Barra de escala 4 × (200 μM), 10 × (150 μM) y 20 veces (50 μM). GMZ (gemcitabina); SEL (selenito de sodio). Este método destaca la visualización de vasos sanguíneos con glóbulos rojos en el interior amarillo y capas delgadas de colágeno en la íntima.

Por último, al analizar en los tejidos tumorales de los ratones la presencia de marcadores tumorales por inmunofluorescencia, se detectó una reducción significativa en la expresión de Ki67 después de la terapia

combinada en comparación con el control (reducción de 3,44 veces). Esta reducción también se dio en la monoterapia con selenito y GMZ (2,63 y 1,5 de reducción, respectivamente), pero en menor grado. Esto indica que los tratamientos con GMZ y selenito reducen la proliferación del tumor, que se traduce en una menor agresividad del mismo, y que esta reducción es más notable en el tratamiento combinado. Además, el análisis de la expresión de MMP9 mostró una fuerte disminución del mismo en todos los tratamientos ensayados en comparación con las muestras tumorales control (Figura 38).

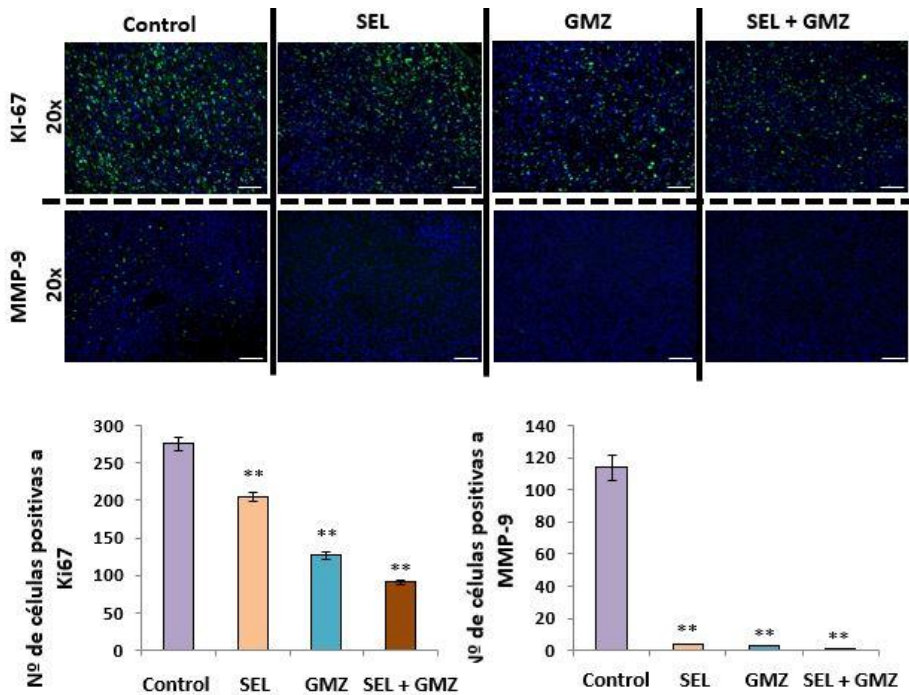


Figura 38. Tinción de inmunofluorescencia para Ki67 y MMP9 a 20 ×. La representación gráfica de los datos positivos de tinción de inmunofluorescencia

se presenta como media \pm cuantificación mediante la desviación estándar de la Imagen J. de tres experimentos independientes; ** $p < 0,01$ vs. en comparación con el grupo de control. Barra de escala 4 \times (200 μM), 10 \times (150 μM) y 20 veces (50 μM). GMZ (gemcitabina); SEL (selenito de sodio).

5. DISCUSIÓN

El selenio, un cofactor crucial para los sistemas antioxidantes endógenos y del cual el selenito sódico es una de sus formas de presentación, tiene una acción controvertida en el cáncer. Por un lado, su deficiencia podría estar asociada a un aumento de la incidencia de cáncer, como por ejemplo el cáncer de colon, pulmón y estómago (Brodin y cols., 2015; Kieliszek y cols., 2017). Pero también, el selenio puede tener un papel relevante en la terapia contra el cáncer gracias a su acción al asociarse a fármacos quimioterapéuticos convencionales, ya que se ha demostrado que mejora la eficacia del tratamiento o reduce sus efectos secundarios. Por ejemplo, la suplementación con selenio en nanopartículas disminuye la diarrea por quimioterapia en modelos murinos (Sun y cols., 2019). Otros estudios, como los desarrollados por Lee y cols. (2017) describen el papel del selenio en la prevención de la mucositis inducida por quimioterapia en animales de experimentación (Lee y cols., 2017).

En este contexto, en esta tesis analizamos el tratamiento con selenito sódico para el cáncer de páncreas, solo y en asociación con el tratamiento estándar con GMZ. Estudios *in vitro* previos de otros autores demostraron que el selenito de sodio presenta una actividad antitumoral relevante en varios tipos de tumores, incluidos el linfoma, la leucemia, el carcinoma gástrico, colorrectal y el mesotelioma (Z. Li y cols., 2013; Olm, 2009; Olm y cols., 2009; Spyrou y cols., 1996; Tan y

cols., 2019; Wallenberg y cols., 2014), con una IC₅₀ que puede variar de 1 a 20 μM dependiendo del tipo tumoral. Los resultados obtenidos en nuestras líneas celulares PANC-1 y Pano2 son también muy positivos, con valores de IC₅₀ de 5.6 y 4.6 μM , respectivamente, lo que indica que las células de cáncer de páncreas son muy sensibles al tratamiento con selenito, comparándose los valores de IC₅₀ a los de los fármacos de elección, como por ejemplo en nuestro caso la GMZ con una IC₅₀ de 1 y 0.3 μM para estas líneas.

Tanto las concentraciones previas utilizadas en cultivos por otros autores como las nuestras, fueron significativamente más bajas que la dosis máxima tolerada (MTD) en un ensayo clínico de fase 1 (ensayo clínico controlado) con principalmente pacientes con cáncer de pulmón (Brodin y cols., 2015). En este ensayo además se obtuvieron algunas respuestas tumorales, la más destacable en un paciente con cáncer etmoidal metastásico. Asimismo, este ensayo, valora la toxicidad tras administrar selenito, y quimioterapia tras el mismo. La MTD de selenito es de 10 mg/m², dosis con la cual se logran concentraciones plasmáticas de entre 15 y 25 μM , las cuales son muy activas en la mayor parte de las líneas celulares tumorales estudiadas.

Por ejemplo, diversos autores han publicado estudios *in vitro* e *in vivo* en los que demuestran el poder del selenito sódico para potenciar

la acción del cisplatino, la carmustina o la adriamicina en líneas celulares y modelos murinos de cáncer de ovario, próstata y estómago respectivamente (Caffrey & Frenkel, 2012; Thamilselvan y cols., 2016; Yang y cols., 2016; Tan y cols., 2019). En nuestros resultados, el selenito también pudo mejorar la actividad de los agentes clásicos utilizados en el tratamiento del cáncer de páncreas, como la GMZ. Se observó un efecto sinérgico antitumoral significativo ($IC_{50} < 1$) cuando se asociaron diferentes dosis citotóxicas de selenito y GMZ en las líneas celulares de adenocarcinoma pancreático PANC-1 y Pan02, lo cual es bastante positivo en la terapia de combinación.

Una vez que demostramos el efecto *in vitro* del selenito de sodio solo y en terapia combinada con GMZ procedimos a profundizar más en las bases moleculares de su efecto celular.

El mecanismo de acción y la selectividad del selenito contra los tumores siguen sin estar claros, pero existen teorías que creen que podrían deberse a los mecanismos moleculares intrínsecos de las células y al microambiente tumoral.

De hecho, en relación al microambiente tumoral, Olm y cols. (2009) demostraron que existe un proceso de reducción de selenito a biseleniuro (HSe^-) en el ambiente ácido del tumor. Este proceso conduce

a una activación del selenito de sodio, que hace que la membrana celular sea más permeable a él, y por lo tanto se acumule más en el interior celular en los microambientes tumorales (bajo pH y elevado poder reductor). En gran parte este hecho es debido a los mecanismos de resistencia a fármacos, por ejemplo, la proteína transportadora MRP. En el caso concreto de MRP, ésta favorece la acción del selenito al disminuir el glutatión reducido dentro de las células tumorales debido a su expulsión al entorno extracelular. Esto incrementa el poder reductor en el exterior celular favoreciendo la reducción del selenito y su penetración como biselenuro a través de la membrana plasmática (Olm, y cols., 2009).

Esto tendría sentido, ya que, en general las células de cáncer de páncreas han mostrado por lo general una expresión elevada de MRP (O'Driscoll y cols., 2007). De hecho, en nuestro caso concreto, las líneas celulares de cáncer de páncreas PANC-1 y Pano2 utilizadas en nuestro estudio se caracterizaron por una alta expresión de MRP (Gock y cols., 2013; Miller y cols., 1999). La expresión de MRP puede favorecer la incorporación en selenito y la selectividad por células tumorales, lo que podría explicar la sensibilidad de las células de cáncer de páncreas al selenito tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*. Esto concuerda con nuestros resultados *in vitro* que han demostrado que PANC-1 y Pano2 son muy sensibles al tratamiento con selenito.

Uno de los primeros pasos que realizamos para dilucidar como afecta el selenito a la dinámica celular fue estudiar el ciclo celular y el estado del potencial de membrana tras el tratamiento con el selenito. Los resultados del ciclo celular no mostraron cambios significativos entre las células tratadas con selenito y el grupo control. Por el contrario, el análisis del potencial de la membrana mitocondrial, demostró una mayor despolarización mitocondrial en las células tratadas con selenito sódico lo que nos hace pensar que el selenito de sodio provocó una muerte celular mediada por un mecanismo apoptótico o similar a la apoptosis. Estudios previos, como el desarrollado por Soukupová y cols. (2019) demostraron que el selenito de sodio a dosis citotóxicas disminuyó el potencial de membrana mitocondrial, pero esta alteración no fue capaz de activar la caspasa 3 de manera significativa, haciendo pensar en una ruta de muerte diferente a la mediada por esta caspasa (Soukupová & Rudolf, 2019). Uno de los mecanismos alternativos a esta ruta es la muerte celular por *parp*-tánatos o muerte celular producida por PARP, que se activa cuando se ha reparado un daño extenso al DNA mediante el mecanismo de escisión de bases (David y cols., 2009). La citotoxicidad mediada por selenito, que provoca una depleción de glutatión y tiorredoxina reducidos, deja la célula indefensa ante el estrés oxidativo, lo que podría activar este mecanismo de muerte celular (Olm, 2009). Nuestros estudios mostraron que la muerte celular mediada por

PARP podría estar involucrada en la muerte celular de tipo apoptótico inducida por selenito de sodio.

De hecho, nuestros resultados han mostrado que la inhibición de PARP por benzamida redujo significativamente el efecto antitumoral del selenito. Además, también se detectó una translocación nuclear de la proteína AIF en células tumorales tratadas con selenito. Este factor es el efector de la parp-tánatos. Se localiza a nivel mitocondrial y se transloca al núcleo cuando se activa esta vía de muerte celular. Como era de esperar, esta translocación no se detectó en el tratamiento combinado con benzamida, lo que respalda de forma bastante probable la posible participación de PARP en el mecanismo de acción del selenito.

En base a nuestros resultados, y como se muestra en la Figura 39, hemos desarrollado un esquema con varios mecanismos moleculares que podrían estar involucrados en la acción antitumoral del selenito de sodio en las células de cáncer de páncreas y acabar provocando la muerte por parp-tánatos. La descripción de este esquema es que la GMZ ingresa al citoplasma celular y posteriormente es detoxificada por el sistema MRP conjugada con glutatión reducido (GSH). El selenito de sodio (SeO_3^{2-}) se reduce a biseleniuro (HSe^-) por el GSH, que es expulsado debido al proceso de detoxificación celular a través del sistema MRP. Una vez dentro del citoplasma celular, el

biselenuro agota el GSH y disminuye la tiorredoxina reducida (TRX-H), dejando a la célula indefensa frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS) e incrementando sus niveles. Las ROS causan daño al ADN, que es reparado por la polimerasa poli-ADP-ribosa (PARP), lo que resulta en una sobreactivación de esta enzima. La benzamida (BNZ) inhibe la PARP, así como los procesos posteriores de reparación y muerte celular inducidos por esta enzima. La acumulación de daño en el ADN debido a los ROS activaría PARP para iniciar la translocación del factor inductor de apoptosis (AIF) de la mitocondria al núcleo celular, induciendo la muerte celular por parp-tánatos.

La GMZ es un agente quimioterapéutico que induce la apoptosis mediante la activación de fosfo-p38. Como se muestra en la Figura 39, el selenito disminuye la TRX-H y libera el factor ASK1, que fosforila p38. La sinergia entre SeO_3^{2-} y GMZ podría estar relacionada con este último mecanismo. El selenito provoca una disminución en los niveles intracelulares de tiorredoxina reducida, que normalmente bloquea el factor ASK1. En este caso, este factor se libera y es capaz de activar p38 (por fosforilación), que induce la muerte celular por apoptosis (Hsieh & Papaconstantinou, 2006). Se ha demostrado que p38 es la proteína que media la apoptosis inducida por GMZ (Habiro y cols., 2004). Según nuestros resultados, la asociación de selenito y GMZ indujo una

activación de p38 mayor que ambas monoterapias, lo que podría explicar la sinergia entre dosis citotóxicas de selenito y GMZ.

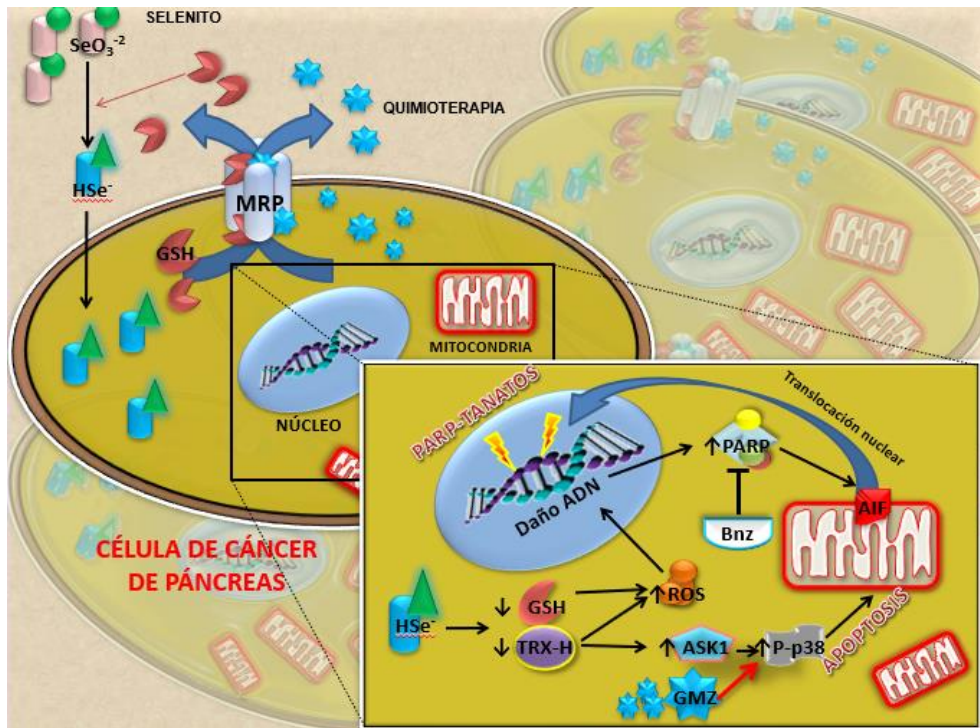


Figura 38. Esquema de los posibles mecanismos moleculares implicados en la actividad antitumoral del selenito de sodio en células de cáncer de páncreas. Este modelo resume los mecanismos por los cuales el selenito puede inducir la muerte celular en las células tumorales y formula hipótesis sobre el efecto antitumoral sinérgico que se produce cuando se asocian selenito y GMZ.

En cuanto a la modificación que el selenito pudiese provocar en la agresividad tumoral de los cultivos celulares, los ensayos de migración

y formación de colonias indicaron que tanto el selenito como su combinación con GMZ redujeron significativamente estos parámetros en relación con el grupo control y la GMZ (aun cuando ésta última provocó una mayor migración de las células PANC-1 y Pano2), lo que sugiere una disminución de la agresividad en células de cáncer de páncreas por parte del selenito. El aumento paradójico de la migración tumoral por GMZ ha sido descrito por Xu y cols (2016) y está relacionado con la activación de las vías de EGFR y STAT3 por este fármaco, por lo que la terapia combinada con el selenito podría reducir este efecto del tratamiento normal con GMZ (Xu y cols., 2016). Respecto a la capacidad de formación de colonias de estas células, tanto el selenito de sodio como la GMZ mostraron un efecto inhibitor en las células Pano2, aunque este efecto no se pudo demostrar en las células PANC-1. El motivo por el que los efectos son visibles sobre todo en Pano2 podría estar relacionado con el hecho de que las células Pano2 presentan características morfológicas mesenquimales y mutaciones en SMAD4 (alteraciones en la vía TGF-beta), mientras que las células PANC-1 presentan una morfología epitelioide y mutaciones en KRAS y TP53 (Deer y cols., 2010; Wang y cols., 2012). Esto haría que las células de la línea Pano2 se comporten de una forma más mesenquimal (mayor migración y formación de colonias) respecto a la PANC-1, lo que tendría implicaciones de cara a los estudios de colonias y migración celular, por

lo que los efectos de los fármacos (GMZ y selenito) a estos niveles serían más evidentes en esta línea.

Otra acción del selenito que hemos visto en esta tesis es a nivel de la influencia del mismo sobre la neovascularización. El selenito demostró una disminución en la formación de vasos sanguíneos cuando se realizó un ensayo de angiogénesis usando los factores liberados al medio por células Pano2. Este efecto en la reducción de la vascularización también se manifestó *in vivo*, observándose mediante métodos histológicos que los tumores de los ratones tratados con el selenito (solo y en combinación) mostraban un menor número de vasos sanguíneos (Figura 37). El efecto antiangiogénico del selenito fue descrito en estudios *in vitro* e *in vivo* por Saeed y cols. (2019) en cáncer de colon (Saeed Ali y cols., 2019).

Como ya hemos señalado anteriormente, el actuar sobre las CSCs es clave para un tratamiento antitumoral efectivo y es el talón de Aquiles de muchas de las terapias actuales. Nuestros ensayos sobre la capacidad de formar esferas de CSCs por parte de las líneas de cáncer de páncreas después del tratamiento mostraron que el selenito afecta más a este tipo de población celular, reduciendo el número de esferas formadas después del tratamiento previo con selenito y con selenito + GMZ. La sensibilidad de las CSCs al tratamiento con selenito podría estar

relacionada con el aumento de la sensibilidad de las CSCs al estrés oxidativo, como lo describen Liu y Wang (2015), lo que las haría más susceptibles a los radicales libres que producen la células tratadas con selenito (Liu & Wang, 2015). Respecto a nuestros resultados con la GMZ, tanto sola como en terapia combinada, en las CSCs de PANC-1 y Pano2, la GMZ 0.05 μM mostró mayor inhibición que GMZ 0.25 μM ó 0.15 μM (tanto sola como en combinación con el selenito), un hallazgo paradójico que podría estar relacionado con su alta citotoxicidad contra poblaciones sensibles de CSCs y con la alta actividad del reemplazo de CSCs resistentes a GMZ 0.25 μM ó 0.15 μM . Serían necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis.

Por otro lado, el selenito indujo una inhibición significativa del crecimiento de los MTS derivados de células de cáncer de páncreas, un sistema *in vitro* que imita los tumores *in vivo*. Este efecto puede estar relacionado con la alta capacidad de difusión del selenito y el menor pH dentro del esferoide tumoral, lo que lo haría más susceptible al tratamiento (Olm, 2009).

Finalmente, hasta la fecha, este es el primer estudio experimental que utiliza selenito *in vivo* contra el cáncer de páncreas, como ya hemos indicado antes, un tumor quimiorresistente con mal pronóstico y opciones de tratamiento limitadas. Los ensayos *in vivo* de

tumores pancreáticos subcutáneos inducidos con la línea Pano2 en ratones, corroboraron claramente la actividad antitumoral del selenito, tanto solo como en combinación con GMZ.

Usando dosis y ciclos de selenito y GMZ en un rango comúnmente usado en otros estudios con ratones (Espey y cols., 2011), hemos demostrado que el selenito por sí solo tiene un marcado efecto antitumoral, semejante incluso al tratamiento individual con la GMZ. Otro hallazgo encontrado es que la combinación de selenito + GMZ fue más efectiva en términos de disminución del crecimiento tumoral, aumento de supervivencia, respuesta metabólica por IVIS, expresión de marcadores tumorales y formación de vasos, en comparación con el resto de tratamientos, incluida la monoterapia con GMZ. El potencial antitumoral *in vivo* del selenito asociado con otros agentes antitumorales (p. Ej., Carmustina o cisplatino) se ha demostrado en tumores de próstata, ovario y colon (Caffrey & Frenkel, 2012; Thamilselvan y cols., 2016; Yang y cols., 2016). Caffrey y cols. (2012) mostraron que el selenito de sodio (1,5 mg / kg) en combinación con cisplatino, pero no en monoterapia, era eficaz en el cáncer de ovario, consiguiendo una inhibición del 75% respecto al control. Además, Thamilselvan y cols. (2016) mostraron que la asociación de selenito (1,5 mg / kg) y carmustina indujo un mayor efecto antitumoral contra el cáncer de próstata que ambas monoterapias, aunque no se detectó

ningún efecto sinérgico. Este estudio también reveló una actividad antitumoral significativa del selenito contra el cáncer de próstata, pero menor que la de la carmustina. Los tiempos de tratamientos de estos autores han sido similares a los nuestros, en torno a las 4-5 semanas. Aunque nuestros resultados son con dosis más altas de selenito de (3 mg / kg), esta dosis está bien tolerada y no ha mostrado efectos secundarios al no mostrar síntomas los ratones de pérdida de peso o apetito tanto en el tratamiento con el selenito solo como combinado con la GMZ. Respecto a los resultados obtenidos, el selenito en monoterapia ha demostrado ser un tratamiento con un 40% de disminución respecto al control en cuanto a volumen tumoral y un 60% de supervivencia de los ratones al final del experimento respecto a un 20% en el control. Además, en terapia combinada, estos parámetros mejoraban aún más que los tratamientos individuales con incrementos de supervivencia del 75% de ratones vivos al final del experimento y reducción significativa del volumen tumoral (65%) en comparación con las monoterapias (es decir, GMZ o selenito con un 40% de reducción respecto al control cada una de ellas).

Pero no solo mejoraron los indicadores anteriores, sino que el análisis histológico verificó que los tratamientos con selenito y selenito + GMZ disminuyeron la expresión de marcadores de proliferación celular (es decir, Ki67) y que ambos tratamientos pudieron inhibir

MMP9, una proteína estrechamente relacionada con la invasividad del cáncer de páncreas. Además, el selenito demostró una fuerte capacidad de actividad necrótica y antiangiogénica, que no se observa con GMZ como monoterapia. De hecho, Saeed y cols. (2019) ya describieron la capacidad antiangiogénica del selenito en los tumores de colon, que se correlaciona con la disminución en la expresión de factores proangiogénicos como el VEGF, en las muestras analizadas (Saeed Ali y cols., 2019).

En esta tesis doctoral, se demuestra por primera vez el efecto antitumoral del selenito de sodio contra el cáncer de páncreas en cultivos celulares y modelos tridimensionales *in vitro*, así como en ensayos *in vivo* con modelos murinos. Además, el selenito no solo mostró un efecto antitumoral como monoterapia, sino también en combinación con GMZ, demostrando un efecto sinérgico con la GMZ, y no restando efecto a esta.

El selenito activa mecanismos de muerte celular en las células tumorales (como parp-tánatos o muerte celular mediada por AIF) diferentes a los activados por los agentes quimioterapéuticos tradicionales, sugiriendo que el selenito podría ser una terapia adyuvante que ayudaría superar los fenómenos de resistencia a los fármacos tradicionales al presentar otras vías de actuación frente a las

cuales las células tumorales no desarrollarían una resistencia derivada del tratamiento con la quimioterapia tradicional.

Además, el selenito demostró un efecto significativo contra procesos críticos en la progresión tumoral, como la formación de colonias, la migración o la capacidad formar esferas de CSCs. Los ensayos *in vivo* demostraron la eficacia del selenito (solo y en combinación con GMZ) para aumentar la supervivencia y reducir significativamente el volumen del tumor y la expresión de marcadores relacionados con la agresividad y la progresión del tumor.

En base a estos resultados y, teniendo en cuenta el mal pronóstico y la quimiorresistencia del cáncer pancreático, el selenito de sodio podría considerarse como un agente antitumoral prometedor contra el cáncer de páncreas, ya sea solo o en combinación con GMZ. Sin embargo, serán necesarios más estudios en el futuro y ensayos clínicos para determinar la plausibilidad de su aplicabilidad clínica.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas a partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral son las siguientes:

1. El selenito sódico presenta una potente actividad antitumoral *in vitro* frente a las líneas celulares de adenocarcinoma pancreático PANC-1 y Pan02.
2. El selenito sódico actúa mediante la activación de la ruta de muerte celular tumoral conocida como *parp-tánatos*, la cual se encuentra mediada por la translocación nuclear del factor AIF.
3. La combinación del selenito sódico con el agente quimioterápico antimetabolito gemcitabina resulta en una sinergia antitumoral *in vitro*, la cual es explicada por la activación de la proteína p38, responsable de fenómenos apoptóticos.
4. El selenito sódico disminuye la agresividad de las líneas tumorales de páncreas PANC-1 y Pan02, ya que disminuye la formación de colonias, la migración y la proliferación de las CSCs *in vitro*, solo y en combinación con gemcitabina.

5. El selenito sódico, solo y en combinación con gemcitabina, tiene capacidad antitumoral *in vivo* disminuyendo de forma significativa el crecimiento, la actividad metabólica y los parámetros de agresividad tumoral e incrementando la supervivencia de ratones con tumores subcutáneos de la línea Pano2.
6. El selenito sódico, solo y en combinación con gemcitabina, disminuye los fenómenos de angiogénesis tumoral en los ensayos realizados *in vitro* y en los realizados *in vivo* con animales de experimentación.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abrams, R. A., Lowy, A. M., O'Reilly, E. M., Wolff, R. A., Picozzi, V. J., & Pisters, P. W. T. (2009). Combined modality treatment of resectable and borderline resectable pancreas cancer: Expert consensus statement. *Annals of Surgical Oncology*, *16*(7), 1751-1756. <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0413-9>
- Al-Hawary, M. M., Francis, I. R., Chari, S. T., Fishman, E. K., Hough, D. M., Lu, D. S., Macari, M., Megibow, A. J., Miller, F. H., Mortelet, K. J., Merchant, N. B., Minter, R. M., Tamm, E. P., Sahani, D. V., & Simeone, D. M. (2014). Pancreatic ductal adenocarcinoma radiology reporting template: Consensus statement of the Society of Abdominal Radiology and the American Pancreatic Association. *Radiology*, *270*(1), 248-260. <https://doi.org/10.1148/radiol.13131184>
- American Cancer Society*. (2021). <https://www.cancer.org>
- Arneth, B. (2019). Tumor Microenvironment. *Medicina*, *56*(1). <https://doi.org/10.3390/medicina56010015>
- Assifi, M. M., Lu, X., Eibl, G., Reber, H. A., Li, G., & Hines, O. J. (2011). Neoadjuvant therapy in pancreatic adenocarcinoma: A meta-analysis of phase II trials. *Surgery*, *150*(3), 466-473. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2011.07.006>

- Barbato, L., Bocchetti, M., Di Biase, A., & Regad, T. (2019). Cancer Stem Cells and Targeting Strategies. *Cells*, 8(8).
<https://doi.org/10.3390/cells8080926>
- Bartsch, D. K., Gress, T. M., & Langer, P. (2012). Familial pancreatic cancer—Current knowledge. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 9(8), 445-453. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.111>
- Binnewies, M., Roberts, E. W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D. F., Merad, M., Coussens, L. M., Gaborilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C. C., Vonderheide, R. H., Pittet, M. J., Jain, R. K., Zou, W., Howcroft, T. K., Woodhouse, E. C., Weinberg, R. A., & Krummel, M. F. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature Medicine*, 24(5), 541-550.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x>
- Bipat, S., Phoa, S. S. K. S., van Delden, O. M., Bossuyt, P. M. M., Gouma, D. J., Laméris, J. S., & Stoker, J. (2005). Ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging for diagnosis and determining resectability of pancreatic adenocarcinoma: A meta-analysis. *Journal of Computer Assisted Tomography*, 29(4), 438-445.
<https://doi.org/10.1097/01.rct.0000164513.23407.b3>
- Blackford, A., Serrano, O. K., Wolfgang, C. L., Parmigiani, G., Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Eshleman, J. R., Goggins, M., Jaffee, E. M., Iacobuzio-Donahue, C. A., Maitra, A., Cameron, J. L., Olino, K., Schulick, R., Winter, J., Herman, J. M., ... Hruban, R. H.

(2009). SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(14), 4674-4679. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0227>

Bockhorn, M., Uzunoglu, F. G., Adham, M., Imrie, C., Milicevic, M., Sandberg, A. A., Asbun, H. J., Bassi, C., Büchler, M., Charnley, R. M., Conlon, K., Cruz, L. F., Dervenis, C., Fingerhutt, A., Friess, H., Gouma, D. J., Hartwig, W., Lillemoe, K. D., Montorsi, M., ... International Study Group of Pancreatic Surgery. (2014). Borderline resectable pancreatic cancer: A consensus statement by the International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS). *Surgery*, 155(6), 977-988. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2014.02.001>

Brodin, O., Eksborg, S., Wallenberg, M., Asker-Hagelberg, C., Larsen, E. H., Mohlkert, D., Lenneby-Helleday, C., Jacobsson, H., Linder, S., Misra, S., & Björnstedt, M. (2015). Pharmacokinetics and Toxicity of Sodium Selenite in the Treatment of Patients with Carcinoma in a Phase I Clinical Trial: The SECAR Study. *Nutrients*, 7(6), 4978-4994. <https://doi.org/10.3390/nu7064978>

Burris, H. A., Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., Cripps, M. C., Portenoy, R. K., Storniolo, A. M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F. A., Stephens, C. D., & Von Hoff, D. D. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A

randomized trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 15(6), 2403-2413.
<https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.6.2403>

Caffrey, P. B., & Frenkel, G. D. (2012). Selenite enhances and prolongs the efficacy of cisplatin treatment of human ovarian tumor xenografts. *In Vivo (Athens, Greece)*, 26(4), 549-552.

Callery, M. P., Chang, K. J., Fishman, E. K., Talamonti, M. S., William Traverso, L., & Linehan, D. C. (2009). Pretreatment assessment of resectable and borderline resectable pancreatic cancer: Expert consensus statement. *Annals of Surgical Oncology*, 16(7), 1727-1733.
<https://doi.org/10.1245/s10434-009-0408-6>

Chauffert, B., Mornex, F., Bonnetain, F., Rougier, P., Mariette, C., Bouché, O., Bosset, J. F., Aparicio, T., Mineur, L., Azzedine, A., Hammel, P., Butel, J., Stremsdoerfer, N., Maingon, P., & Bedenne, L. (2008). Phase III trial comparing intensive induction chemoradiotherapy (60 Gy, infusional 5-FU and intermittent cisplatin) followed by maintenance gemcitabine with gemcitabine alone for locally advanced unresectable pancreatic cancer. Definitive results of the 2000-01 FFCD/SFRO study. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 19(9), 1592-1599.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdn281>

Chmielecki, J., Hutchinson, K. E., Frampton, G. M., Chalmers, Z. R., Johnson, A., Shi, C., Elvin, J., Ali, S. M., Ross, J. S., Basturk, O.,

- Balasubramanian, S., Lipson, D., Yelensky, R., Pao, W., Miller, V. A., Klimstra, D. S., & Stephens, P. J. (2014). Comprehensive genomic profiling of pancreatic acinar cell carcinomas identifies recurrent RAF fusions and frequent inactivation of DNA repair genes. *Cancer Discovery*, 4(12), 1398-1405. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0617>
- Choi, A.-R., Jee Jo, M., Jung, M.-J., Sik Kim, H., & Yoon, S. (2015). Selenate specifically sensitizes drug-resistant cancer cells by increasing apoptosis via G2 phase cell cycle arrest without P-GP inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 764, 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.06.046>
- Chou, T., & Martin, N. (2005). CompuSyn for drug combinations. Pc software and user's guide. *ComboSyn Inc Paramus NJ*.
- Ciliberto, D., Botta, C., Correale, P., Rossi, M., Caraglia, M., Tassone, P., & Tagliaferri, P. (2013). Role of gemcitabine-based combination therapy in the management of advanced pancreatic cancer: A meta-analysis of randomised trials. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 49(3), 593-603. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.08.019>
- Clinton, S. K., Giovannucci, E. L., & Hursting, S. D. (2020). The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. *The Journal of Nutrition*, 150(4), 663-671. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz268>

- Conroy, T., Hammel, P., Hebbar, M., Ben Abdelghani, M., Wei, A. C., Raoul, J.-L., Choné, L., Francois, E., Artru, P., Biagi, J. J., Lecomte, T., Assenat, E., Faroux, R., Ychou, M., Volet, J., Sauvanet, A., Breysacher, G., Di Fiore, F., Cripps, C., ... Canadian Cancer Trials Group and the Unicancer-GI-PRODIGE Group. (2018). FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 379(25), 2395-2406. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809775>
- David, K. K., Andrabi, S. A., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2009). Parthanatos, a messenger of death. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 14, 1116-1128.
- Deer, E. L., González-Hernández, J., Coursen, J. D., Shea, J. E., Ngatia, J., Scaife, C. L., Firpo, M. A., & Mulvihill, S. J. (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*, 39(4), 425-435. <https://doi.org/10.1097/MPA.ob013e3181c15963>
- Delpero, J. R., Bachellier, P., Regenet, N., Le Treut, Y. P., Paye, F., Carrere, N., Sauvanet, A., Autret, A., Turrini, O., Monges-Ranchin, G., & Boher, J. M. (2014). Pancreaticoduodenectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma: A French multicentre prospective evaluation of resection margins in 150 evaluable specimens. *HPB: The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 16(1), 20-33. <https://doi.org/10.1111/hpb.12061>

- Delpero, J. R., Boher, J. M., Sauvanet, A., Le Treut, Y. P., Sa-Cunha, A., Mabrut, J. Y., Chiche, L., Turrini, O., Bachellier, P., & Paye, F. (2015). Pancreatic adenocarcinoma with venous involvement: Is up-front synchronous portal-superior mesenteric vein resection still justified? A survey of the Association Française de Chirurgie. *Annals of Surgical Oncology*, 22(6), 1874-1883. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-4304-3>
- Dennert, G., & Horneber, M. (2006). Selenium for alleviating the side effects of chemotherapy, radiotherapy and surgery in cancer patients. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 3, CD005037. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005037.pub2>
- Denost, Q., Laurent, C., Adam, J.-P., Capdepont, M., Vendrely, V., Collet, D., & Sa Cunha, A. (2013). Pancreaticoduodenectomy following chemoradiotherapy for locally advanced adenocarcinoma of the pancreatic head. *HPB: The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 15(9), 716-723. <https://doi.org/10.1111/hpb.12039>
- Doello, K. (2014). A New Pentachrome Method for the Simultaneous Staining of Collagen and Sulfated Mucopolysaccharides. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 87(3), 341-347.
- Doherty, G. J., Tempero, M., & Corrie, P. G. (2018). HALO-109-301: A Phase III trial of PEGPH20 (with gemcitabine and nab-paclitaxel) in hyaluronic acid-high stage IV pancreatic cancer. *Future Oncology*

(London, England), 14(1), 13-22. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0338>

Ducreux, M., Cuhna, A. S., Caramella, C., Hollebecque, A., Burtin, P., Goéré, D., Seufferlein, T., Haustermans, K., Van Laethem, J. L., Conroy, T., Arnold, D., & ESMO Guidelines Committee. (2015). Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 26 Suppl 5, v56-68. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv295>

Dudeja, V., & Allen, P. J. (2015). Premalignant cystic neoplasms of the pancreas. *Seminars in Oncology*, 42(1), 70-85. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.12.007>

Dykewicz, C. A., Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), Infectious Diseases Society of America, & American Society of Blood and Marrow Transplantation. (2001). Summary of the Guidelines for Preventing Opportunistic Infections among Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(2), 139-144. <https://doi.org/10.1086/321805>

Edge, S., Byrd, D. R., Compton, C. C., Fritz, A. G., Greene, F., & Trotti, A. (Eds.). (2010). *AJCC Cancer Staging Handbook: From the AJCC Cancer Staging Manual* (7.^a ed.). Springer-Verlag. <https://www.springer.com/gp/book/9780387884424>

- Espey, M. G., Chen, P., Chalmers, B., Drisko, J., Sun, A. Y., Levine, M., & Chen, Q. (2011). Pharmacologic ascorbate synergizes with gemcitabine in preclinical models of pancreatic cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, *50*(11), 1610-1619. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.007>
- Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A. M., & Klöppel, G. (2014). Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: Facts, challenges and future developments. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(38), 13833-13841. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i38.13833>
- Freeman, H. J. (2013). Early stage colon cancer. *World Journal of Gastroenterology* : *WJG*, *19*(46), 8468-8473. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i46.8468>
- Ganther, H. E. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: Complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*, *20*(9), 1657-1666. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.9.1657>
- Gillen, S., Schuster, T., Meyer Zum Büschenfelde, C., Friess, H., & Kleeff, J. (2010). Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Medicine*, *7*(4), e1000267. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000267>
- Gock, M., Linnebacher, M., Nauheimer, D., Schmidt, J., Klar, E., & Eisold, S. (2013). Influence of Chemotherapeutic Treatment on Expression of

- Human Multidrug Resistance Protein (ABCC, ABCB) Family Members in Pancreatic Cancer Cell Lines. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research*, 2(8), 719-725. <https://doi.org/10.6051/>
- Goel, A., Fuerst, F., Hotchkiss, E., & Boland, C. R. (2006). Selenomethionine induces p53 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, 5(5), 529-535. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.5.2654>
- Golan, T., Hammel, P., Reni, M., Van Cutsem, E., Macarulla, T., Hall, M. J., Park, J.-O., Hochhauser, D., Arnold, D., Oh, D.-Y., Reinacher-Schick, A., Tortora, G., Algül, H., O'Reilly, E. M., McGuinness, D., Cui, K. Y., Schlienger, K., Locker, G. Y., & Kindler, H. L. (2019). Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine*, 381(4), 317-327. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1903387>
- Gómez-España, M. A., Montes, A. F., Garcia-Carbonero, R., Mercadé, T. M., Maurel, J., Martín, A. M., Pazo-Cid, R., Vera, R., Carrato, A., & Feliu, J. (2021). SEOM clinical guidelines for pancreatic and biliary tract cancer (2020). *Clinical and Translational Oncology*, 23(5), 988-1000. <https://doi.org/10.1007/s12094-021-02573-1>
- Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., & Falanga, V. (2017). Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *The Journal of*

Investigative Dermatology, 137(2), e11-e16.

<https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>

Greenhalf, W., Ghaneh, P., Neoptolemos, J. P., Palmer, D. H., Cox, T. F., Lamb, R. F., Garner, E., Campbell, F., Mackey, J. R., Costello, E., Moore, M. J., Valle, J. W., McDonald, A. C., Carter, R., Tebbutt, N. C., Goldstein, D., Shannon, J., Dervenis, C., Glimelius, B., ... European Study Group for Pancreatic Cancer. (2014). Pancreatic cancer hENT1 expression and survival from gemcitabine in patients from the ESPAC-3 trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(1), djt347. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt347>

Habiro, A., Tanno, S., Koizumi, K., Izawa, T., Nakano, Y., Osanai, M., Mizukami, Y., Okumura, T., & Kohgo, Y. (2004). Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316(1), 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.017>

Hammel, P., Huguet, F., van Laethem, J.-L., Goldstein, D., Glimelius, B., Artru, P., Borbath, I., Bouché, O., Shannon, J., André, T., Mineur, L., Chibaudel, B., Bonnetain, F., Louvet, C., & LAP07 Trial Group. (2016). Effect of Chemoradiotherapy vs Chemotherapy on Survival in Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer Controlled After 4 Months of Gemcitabine With or Without Erlotinib: The LAP07 Randomized

- Clinical Trial. *JAMA*, 315(17), 1844-1853.
<https://doi.org/10.1001/jama.2016.4324>
- Hidalgo, M., & Maitra, A. (2009). The hedgehog pathway and pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361(21), 2094-2096.
<https://doi.org/10.1056/NEJMcibro905857>
- Hinshaw, D. C., & Shevde, L. A. (2019). The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Research*, 79(18), 4557-4566.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>
- Hsieh, C.-C., & Papaconstantinou, J. (2006). Thioredoxin-ASK1 complex levels regulate ROS-mediated p38 MAPK pathway activity in livers of aged and long-lived Snell dwarf mice. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(2), 259-268. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4376com>
- Huxley, R., Ansary-Moghaddam, A., Berrington de González, A., Barzi, F., & Woodward, M. (2005). Type-II diabetes and pancreatic cancer: A meta-analysis of 36 studies. *British Journal of Cancer*, 92(11), 2076-2083. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602619>
- Institute of Medicine (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. (2000). *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. National Academies Press (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK225483/>

- Kieliszek, M., Lipinski, B., & Błażej, S. (2017). Application of Sodium Selenite in the Prevention and Treatment of Cancers. *Cells*, 6(4).
<https://doi.org/10.3390/cells6040039>
- Klumpen, H.-J., Queiroz, K. C. S., Spek, C. A., van Noesel, C. J. M., Brink, H. C., de Leng, W. W. J., de Wilde, R. F., Mathus-Vliegen, E. M. H., Offerhaus, G. J. A., Alleman, M. A., Westermann, A. M., & Richel, D. J. (2011). MTOR inhibitor treatment of pancreatic cancer in a patient With Peutz-Jeghers syndrome. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(6), e150-153.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.7825>
- Kooby, D. A., Hawkins, W. G., Schmidt, C. M., Weber, S. M., Bentrem, D. J., Gillespie, T. W., Sellers, J. B., Merchant, N. B., Scoggins, C. R., Martin, R. C. G., Kim, H. J., Ahmad, S., Cho, C. S., Parikh, A. A., Chu, C. K., Hamilton, N. A., Doyle, C. J., Pinchot, S., Hayman, A., ... Lillemoe, K. D. (2010). A multicenter analysis of distal pancreatectomy for adenocarcinoma: Is laparoscopic resection appropriate? *Journal of the American College of Surgeons*, 210(5), 779-785, 786-787.
<https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2009.12.033>
- Landry, J., Catalano, P. J., Staley, C., Harris, W., Hoffman, J., Talamonti, M., Xu, N., Cooper, H., & Benson, A. B. (2010). Randomized phase II study of gemcitabine plus radiotherapy versus gemcitabine, 5-fluorouracil, and cisplatin followed by radiotherapy and 5-fluorouracil for patients with locally advanced, potentially resectable pancreatic

- adenocarcinoma. *Journal of Surgical Oncology*, 101(7), 587-592.
<https://doi.org/10.1002/jso.21527>
- Larsson, S. C., & Wolk, A. (2012). Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: Meta-analysis of prospective studies. *British Journal of Cancer*, 106(3), 603-607.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2011.585>
- Lee, J. M., Chun, H. J., Choi, H. S., Kim, E. S., Seo, Y. S., Jeon, Y. T., Lee, H. S., Um, S. H., Kim, C. H., & Sul, D. (2017). Selenium Administration Attenuates 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis. *Nutrition and Cancer*, 69(4), 616-622.
<https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1300289>
- Li, T., Kang, G., Wang, T., & Huang, H. (2018). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncology Letters*, 16(1), 687-702.
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.8733>
- Li, Z., Meng, J., Xu, T.-J., Qin, X.-Y., & Zhou, X.-D. (2013). Sodium selenite induces apoptosis in colon cancer cells via Bax-dependent mitochondrial pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17(16), 2166-2171.
- Liu, J., & Wang, Z. (2015). Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 294303.
<https://doi.org/10.1155/2015/294303>
- Loehrer, P. J., Feng, Y., Cardenes, H., Wagner, L., Brell, J. M., Cella, D., Flynn, P., Ramanathan, R. K., Crane, C. H., Alberts, S. R., & Benson, A. B.

- (2011). Gemcitabine alone versus gemcitabine plus radiotherapy in patients with locally advanced pancreatic cancer: An Eastern Cooperative Oncology Group trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(31), 4105-4112. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.34.8904>
- Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. B. (2015). Risk factors for pancreatic cancer: A summary review of meta-analytical studies. *International Journal of Epidemiology*, 44(1), 186-198. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu240>
- Malvezzi, M., Bertuccio, P., Levi, F., La Vecchia, C., & Negri, E. (2014). European cancer mortality predictions for the year 2014. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 25(8), 1650-1656. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu138>
- Marabelle, A., Le, D. T., Ascierto, P. A., Di Giacomo, A. M., De Jesus-Acosta, A., Delord, J.-P., Geva, R., Gottfried, M., Penel, N., Hansen, A. R., Piha-Paul, S. A., Doi, T., Gao, B., Chung, H. C., Lopez-Martin, J., Bang, Y.-J., Frommer, R. S., Shah, M., Gori, R., ... Diaz, L. A. (2020). Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38(1), 1-10. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02105>

- Maréchal, R., Bachet, J.-B., Mackey, J. R., Dalban, C., Demetter, P., Graham, K., Couvelard, A., Svrcek, M., Bardier-Dupas, A., Hammel, P., Sauvanet, A., Louvet, C., Paye, F., Rougier, P., Penna, C., André, T., Dumontet, C., Cass, C. E., Jordheim, L. P., ... Van Laethem, J.-L. (2012). Levels of gemcitabine transport and metabolism proteins predict survival times of patients treated with gemcitabine for pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology*, *143*(3), 664-674.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.006>
- Mehdi, Y., Hornick, J.-L., Istasse, L., & Dufrasne, I. (2013). Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *18*(3), 3292-3311. <https://doi.org/10.3390/molecules18033292>
- Mesas, C., Martínez, R., Ortíz, R., Galisteo, M., López-Jurado, M., Cabeza, L., Perazzoli, G., Melguizo, C., Porres, J. M., & Prados, J. (2021). Antitumor Effect of the Ethanolic Extract from Seeds of *Euphorbia lathyris* in Colorectal Cancer. *Nutrients*, *13*(2), 566. <https://doi.org/10.3390/nu13020566>
- Miller, D. W., Batrakova, E. V., & Kabanov, A. V. (1999). Inhibition of multidrug resistance-associated protein (MRP) functional activity with pluronic block copolymers. *Pharmaceutical Research*, *16*(3), 396-401. <https://doi.org/10.1023/a:1018873702411>
- Mitchem, J. B., Hamilton, N., Gao, F., Hawkins, W. G., Linehan, D. C., & Strasberg, S. M. (2012). Long-term results of resection of

adenocarcinoma of the body and tail of the pancreas using radical antegrade modular pancreateosplenectomy procedure. *Journal of the American College of Surgeons*, 214(1), 46-52.
<https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2011.10.008>

Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J., Gallinger, S., Au, H., Ding, K., Christy-Bittel, J., & Parulekar, W. (2005). Erlotinib plus gemcitabine compared to gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer. A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group [NCIC-CTG]. *Journal of Clinical Oncology*, 23(16_suppl), 1-1.
https://doi.org/10.1200/jco.2005.23.16_suppl.1

Mukherjee, S., Hurt, C. N., Bridgewater, J., Falk, S., Cummins, S., Wasan, H., Crosby, T., Jephcott, C., Roy, R., Radhakrishna, G., McDonald, A., Ray, R., Joseph, G., Staffurth, J., Abrams, R. A., Griffiths, G., & Maughan, T. (2013). Gemcitabine-based or capecitabine-based chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer (SCALOP): A multicentre, randomised, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 14(4), 317-326.
[https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(13\)70021-4](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(13)70021-4)

Nassar, D., & Blanpain, C. (2016). Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annual Review of Pathology*, 11, 47-76.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044438>

Nawaz, H., Fan, C. Y., Kloke, J., Khalid, A., McGrath, K., Landsittel, D., & Papachristou, G. I. (2013). Performance characteristics of endoscopic

ultrasound in the staging of pancreatic cancer: A meta-analysis. *JOP: Journal of the Pancreas*, 14(5), 484-497.
<https://doi.org/10.6092/1590-8577/1512>

Neoptolemos, J. P., Dunn, J. A., Stocken, D. D., Almond, J., Link, K., Beger, H., Bassi, C., Falconi, M., Pederzoli, P., Dervenis, C., Fernandez-Cruz, L., Lacaine, F., Pap, A., Spooner, D., Kerr, D. J., Friess, H., Büchler, M. W., & European Study Group for Pancreatic Cancer. (2001). Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: A randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 358(9293), 1576-1585. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06651-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06651-X)

Neoptolemos, J. P., Stocken, D. D., Bassi, C., Ghaneh, P., Cunningham, D., Goldstein, D., Padbury, R., Moore, M. J., Gallinger, S., Mariette, C., Wente, M. N., Izbicki, J. R., Friess, H., Lerch, M. M., Dervenis, C., Oláh, A., Butturini, G., Doi, R., Lind, P. A., ... European Study Group for Pancreatic Cancer. (2010). Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: A randomized controlled trial. *JAMA*, 304(10), 1073-1081. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1275>

Ngamruengphong, S., Swanson, K. M., Shah, N. D., & Wallace, M. B. (2015). Preoperative endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration does not impair survival of patients with resected pancreatic cancer. *Gut*, 64(7), 1105-1110. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307475>

- NIH (nciglobal,ncicenterprise). (2011, febrero 2). [NciAppModulePage].
<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/sistema-de-estadificacion-del-ajcc>
- Noori, S., & Mahboob, T. (2011). Sodium selenite attenuated cisplatin-induced toxicity in rats: Role of electrolytes homeostasis. *Indian Journal of Experimental Biology*, 49(10), 791-794.
- Nöthlings, U., Wilkens, L. R., Murphy, S. P., Hankin, J. H., Henderson, B. E., & Kolonel, L. N. (2005). Meat and fat intake as risk factors for pancreatic cancer: The multiethnic cohort study. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(19), 1458-1465. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji292>
- O'Driscoll, L., Walsh, N., Larkin, A., Ballot, J., Ooi, W. S., Gullo, G., O'Connor, R., Clynes, M., Crown, J., & Kennedy, S. (2007). MDR1/P-glycoprotein and MRP-1 drug efflux pumps in pancreatic carcinoma. *Anticancer Research*, 27(4B), 2115-2120.
- Oettle, H., Post, S., Neuhaus, P., Gellert, K., Langrehr, J., Ridwelski, K., Schramm, H., Fahlke, J., Zuelke, C., Burkart, C., Gütberlet, K., Kettner, E., Schmalenberg, H., Weigang-Koehler, K., Bechstein, W.-O., Niedergethmann, M., Schmidt-Wolf, I., Roll, L., Doerken, B., & Riess, H. (2007). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: A randomized controlled trial. *JAMA*, 297(3), 267-277. <https://doi.org/10.1001/jama.297.3.267>

- Oettle, H., Riess, H., Stieler, J. M., Heil, G., Schwaner, I., Seraphin, J., Görner, M., Mölle, M., Greten, T. F., Lakner, V., Bischoff, S., Sinn, M., Dörken, B., & Pelzer, U. (2014). Second-line oxaliplatin, folinic acid, and fluorouracil versus folinic acid and fluorouracil alone for gemcitabine-refractory pancreatic cancer: Outcomes from the CONKO-003 trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *32*(23), 2423-2429. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.53.6995>
- Ojajärvi, I. A., Partanen, T. J., Ahlbom, A., Boffetta, P., Hakulinen, T., Jourenkova, N., Kauppinen, T. P., Kogevinas, M., Porta, M., Vainio, H. U., Weiderpass, E., & Wesseling, C. H. (2000). Occupational exposures and pancreatic cancer: A meta-analysis. *Occupational and Environmental Medicine*, *57*(5), 316-324. <https://doi.org/10.1136/oem.57.5.316>
- Olm, E. (2009). *Cytotoxic mechanisms of selenium in cancer*. Institutionen för laboratoriemedicin / Department of Laboratory Medicine. <http://openarchive.ki.se/xmlui/handle/10616/37942>
- Olm, E., Fernandes, A. P., Hebert, C., Rundlof, A. K., Larsen, E. H., Danielsson, O., & Bjornstedt, M. (2009). Extracellular thiol-assisted selenium uptake dependent on the x(c)(-) cystine transporter explains the cancer-specific cytotoxicity of selenite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(27), 11400-11405. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902204106>

- Olm, E., Jönsson-Videsäter, K., Ribera-Cortada, I., Fernandes, A. P., Eriksson, L. C., Lehmann, S., Rundlöf, A.-K., Paul, C., & Björnstedt, M. (2009). Selenite is a potent cytotoxic agent for human primary AML cells. *Cancer Letters*, 282(1), 116-123. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.03.010>
- Ormanns, S., Siveke, J. T., Heinemann, V., Haas, M., Sipos, B., Schlitter, A. M., Esposito, I., Jung, A., Laubender, R. P., Kruger, S., Vehling-Kaiser, U., Winkelmann, C., Fischer von Weikersthal, L., Clemens, M. R., Gauler, T. C., Märten, A., Geissler, M., Greten, T. F., Kirchner, T., & Boeck, S. (2014). pERK, pAKT and p53 as tissue biomarkers in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer: A translational subgroup analysis from AIO-PK0104. *BMC Cancer*, 14, 624. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-624>
- Peters, J. M., & Gonzalez, F. J. (2018). The Evolution of Carcinogenesis. *Toxicological Sciences*, 165(2), 272-276. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy184>
- PubChem. (s. f.). *Selenite*. Recuperado 5 de diciembre de 2021, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1090>
- Qi, Y., Schoene, N. W., Lartey, F. M., & Cheng, W.-H. (2010). Selenium compounds activate ATM-dependent DNA damage response via the mismatch repair protein hMLH1 in colorectal cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(43), 33010-33017. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.137406>

- Qiu, C., Zhang, T., Zhu, X., Qiu, J., Jiang, K., Zhao, G., Wu, H., & Deng, G. (2019). Methylseleninic Acid Suppresses Breast Cancer Growth via the JAK2/STAT3 Pathway. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 26(6), 829-838. <https://doi.org/10.1177/1933719118815582>
- Ragulin-Coyne, E., Carroll, J. E., Smith, J. K., Witkowski, E. R., Ng, S. C., Shah, S. A., Zhou, Z., & Tseng, J. F. (2012). Perioperative mortality after pancreatectomy: A risk score to aid decision-making. *Surgery*, 152(3 Suppl 1), S120-127. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2012.05.018>
- Raimondi, S., Lowenfels, A. B., Morselli-Labate, A. M., Maisonneuve, P., & Pezzilli, R. (2010). Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 24(3), 349-358. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2010.02.007>
- Ramanathan, R. K., McDonough, S. L., Philip, P. A., Hingorani, S. R., Lacy, J., Kortmansky, J. S., Thumar, J., Chiorean, E. G., Shields, A. F., Behl, D., Mehan, P. T., Gaur, R., Seery, T., Guthrie, K. A., & Hochster, H. S. (2019). Phase IB/II Randomized Study of FOLFIRINOX Plus Pegylated Recombinant Human Hyaluronidase Versus FOLFIRINOX Alone in Patients With Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma: SWOG S1313. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 37(13), 1062-1069. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01295>

- Ricci, C., Casadei, R., Taffurelli, G., Toscano, F., Pacilio, C. A., Bogoni, S., D'Ambra, M., Pagano, N., Di Marco, M. C., & Minni, F. (2015). Laparoscopic versus open distal pancreatectomy for ductal adenocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 19(4), 770-781. <https://doi.org/10.1007/s11605-014-2721-z>
- Ripamonti, C. I., Santini, D., Maranzano, E., Berti, M., Roila, F., & ESMO Guidelines Working Group. (2012). Management of cancer pain: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 23 Suppl 7, vii139-154. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds233>
- Rishi, A., Goggins, M., Wood, L. D., & Hruban, R. H. (2015). Pathological and molecular evaluation of pancreatic neoplasms. *Seminars in Oncology*, 42(1), 28-39. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.12.004>
- Rudolf, E., Rudolf, K., & Cervinka, M. (2008). Selenium activates p53 and p38 pathways and induces caspase-independent cell death in cervical cancer cells. *Cell Biology and Toxicology*, 24(2), 123-141. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9022-1>
- Saeed Ali, M., Mohamed Hussein, R., & Ahmed Kandeil, M. (2019). The Pro-Oxidant, Apoptotic and Anti-Angiogenic Effects of Selenium Supplementation on Colorectal Tumors Induced by 1,2-

Dimethylhydrazine in BALB/C Mice. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 8(3), 216-226.

Satoh, M., Naganuma, A., & Imura, N. (1992). Effect of coadministration of selenite on the toxicity and antitumor activity of cis-diamminedichloroplatinum (II) given repeatedly to mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 30(6), 439-443.
<https://doi.org/10.1007/BF00685594>

Shinchi, H., Takao, S., Noma, H., Matsuo, Y., Mataka, Y., Mori, S., & Aikou, T. (2002). Length and quality of survival after external-beam radiotherapy with concurrent continuous 5-fluorouracil infusion for locally unresectable pancreatic cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 53(1), 146-150.
[https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(01\)02806-1](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(01)02806-1)

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7-30.
<https://doi.org/10.3322/caac.21590>

Sonnenblick, A., Kadouri, L., Appelbaum, L., Peretz, T., Sagi, M., Goldberg, Y., & Hubert, A. (2011). Complete remission, in BRCA2 mutation carrier with metastatic pancreatic adenocarcinoma, treated with cisplatin based therapy. *Cancer Biology & Therapy*, 12(3), 165-168.
<https://doi.org/10.4161/cbt.12.3.16292>

Soukupová, K., & Rudolf, E. (2019). Suppression of proliferation and activation of cell death by sodium selenite involves mitochondria and lysosomes

in chemoresistant bladder cancer cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 52, 58-67.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.11.009>

Spyrou, G., Björnstedt, M., Skog, S., & Holmgren, A. (1996). Selenite and selenate inhibit human lymphocyte growth via different mechanisms. *Cancer Research*, 56(19), 4407-4412.

Stark, A., & Hines, O. J. (2015). Endoscopic and operative palliation strategies for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Seminars in Oncology*, 42(1), 163-176. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.12.014>

Sultana, A., Tudur Smith, C., Cunningham, D., Starling, N., Tait, D., Neoptolemos, J. P., & Ghaneh, P. (2007). Systematic review, including meta-analyses, on the management of locally advanced pancreatic cancer using radiation/combined modality therapy. *British Journal of Cancer*, 96(8), 1183-1190. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603719>

Sun, F., Wang, J., Wu, X., Yang, C. S., & Zhang, J. (2019). Selenium nanoparticles act as an intestinal p53 inhibitor mitigating chemotherapy-induced diarrhea in mice. *Pharmacological Research*, 149, 104475. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104475>

Tan, S., Mo, J., Zhang, Z., Huang, C., Zou, Y., & Sun, J. (2019). Sodium Selenite Accentuates the Therapeutic Effect of Adriamycin Prodrug (PADM) against Gastric Cancer. *BioMed Research International*, 2019, 2035682. <https://doi.org/10.1155/2019/2035682>

- Thamilselvan, V., Menon, M., & Thamilselvan, S. (2016). Combination of carmustine and selenite effectively inhibits tumor growth by targeting androgen receptor, androgen receptor-variants, and Akt in preclinical models: New hope for patients with castration resistant prostate cancer. *International Journal of Cancer*, *139*(7), 1632-1647. <https://doi.org/10.1002/ijc.30189>
- Tol, J. A. M. G., Gouma, D. J., Bassi, C., Dervenis, C., Montorsi, M., Adham, M., André-Sandberg, A., Asbun, H. J., Bockhorn, M., Büchler, M. W., Conlon, K. C., Fernández-Cruz, L., Fingerhut, A., Friess, H., Hartwig, W., Izbicki, J. R., Lillemoe, K. D., Milicevic, M. N., Neoptolemos, J. P., ... International Study Group on Pancreatic Surgery. (2014). Definition of a standard lymphadenectomy in surgery for pancreatic ductal adenocarcinoma: A consensus statement by the International Study Group on Pancreatic Surgery (ISGPS). *Surgery*, *156*(3), 591-600. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2014.06.016>
- van de Wiel, A. (2004). Diabetes mellitus and alcohol. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, *20*(4), 263-267. <https://doi.org/10.1002/dmrr.492>
- van der Gaag, N. A., Rauws, E. A. J., van Eijck, C. H. J., Bruno, M. J., van der Harst, E., Kubben, F. J. G. M., Gerritsen, J. J. G. M., Greve, J. W., Gerhards, M. F., de Hingh, I. H. J. T., Klinkenbijn, J. H., Nio, C. Y., de Castro, S. M. M., Busch, O. R. C., van Gulik, T. M., Bossuyt, P. M. M., & Gouma, D. J. (2010). Preoperative biliary drainage for cancer of the

- head of the pancreas. *The New England Journal of Medicine*, 362(2), 129-137. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0903230>
- Viallard, C., & Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: Alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409-426. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>
- Von Hoff, D. D., Goldstein, D., & Renschler, M. F. (2014). Albumin-bound paclitaxel plus gemcitabine in pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 370(5), 479-480. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1314761>
- Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.-M., Chang, D. K., Kassahn, K. S., Bailey, P., Johns, A. L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., Quinn, M. C. J., Robertson, A. J., Fadlullah, M. Z. H., Bruxner, T. J. C., Christ, A. N., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourse, C., ... Grimmond, S. M. (2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*, 518(7540), 495-501. <https://doi.org/10.1038/nature14169>
- Wallenberg, M., Misra, S., & Björnstedt, M. (2014). Selenium cytotoxicity in cancer. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 114(5), 377-386. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12207>
- Wang, Y., Zhang, Y., Yang, J., Ni, X., Liu, S., Li, Z., Hodges, S. E., Fisher, W. E., Brunicardi, F. C., Gibbs, R. A., Gingras, M.-C., & Li, M. (2012). Genomic sequencing of key genes in mouse pancreatic cancer cells. *Current*

Molecular Medicine, 12(3), 331-341.

<https://doi.org/10.2174/156652412799218868>

Whiteside, T. L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27(45), 5904. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.271>

Wickleder, M. S. (2002). Sodium selenite, Na₂SeO₃. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*, 58(11), i103-i104. <https://doi.org/10.1107/S1600536802019384>

Wilber, C. G. (1980). Toxicology of selenium: A review. *Clinical Toxicology*, 17(2), 171-230. <https://doi.org/10.3109/15563658008985076>

Wisnoski, N. C., Townsend, C. M., Nealon, W. H., Freeman, J. L., & Riall, T. S. (2008). 672 patients with acinar cell carcinoma of the pancreas: A population-based comparison to pancreatic adenocarcinoma. *Surgery*, 144(2), 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2008.03.006>

Wolpin, B. M., Chan, A. T., Hartge, P., Chanock, S. J., Kraft, P., Hunter, D. J., Giovannucci, E. L., & Fuchs, C. S. (2009). ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(6), 424-431. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp020>

Wong, J. C., & Lu, D. S. K. (2008). Staging of pancreatic adenocarcinoma by imaging studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 6(12), 1301-1308. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.09.014>

- Wu, T., & Dai, Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Letters*, *387*, 61-68.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.043>
- Xu, B.-Q., Fu, Z.-G., Meng, Y., Wu, X.-Q., Wu, B., Xu, L., Jiang, J.-L., Li, L., & Chen, Z.-N. (2016). Gemcitabine enhances cell invasion via activating HAb18G/CD147-EGFR-pSTAT3 signaling. *Oncotarget*, *7*(38), 62177-62193. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11405>
- Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., Kamiyama, M., Hruban, R. H., Eshleman, J. R., Nowak, M. A., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Iacobuzio-Donahue, C. A. (2010). Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, *467*(7319), 1114-1117.
<https://doi.org/10.1038/nature09515>
- Yadav, D., & Lowenfels, A. B. (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, *144*(6), 1252-1261.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.068>
- YANG, Y., LUO, H., HUI, K., CI, Y., SHI, K., CHEN, G., SHI, L., & XU, C. (2016). Selenite-induced autophagy antagonizes apoptosis in colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, *35*(3), 1255-1264.
<https://doi.org/10.3892/or.2015.4484>
- Yeo, T. P. (2015). Demographics, epidemiology, and inheritance of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Seminars in Oncology*, *42*(1), 8-18.
<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.12.002>

- Ying, H., & Zhang, Y. (2019). Systems Biology of Selenium and Complex Disease. *Biological Trace Element Research*, 192(1), 38-50. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01781-9>
- Yu, J., Blackford, A. L., Dal Molin, M., Wolfgang, C. L., & Goggins, M. (2015). Time to progression of pancreatic ductal adenocarcinoma from low-to-high tumour stages. *Gut*, 64(11), 1783-1789. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308653>
- Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G. (2012). Cancer Stem Cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(12), 2144. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.08.022>
- Zanotelli, M. R., & Reinhart-King, C. A. (2018). Mechanical Forces in Tumor Angiogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1092, 91-112. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95294-9_6
- Zhang, Y., & Weinberg, R. A. (2018). Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: Complexity and opportunities. *Frontiers of Medicine*, 12(4), 361-373. <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0656-6>

ANEXO 1.

PUBLICACIONES

Article

Sodium selenite enhances the antitumor activity of gemcitabine in pancreatic cancer: an in vitro and in vivo study

Kevin Doello ^{1,2,†}, Cristina Mesas ^{2,3,†}, Francisco J. Quiñonero ^{2,3,4}, Gloria Perazzoli ^{2,3,5}, Laura Cabeza ^{2,3,4}, Jose Prados ^{2,3,4*}, Consolacion Melguizo ^{2,3,4}, Raul Ortiz ^{2,3,4}

¹ Medical Oncology Service, Virgen de las Nieves Hospital, 18014 Granada, Spain

² Instituto Biosanitario de Granada (ibs. GRANADA), 18014 Granada, Spain

³ Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Center of Biomedical Research (CIBM), University of Granada, 18100 Granada, Spain

⁴ Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Granada. 18071 Granada, Spain

⁵ Department of Medicine, Faculty of Health Sciences, University of Almería, 04120 Granada, Spain

* Corresponding author: Dr.J. Prados, jcprados@ugr.es

† Co-first authors.

Abstract: Sodium selenite is an antitumor agent which acts by depleting enzymes that protect against cellular oxidative stress. To determine its beneficial effect alone or in combination with gemcitabine (GMZ) in pancreatic cancer we used the pancreatic cancer cell lines PANC-1 and Pan02 and C57BL mice bearing Panc02-generated tumor. Our results demonstrated a significant inhibition of pancreatic cancer cell viability with the use of sodium selenite alone, and a synergistic effect when associated with GMZ on both cell lines. The molecular mechanisms of sodium selenite antitumor effect involved phospho-p38 and apoptosis inducing factor, which were overexpressed in both pancreatic cancer cell lines after treatment. Interestingly, the combined treatment of sodium selenite and GMZ increased the expression of phospho-p38. In addition, sodium selenite exposure alone and in association with GMZ significantly decreased migration capacity and colony-forming ability in both Panc02 and PANC-1 cells, reduced tumor activity in multicellular tumor spheroids (MTS) mimicking in vivo tumors, and decreased sphere formation of cancer stem cells. In vivo studies demonstrated that the combined therapy not only inhibited tumor growth (65%) compared to the untreated group, but also relative to sodium selenite or GMZ used as monotherapy (up to 40%), increasing mice survival. These results were supported by the analysis of C57BL/6

albino mice bearing Panc02 generated tumor using the IVIS system. In conclusion, our results showed that sodium selenite is a potential agent to improve the treatment of pancreatic cancer and should be considered for future human clinical trials.

Keywords: sodium selenite, gemcitabine, pancreatic cancer, cancer stem cells, combined therapy, phospho-p38 protein.

1. Introduction

Sodium selenite has been found to have chemoprotective and antitumor capacity at non-toxic doses [1,2]. Some studies have shown that a low dose of selenite in supplementation with chemotherapy (QT) could help to reduce its side effects [1,3,4]. In addition, selenite has been found to possess potent antitumor capacity and selectivity for tumor cells. This antitumor capacity has been demonstrated in vitro in lymphoma, leukemia, gastric, mesothelioma and colorectal carcinoma cell lines [5–10]. In vivo studies have also been conducted in mice with ovarian, prostate and colon tumor inocula, with satisfactory results [11–13]. By contrast, not enough clinical trials have been developed to evaluate improvements in the prognosis of cancer patients [14].

Sodium selenite is an inorganic oxo-salt used as a source of selenium which is present in selenoproteins such as glutathione peroxidase and thioredoxin reductase [15]. These proteins are involved in the elimination of reactive oxygen species (ROS), which are free radicals that induce damage by oxidative stress to proteins and DNA. However, at high doses, selenite becomes toxic to cells, including tumor cells. Selenite is an extremely reactive anion that is rapidly metabolized by the cell using a large amount of reducing power in the form of both reduced glutathione (GSH) and reduced thioredoxin (TRX), which perform vital functions at the cellular level, the most important being the detoxification of the ROS. Therefore, selenite-mediated depletion of GSH and TRX leaves the cell defenseless against ROS, resulting in cell death due to the severe DNA, protein and/or ribonucleotide damage [16]. In fact, it has been shown that ROS

may generate cellular damage by i) mismatch of nitrogenous bases that activates the MMR (mismatch repair) system leading to futile repair cycles and apoptosis whether or not dependent on p53 (i.e., p73) [17,18]; ii) double-strand breaks which, if not repaired, activate apoptosis via p53; and iii) oxidative stress capable of inducing mitochondrial damage causing release of cytochrome c, activation of apoptosis (mitochondrial pathway) and autophagy. In addition, selenite-mediated TRX depletion, which causes ASK1 factor release, activates p38/JNK-dependent cell death [18], while selenite-mediated GSH reduction, which inactivates certain intracellular toxic agents, prevents the cell from defending itself from certain toxins (e.g., chemotherapeutic drugs) [16]. According to some authors [8], selenite could also directly block the active center of glutathione reductase and thioredoxin reductase, which are responsible for regenerating GSH and TRX, thereby decreasing the tumor cell's ability to avoid the effect of drugs. Interestingly, in vitro and in vivo studies showed that tumor cells are more sensitive to selenite than normal cells. Paradoxically, cells highly resistant to traditional chemotherapy within tumors have been found to be the most sensitive to selenite exposure. Olm et al. [19] explained this phenomenon by MRP channel-based resistance mechanisms. The presence of these proteins in tumor cells allows chemotherapeutic agents to be expelled together with GSH (separately or conjugated). In these tumor cells, selenite — previously reduced to HSe- — is incorporated to a greater extent. Therefore, chemoresistant tumor cells (which expel more reducing power, in this case, GSH) would better incorporate the selenite and would suffer more damage [19].

On the other hand, pancreatic ductal adenocarcinoma, a malignant tumor from cells of the exocrine pancreas is an uncommon tumor (2.1% of all tumors), mostly diagnosed between 65 and 75 years of age and with an increasing incidence especially in the last years [20,21]. It is characterized by delayed diagnosis and a very poor prognosis. In fact, most of these tumors (70%) are diagnosed in stage III – IV, when they are already inoperable and have produced locoregional and/or hepatic metastases. In these cases, the only treatment available is chemotherapy. The most commonly used chemotherapeutic agents are antimetabolites such as gemcitabine (GMZ) and 5-fluorouracil (5-FU), microtubules depolymerizing agents such as albumin bound paclitaxel (Abraxane), intercalating agents such as oxaliplatin (OXA) or topoisomerase inhibitors such as irinotecan (IRI). Despite the aggressiveness of these treatments, the survival of patients with pancreatic cancer barely reaches one year of life. One of the main causes of treatment failure is that pancreatic cancer cells show high drug resistance mediated by MDR (multiple drugs

resistance) proteins such as P-glycoprotein or MRP, which expel drugs from the cell [22]. The combination of chemotherapeutic agents, such as GMZ-Abraxane (IMPACT clinical trial) or FOLFIRINOX (PRODIGE clinical trial), and the use of PABP inhibitors have been tested to improve patient response. In the latter case, Olaparib increased survival in patients with BRCA-mutated pancreatic cancer who previously responded to FOLFIRINOX or FOLFOX (POLO clinical trial) [23].

In this context, the aim of this article is to study the anti-tumor capacity of sodium selenite alone and in combination with chemotherapy, focusing the study on pancreatic cancer and the molecular mechanisms involved in its anti-tumor activity. Our results showed that sodium selenite improves the response of pancreatic cancer to some chemotherapeutics such as GMZ and that its use should be considered as a new strategy in the treatment of this type of tumor.

2. Materials and Methods

2.1 Cell culture, sodium selenite and drug treatments

The human pancreatic cancer cell line PANC-1 was purchased from the Center of Scientific Instrumentation (CIC-Granada University) and the mouse pancreatic cancer cell line Pan02 was kindly provided by Dr. Lars Ivo Partecke, University of Greifswald, Germany. Both cell lines were cultured using DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% streptomycin and amphotericin B mixture (ATB). Cells were maintained in an incubator at 37 °C and 5% CO₂ humidified atmosphere and passaged using 0.25% trypsin and 0.02% EDTA. Sodium selenite was dissolved in DMEM at the stock concentrations of 578.03 mM. GMZ was obtained from Sigma (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) and dissolved in distilled water at the stock concentrations of 379.94 mM. Benzamide was dissolved in DMEM at 1981.18 μM stock concentrations of and was obtained from Sigma (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri).

2.2. Cell viability analysis

Cells were seeded at densities of 5×10³ cells/well in PANC-1 and 4×10³ cells/well in Pan02 in 24-well plates with culture medium (400 μL), incubated overnight, and exposed to sodium selenite (from 1 to 30 μM), GMZ (from 0.025 to 5 μM) and both sodium selenite and GMZ (different concentrations) during 72 h. Then, cells were fixed with trichloroacetic acid (TCA) at 10% for 20

minutes at 4 °C. Once dried, the plates were stained with 0.4% sulforhodamine B (SRB) in 1% acetic acid (20 min, in agitation). After three washes with 1% acetic acid, SRB was solubilized with Trizma® (10mM, pH 10.5). Finally, the optical density (OD) of the dye was measured with a Titertek multiskan colorimeter (Flow, Irvine, California) at 492 nm. The percentages of proliferation (Pf %) and cytotoxicity (Ct %) were calculated with Eq.1. $Pf\% = (\text{sample OD}/\text{negative control OD}) \times 100$ and Eq. 2. $Ct\% = 100 - Pf\%$. In addition, IC50 (GraphPad Prism 6 Software, La Jolla, CA, USA) was determined according with Eq. 3. $\text{Cell survival (\%)} = ((\text{Treated cells OD} - \text{blank})/(\text{Control OD} - \text{blank})) \times 100$. In order to calculate synergy values in treatment combinations, the Combination Index Equation (CIE), which defines synergism ($CI < 1$), additive effect ($CI = 1$) and antagonism ($CI > 1$), was obtained using CompuSyn software [24].

2.4. Cell cycle study

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 15×10^4 cells/well in PANC-1 and 10×10^4 cells/well in Pan02 in 1.5 mL of complete DMEM. After 24 hours, the culture medium was removed and a free-serum culture medium was added to arrest the cell cycle. Then, culture cells were exposed to different treatments (48 h), trypsinized, centrifuged (1500 rpm, 3 min) and fixed in 70% ethanol (4 °C, 60 min). After removing ethanol by centrifugation (1500 rpm, 3 min), the pellets were processed using the PI/RNASE Solution Kit (Immunostep, Spain). Samples were analyzed in a BD FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, USA) using FlowJo software.

2.5 Mitochondria membrane potential analysis

The 1,1',3,3',3',3'-hexamethylindodicarbo-cyanine (DiIC1), a fluorescent dye that accumulates in mitochondria with depolarizing membrane potentials, was used to determine the modulation of mitochondrial potential in apoptotic-like cells. Cells were seeded in 6-well plates at a density of 10×10^4 cells/well, exposed to different treatments (48 h), trypsinized and washed in PBS and centrifuged (2500 rpm, 3 min). Then, the pellets were resuspended in DMEM (without FBS and ATB) and incubated with DiIC1 (10 μ M) and PI (1mg/mL) for 20 min in darkness (ImmunoStep, Salamanca, Spain). Finally, cells were centrifuged (1500 rpm, 3 min), resuspended in PBS and analyzed with a flow cytometer BD FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, USA) using FlowJo software.

2.6. Benzamide treatment assays

Cells were seeded in 24-well plates at a density of 15×10^3 cells/well in PANC-1 and 4×10^3 cells/well in Pan02 and treated with the poly-ADP-ribose-polymerase (PARP) inhibitor benzamide (from 10 to 30 μM) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) and with benzamide in association with selenite (different concentrations) for 72 h. Then, a sulforhodamine B proliferation assay was carried out as described above.

2.7. Apoptosis-inducing factor immunofluorescence assay

An immunofluorescence assay was used to determine apoptosis-inducing factor (AIF) expression in culture cells after 24h of different treatments. Cells were included in 4% formaldehyde in PBS at room temperature (RT) (10 min), washed with PBS (two times), and neutralized (for residual formaldehyde) using 50 mM NH_4Cl in PBS (10 min, RT). After one wash with PBS (5 min, 4°C), cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS (5 min, 4°C). Cell preparations were incubated with 1% bovine serum albumin in PBS (10 min, RT) and exposed to the primary anti-AIF antibody (Cell Signaling Technologies, Spain) (1/200 dilution, 1 h, RT). After PBS washing (three times), cell preparations were incubated with a secondary antibody conjugated to Alexa-488® (Cell Signaling Technologies, Spain) (1/500 dilution, 30 min, RT). 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1/1000 dilution) was used to stain nuclei. The cells were observed by fluorescence microscopy (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.8. Western-Blot assay of phosphorylated p38

Cells exposed to different treatments (72 h) (see above) were collected, centrifuged, and total proteins were extracted with RIPA lysis buffer (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) to determine protein concentration using Bradford. For electrophoresis, 40 μg of proteins from each sample were heated at 95°C for 5 min and separated in 10% SDS-PAGE gel. Fractions were transferred to a nitrocellulose membrane (45 μm pore size) (Millipore), blocked in 5% milk in PBS supplemented with 0.1% Tween-20 (Bio-Rad) for 1 hour and incubated with the anti-p38 rabbit primary antibody (1:1000) (Cell Signaling Technologies, Spain) overnight at 4°C . Then, a secondary antibody (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) was added (1:5000). The membranes were revealed by chemiluminescence (Amersham Biosciences, USA). β -actin detection (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) served as an internal control.

The gels were analyzed using Quantity One analytical software (Bio-Rad, Hercules, CA).

2.9. Wound healing assay

To determine the tumor cell migration capacity of cell lines and, thus, their invasiveness, an in vitro migration assay was performed. Pancreatic cancer cells were seeded in 6-well plates and grown to 90% confluence in standard culture conditions. Then, they were treated with sodium selenite or GMZ (1 and 3 μM of selenite (IC10 and IC25) and 0.05 μM of GMZ (IC10)) during 72 h. A “wound” was manually performed with a sterile tip following Grada et al. [25], and the medium was replaced with serum-free DMEM. Images were obtained at different times (24, 48 and 72 h) to evaluate the percentage of migration by measuring the area free of tumor cells (Image J software) (<https://imagej.nih.gov/>).

2.10. Multicellular tumor spheroid assays

Multicellular tumor spheroids (MTS) from PANC-1 and Pan02 were generated using our previously described protocol [26]. Briefly, PANC-1 and Pan02 cells (15 \times 10³ and 25 \times 10³ cells/well, respectively) were seeded in a 96-well plate coated with 1% (w/v) agarose and with 150 μL of complete DMEM. For PANC-1 MTS formation, the protocol was slightly modified [27] by supplementing DMEM with methylcellulose (0.24%). PANC-1 and Pan02 MTS were treated with sodium selenite, GMZ and combined treatments for two cycles of 72 h. Untreated MTS were used as controls. In addition, cell growth inhibition in MTS was also studied using CCK8 (Cell Counting Kit 8) (AbCam, Cambridge, United Kingdom).

2.11. Colony formation assay

PANC-1 and Pan02 cells were treated with sodium selenite, GMZ and combined treatments. After 72 h, cells were seeded in 12-well plates (600 cell/well) with 1 ml of DMEM. After three and six days for Pan02 and PANC-1 colony formation, respectively, the wells were washed twice using 1 ml of PBS and were fixed using 1 ml/well cold 70% methanol (RT, 30 min). Then, cells were washed twice with water and the plates were dried overnight. Colonies were stained using 1 ml/well 0.5% crystal violet in 70% methanol (15 min) on an orbital shaker. After that, plates were washed three times using water and they were dried overnight. Finally, the number of colonies was counted.

2.12. CSC spheroids formation

PANC-1 cells were incubated with different treatments (sodium selenite, GMZ and combined treatment) for 72 h. Then, the remaining cells were collected and 3000 cells were seeded in 24-well plates coated with 1% (w/v) agarose and with 300 μ l of conditioned medium (composed by HAM F12, 1% streptomycin-penicillin, hydrocortisone 1 μ g/ml, heparin 4 ng/mL, insulin-transferrine-selenite –ITS– 10 μ g/mL, B27 1x, EGF 10 μ g/ml, FGF 20 μ g/ml) for pancreatic cancer stem cells (CSCs). After 10 days, once the spheroids were formed, they were counted in the different treatment groups.

2.13. *In vivo* tumor growth analysis

Brown and albino female C57BL/6 mice (weight 18–20 g, age 6 weeks) (Charles River Laboratories Inc, Wilmington, MA, USA) were housed in colony cages with free access to water and food prior to the experiments and controlled light and temperature (22 ± 2 °C, and 12 h light-dark cycle). All animal studies were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the University of Granada (03-09-2017-118) and in accordance with international standards (European Communities Council Directive 2010/63). Subcutaneous tumors were induced with the Pan02 cell line by injecting 500×10^3 cells in the right hind flank of mice in a total volume of 100 μ l of saline serum. When tumors were palpable, the mice were randomly divided into four groups (n=13 black, n=5 albino) and were treated with selenite (3 mg/kg), GMZ (25 mg/kg), selenite+GMZ (association therapy). Each group was treated every three days for a total of 10 doses (intraperitoneal administration). In addition, one group was treated with saline solution (control, n=13). The following formula was used to calculate the tumor volume: V (mm³) = $(a \times b^2 \times \pi)/6$, where “a” is the largest diameter of the tumor, and “b” is the largest diameter perpendicular to “a”. Tumor growth values were measured in mm³/day. In addition, mice survival was measured. After the experiments were completed, the mice were sacrificed with pentobarbital and the tumors were excised.

2.14. *Bioimaging*

An IVISpectrum (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts) study using glucose labeled with a fluorophore (RediJect 2-DeoxyGlucosone (DG)-750, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts) was carried out in albino mice groups after 5 and 10 treatment cycles to assess the viability of the tumor tissue and mice were analyzed after 3 hours of administration.

2.15. Histological analysis

Resected tumors were fixed in formaldehyde, included in paraffin and cut with a rotation microtome (Leica, Wetzlar, Germany). After deparaffinization and hydration, the sections were stained with hematoxylin-eosin and the pentachrome method [28]. Immunofluorescence was used to determine Ki67 and MMP9 expression (BD 550609 and ab38898 at 1:50 and 1:200, respectively) (BD Biosciences, San Jose, USA; AbCam, Cambridge, UK). Alexa-488® and 647® (Cell Signaling Technologies, Spain) were used as secondary antibodies (1: 200 for both). The images were obtained with a photographic microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

2.16. Statistical analyses

All the results were expressed as mean±standard deviation (SD) of three or more replicates. Statistical analysis was performed using Student's t-tests and one-way ANOVA with post-hoc Tukey tests (SPSS v.15, SPSS, Chicago, USA). Mice survival was evaluated with the Kaplan–Meier method. Finally, the logRank test was used to compare the proportion of living mice between groups. All tests were performed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v. 15.0 software, and differences were considered statistically significant at a p-value <0.05. **3. Results**

This section may be divided by subheadings. It should provide a concise and precise description of the experimental results, their interpretation, as well as the experimental conclusions that can be drawn.

3. Results

3.1 Sodium selenite reduces cell viability in pancreatic cancer cells

Sodium selenite significantly inhibited pancreatic cancer cell viability in a time- and dose-dependent manner, showing IC₅₀ values of 5.6 and 4.6 μM for PANC-1 and Pan02 cell lines, respectively (Figure 1A). The decrease in cell density after 72 h of selenite exposure was accompanied by morphological changes, including a clear loss of the flat, polygonal shape of cells, detachment from the culture plate and apoptosis-like signals in the nucleus (Hoestch stained images) in both PANC-1 and Pan02 cells (Figure 1B). Interestingly, the combination of selenite (IC₁₀, IC₂₅, IC₄₀ in PANC-1 and IC₂₅, IC₄₀, IC₅₀ in Pan02) and GMZ (IC₁₀, IC₂₅ and IC₄₀ in both cell lines) revealed a synergic effect on cell death in both PANC-1 and Pan02 cells (CI<1). Some loss of effect

was observed at IC10 of selenite in the Pan02 cell line and at IC50 of selenite in PANC-1 cell line (Figure 1C).

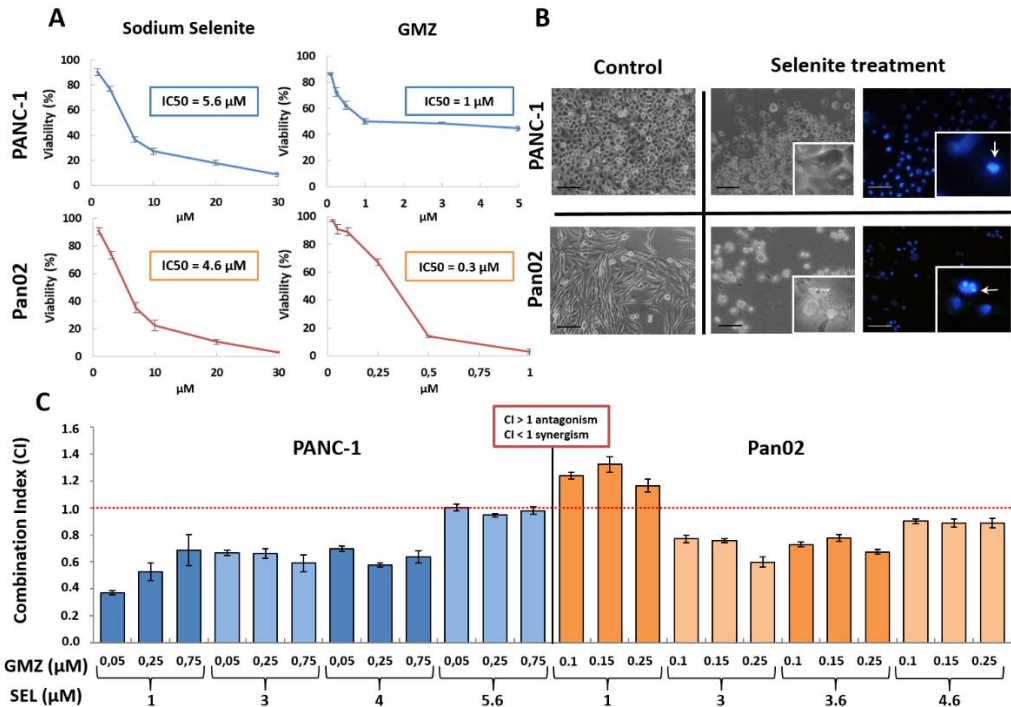


Figure 1. Effect of sodium selenite on pancreatic cancer cells. (A) Cell viability graphs and IC50 values of sodium selenite and GMZ in PANC-1 and Pan02 cells. Cells were exposed to sodium selenite and GMZ at different doses for 72 h. (B) Morphological changes in PANC-1 and Pan02 cells after exposure to sodium selenite (magnification 10x; detail magnification 15x). Hoestch staining showed nuclear fragmentations (arrows) indicating the presence of apoptotic bodies (apoptotic-like cell death). (C) Combination index (CI) of sodium selenite and GMZ in PANC-1 and Pan02 cells (CI >1, antagonism; CI <1, synergism).

3.2. Modulation of cell cycle and mitochondrial membrane potential by sodium selenite

PANC-1 and Pan02 pancreatic cells treated with sodium selenite, GMZ or sodium selenite + GMZ did not show substantial changes in cell cycle (65%

G0/G1 phase, 15% phase S, 20% G2/M phase) (Figure 2A). On the other hand, membrane potential assays using DiIC1 revealed that sodium selenite induced mitochondrial depolarization. As shown in Figure 2, these changes were more evident in PANC-1 cells, where 40% of cells with mitochondrial depolarization and low PI (apoptosis-like cell death) were observed after exposure to 5.6 μ M selenite (Figure 2B).

3.3. Sodium selenite and its association with gemcitabine: molecular analysis

In order to determine the molecular mechanisms involved in enhanced effect between selenite and GMZ, we analyzed the phospho-p38, a 38 kDa protein that activates apoptosis by a p53 independent way. As shown in Figure 2C, a significant increase (2-fold) in the expression of phospho-p38 in PANC-1 cells treated with IC25 of sodium selenite compared to those treated with IC25 of GMZ was detected. However, the expression of phospho-p38 in Pan02 cells treated with IC25 of GMZ showed higher levels than those treated with IC25 of selenite. Interestingly, both PANC-1 and Pan02 cells treated with the sodium selenite + GMZ association (IC25 of both compounds) showed an increased expression of phospho-p38 in comparison with selenite or GMZ alone (3 and 2-fold, respectively).

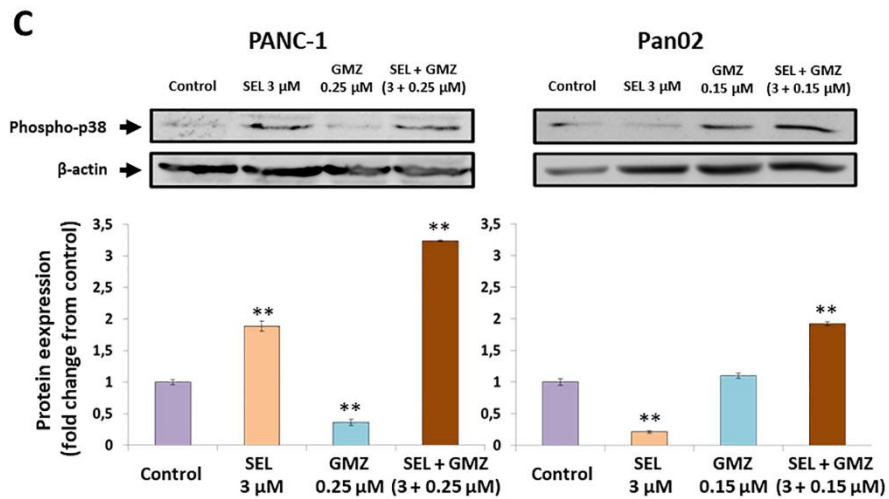
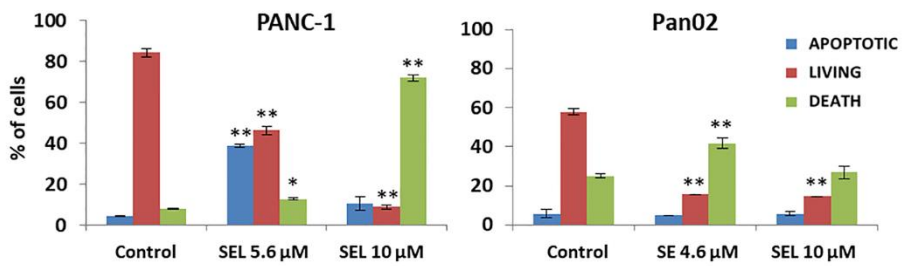
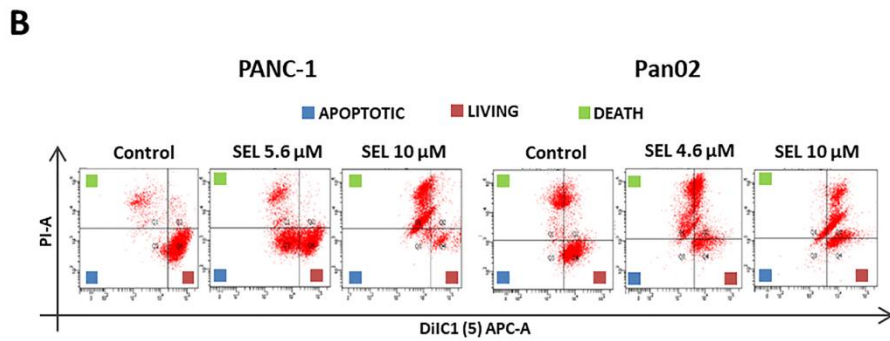
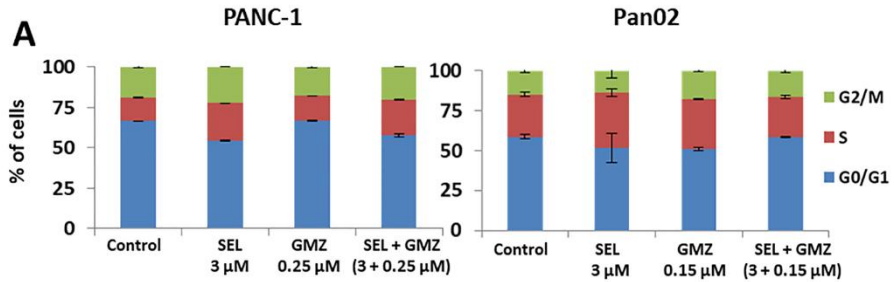
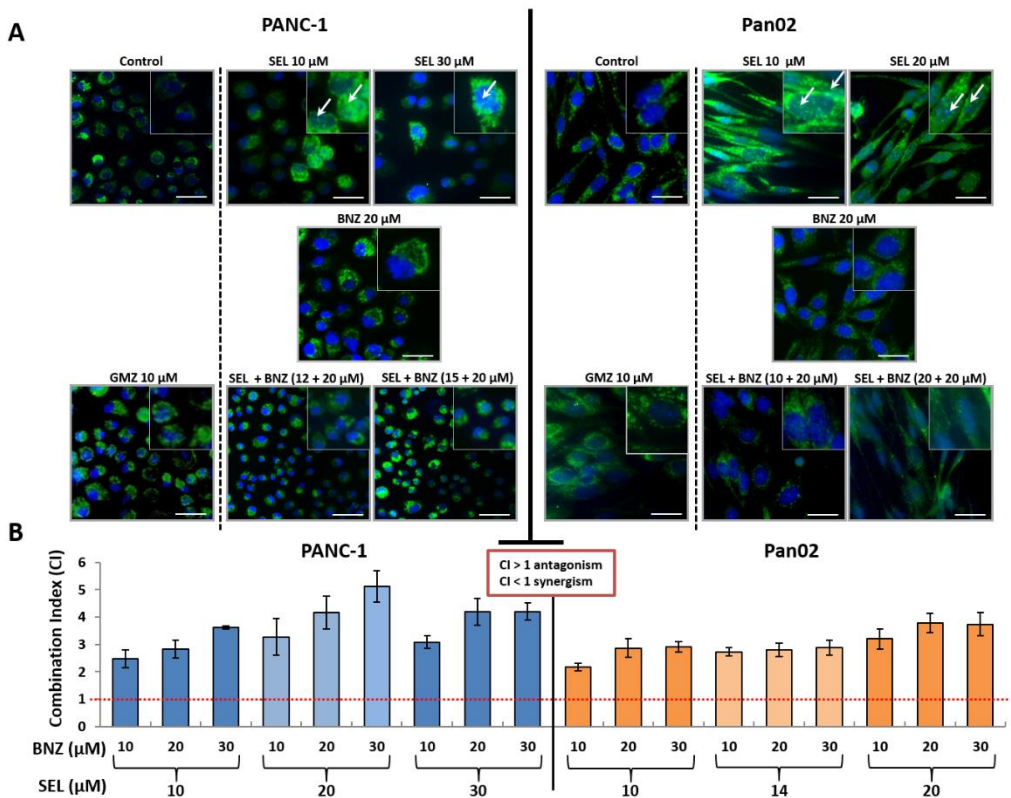


Figure 2. Cell cycle, mitochondrial membrane potential and molecular changes in pancreatic cancer cells treated with sodium selenite. (A) Modulation of cell cycle by sodium selenite. Sodium selenite was used alone and in association with GMZ in PANC-1 and Pan02 pancreatic cancer cells. (B) Apoptotic-like changes (PI-A) and mitochondrial depolarization (DiIC1 (5)) in PANC-1 and Pan02 pancreatic cancer cells after selenite treatment (upper graph). Percentage of living, apoptotic-like and dead cells based on the previous data (lower graph). (C) Representative western-blot and densitometric analysis of the phospho-p38 protein expression in pancreatic cancer cells. PANC-1 and Pan02 cells were treated with sodium selenite, GMZ and sodium selenite + GMZ. Beta-actin was used as control. Original Western Blots can be found as Supplementary material (Supplementary Fig. 1S). All data are presented as mean \pm standard deviation of three independent experiments; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. respective control group.

On the other hand, the expression of apoptosis inducing factor (AIF), a nuclear effector protein of parthanatos, was analyzed in relation to the mechanism of action of selenite. An immunofluorescence study showed that sodium selenite induced a large AIF nuclear location in both PANC-1 and Pan02 cells (Figure 3A). By contrast, GMZ treatment did not induce nuclear location of the AIF protein. In addition, to corroborate the effect of selenite on the expression of AIF, we used BZD, a known PARP inhibitor (see Methods). In both cell lines, BZD seemed to inhibit or decrease the selenite-mediated nuclear translocation of AIF. As shown in Figure 3B, BZD concentrations lower than IC₁₀ inhibited sodium selenite cytotoxicity in both PANC-1 and Pan02 cell lines at all the

combination doses studied ($CI > 1$). In addition, BZD inhibited or decreased the selenite-mediated nuclear translocation of AIF (Figure 3A).

Figure 3. Expression of AIF: immunofluorescence analyses and effect of benzamide. (A) Immunofluorescence analyses of AIF expression in PANC-1 and Pan02 pancreatic cells treated with selenite, GMZ, BZD and selenite + BZD



at different concentrations. Representative images of mitochondrial staining and nuclear translocation depending on the treatment analyzed. Square x2 magnification of the principal image. (B) Combination Index (CI) of PARP inhibition studies using BZD and selenite + BZD.

3.4. Sodium selenite inhibited cell migration capacity and colony formation in pancreatic cancer cells

As shown in Figure 4A, sodium selenite significantly reduced the formation of colonies in all treatment groups. This effect was visible in the Pan02 cell line, in which up to 60-70% reduction of colony formation was demonstrated with the use of 3 μ M selenite, 0.05 and 0.15 μ M GMZ (approximate IC10 and IC25 values), and the combination of both. In PANC-1, results were not significant. On the other hand, exposure to sodium selenite significantly decreased migration capacity in both Pan02 and PANC-1 pancreatic cancer cells. In fact, sodium selenite at 1 and 3 μ M (approximate IC10 and IC25 values) doses reduced Pan02 cell migration (16.2% and 18.5%, respectively) after 72 h of exposure. In PANC-1 cells, 10.6% and 19.6% migration decrease was detected with the use of selenite at 1 and 3 μ M doses, respectively, at the same times (Figure 4B).

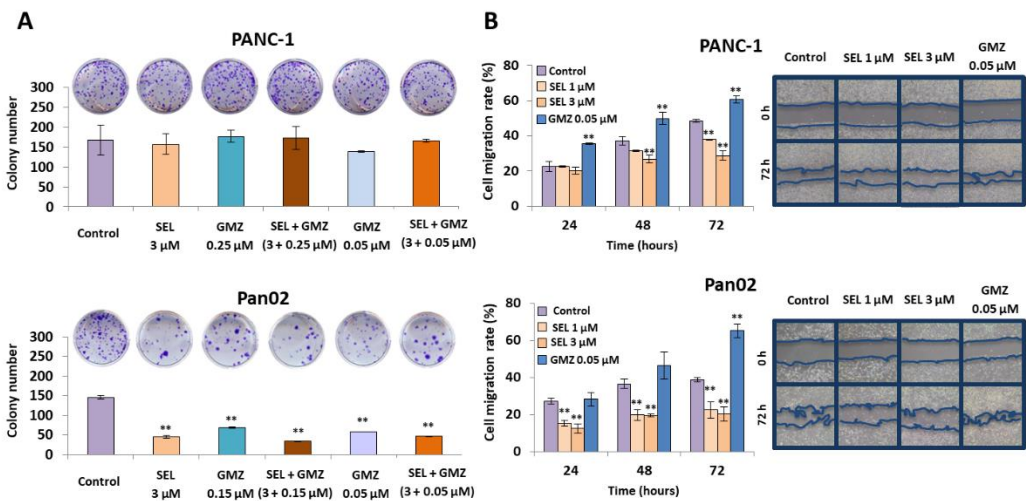


Figure 4. Effect of sodium selenite on cell migration capacity and colony formation. (A) Colony growth analysis of PANC-1 and Pan02 after selenite, GMZ and both selenite + GMZ treatment (72 h); (B) Cell migration analysis. Representative optical microscopy images and graphical representation of the modulation of migration capacity of PANC-1 and Pan02 cells after exposure to sodium selenite and GMZ at different times (0 and 72 h).

3.5. Sodium selenite inhibited growth of multicellular tumor spheroids from pancreatic cancer cells

Multicellular tumor spheroids (MTS) from PANC-1 and Pan02, an experimental model that mimics tumors *in vivo*, were used to determine the penetrability and antitumor effect of sodium selenite alone and in combination with GMZ. As shown in Figure 5A and B, both PANC-1 and Pan02 MTS showed a significant reduction in tumor activity (CCK8 assay) after exposure to selenite alone and selenite + GMZ. Specifically, PANC-1 MTS treated with selenite (5.6 μ M, IC₅₀) and GMZ (1 μ M and 4 μ M, IC₅₀ and IC₅₀ \times 4) showed 28.9%, 18.5% and 24.3% cell growth inhibition, respectively, at 144 h. Interestingly, the combination of both drugs inhibited cell growth by 36.4% (5.6 μ M selenite + 1 μ M GMZ) and 78.03% (5.6 μ M selenite + 4 μ M GMZ) at 144 h. In the case of Pan02 MTS, selenite (4.6 μ M, IC₅₀) and GMZ (0.3 μ M and 1.2 μ M IC₅₀ and IC₅₀ \times 4) showed 64.02 %, 47.14% and 25.7% cell growth inhibition, respectively, at 144 h. Finally, the combination of both drugs inhibited 79.1% (4.6 μ M selenite + 0.3 μ M GMZ) and 83.2% (4.6 μ M selenite + 1.2 μ M GMZ) at 144.

3.6. Sodium selenite modulated Cancer Stem Cells sphere formation

In order to analyze how a pretreatment of the cells with selenite would modify the ability of CSCs to form spheres at 72 hours, CSC spheres were induced with PANC-1 living cells. As shown in Figure 5C, sphere formation decreased when cells were previously treated with selenite and with GMZ, as well as with the combined treatment. However, these differences were not as pronounced, probably due to the smaller number of spheres that the basal line forms.

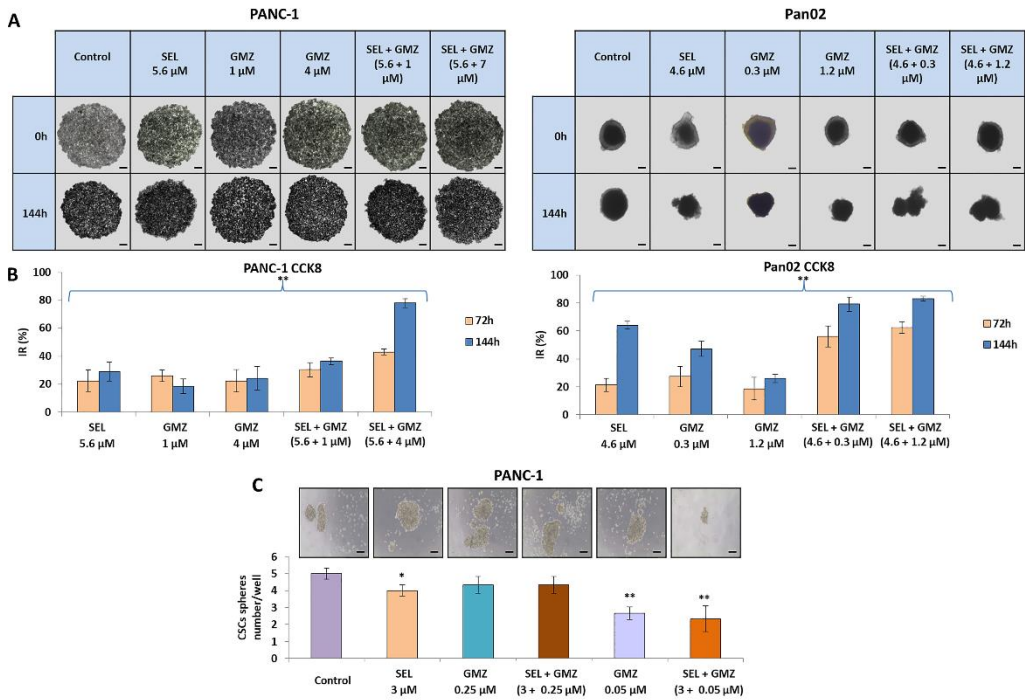


Figure 5. Cell growth inhibition of MTS from PANC-1 and Pan02 pancreatic cancer cell lines after selenite treatment. (A) PANC-1 and Pan02 MTS in culture with different treatments at 72 h and 144 h. (B) CCK8 analysis on the PANC-1 and Pan02 MTS at 72 h and at 144 h. Data are presented as mean \pm SD of octuplicate cultures. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. respective control group. (C) Study of CSC spheres formation. Data are presented as mean \pm SD of three independent experiments; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. respective control group.

3.7. Sodium selenite inhibited growth of pancreatic cancer tumor and enhanced gemcitabine effect: *in vivo* assays

Immunocompetent C57BL/6 and C57BL/6 albino mice bearing Panc02 tumor were used to determine the antitumor potential of sodium selenite *in vivo*. First, as shown in Figure 6, a significant reduction in tumor volume of C57BL/6 mice treated with sodium selenite + GMZ was detected ($P < 0.01$) in comparison with the untreated (control) group. At the end of the study (day 27, 10 cycles of treatment), tumor growth was inhibited by up to 65% in mice treated with

selenite + GMZ compared to the control group. Interestingly, the combined therapy (selenite + GMZ) also induced a greater tumor volume reduction compared to sodium selenite or GMZ used as monotherapy (up to 40% reduction). In the case of volume/time values, a significant reduction was observed in selenite + GMZ group with respect to the rest of treatments, and in selenite and GMZ in monotherapy relative to the control group. In the combination group, the reduction in tumor growth by volume/time was up to 50% relative to the control. Both selenite + GMZ, and sodium selenite treatment, allowed a greater survival in comparison with the control group. In addition, the Kaplan–Meier curve showed a 4-fold increase in the fraction of surviving mice when treated with selenite + GMZ in comparison with mice treated with GMZ alone, and a 8-fold increase with respect to the control mice ($P < 0.05$). Moreover, a complementary study in C57BL/6 albino mice bearing Panc02 cancer was carried out using the IVIS system. As shown in Figure 6B, although a partial response was detected in mice treated with both monotherapies (sodium selenite and GMZ) after 10 cycles, the greatest response was observed with the use of selenite + GMZ. Analysis of the removed tumors demonstrated a significantly smaller size in mice treated with the combined therapy (sodium selenite + GMZ) compared to monotherapy treatments (Figure 6).

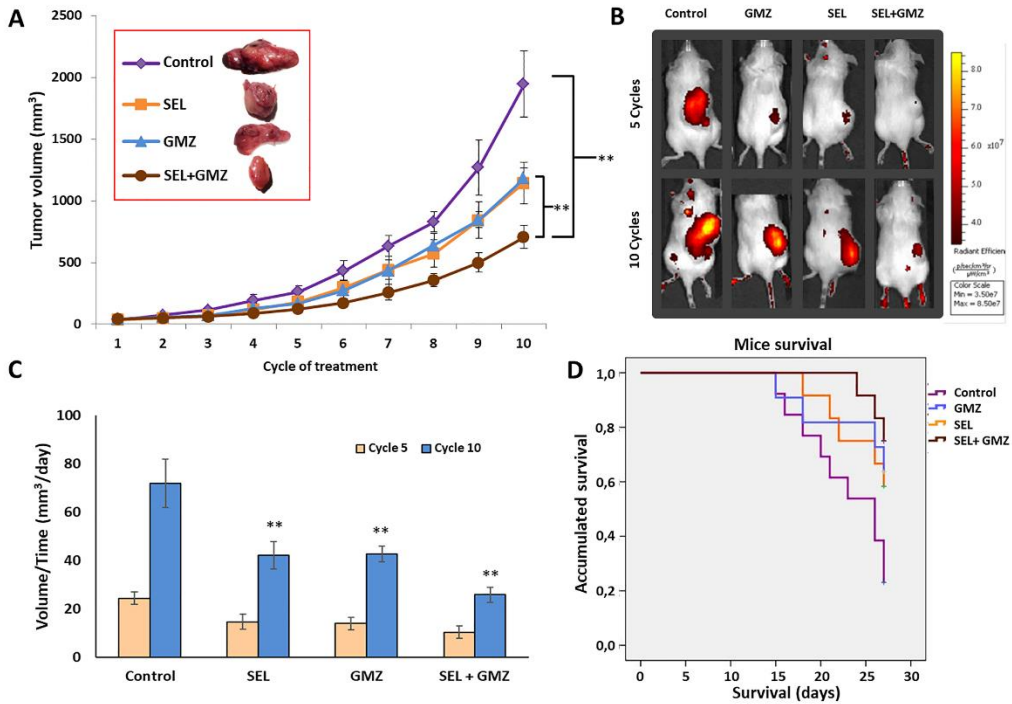


Figure 6. In vivo tumor growth inhibition and mice survival after treatment with sodium selenite. (A) Graphic representation of pancreatic tumor (Panc02 cancer cells) volume growth in C57BL/6 mice. Mice were treated with sodium selenite, GMZ and sodium selenite + GMZ. Untreated mice were used as controls. Data are presented as mean \pm SD (n=13). **Significant inhibition of tumor growth comparing treatments and comparing treatments with control (P<0.01). (B) IVISpectrum analysis of mice after different treatment protocols (5 and 10 cycles). Images were obtained after 3 hours of (DG)-750 injection. (C) Tumor growth inhibition in volume/time (mm³/day) (**P<0.01, comparing treatments and comparing treatments with control). (D) Kaplan–Meier curves of mice bearing subcutaneous tumors. Data were analyzed according to mice survival in each group. Comparison between treatment groups was performed using the log-rank test.

3.9. Histological analysis

Once the tumors were resected, basic histological stains (hematoxylin-eosin), histochemistry (new pentachrome method) and immunofluorescence for Ki67 and MMP9 were performed. Hematoxylin-eosin showed predominance of wide areas of acidophilic cell necrosis in tumors treated with sodium selenite. By contrast, GMZ monotherapy induced a much larger number of blood vessels which were not detected with the use of selenite + GMZ treatment. Pentachromic staining supported these results, showing a significant increase in angiogenesis after GMZ in monotherapy, but not after selenite + GMZ treatment. An *in vitro* study using conditioned media from selenite-treated Pan02 cells (1 and 10 μ M showed a significant decrease in the formation of vessels in HUVEC cells, indicating a clear reduction of their angiogenesis capacity (Supplementary Fig. 2S). On the other hand, a significant reduction in the expression of Ki67 was detected after the combined therapy in comparison to control (3.44-fold reduction), selenite and GMZ monotherapy (2.63 and 1.56-fold reduction, respectively), indicating reduction in proliferation. In addition, the expression of MMP9 strongly decreased in all treatments assayed in comparison with control cells (Figure 7).

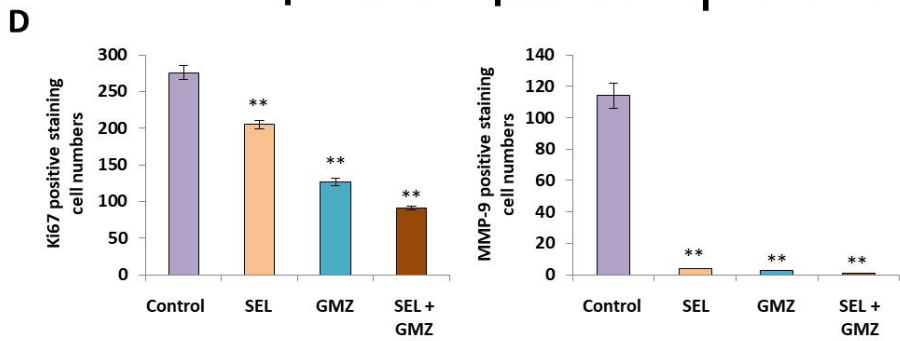
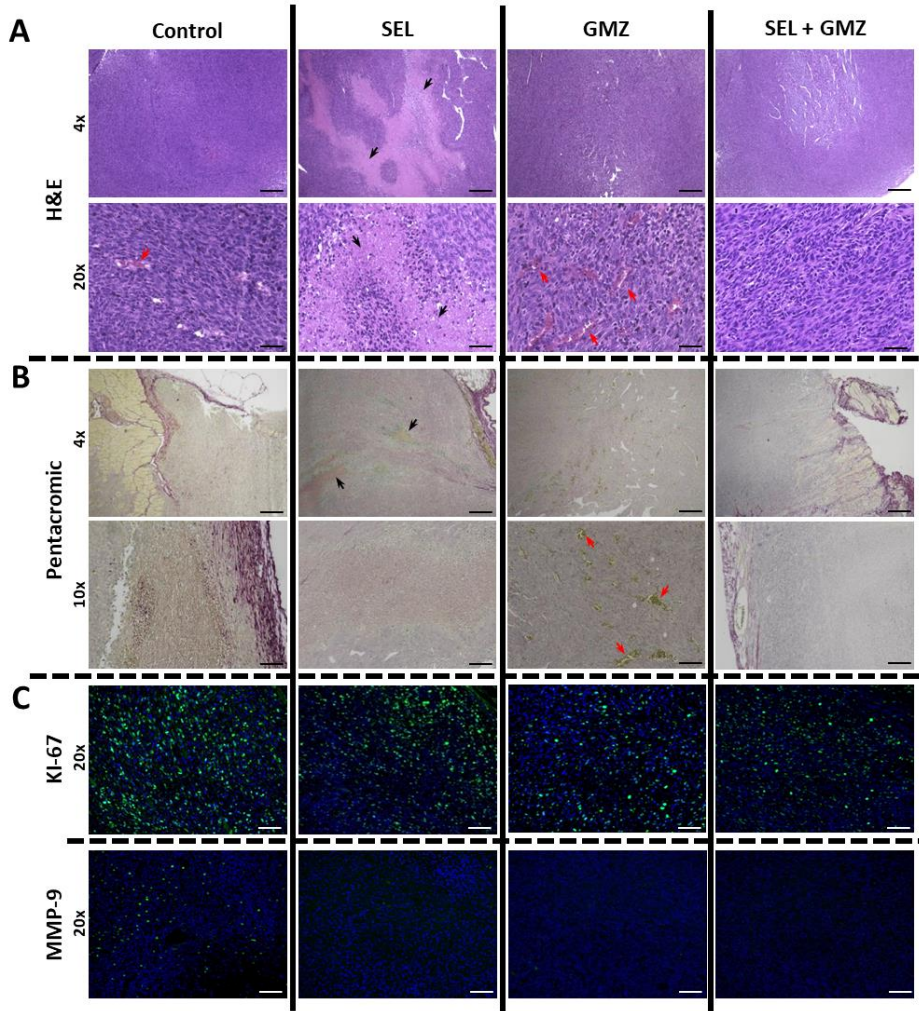


Figure 7. Histological analysis of resected tumors by histological basic staining and immunofluorescence. (A). Stained Hematoxylin-eosin samples from the different treatment groups (4x and 20x magnification). (B) Samples stained with the new pentachromic method at 4x and 10x. This method highlights the visualization of blood vessels with red blood cells in yellow inside, and thin layers of intimal collagen. (C) Immunofluorescence staining for Ki67 and MMP9 at 20x. (D) Graphical representation of immunofluorescence positive staining quantification by Image J. Data are presented as mean \pm standard deviation of three independent experiments; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. respective control group. Scale bar 4x (200 μM), 10x (150 μM) and 20x (50 μM).

4. Discussion

Selenium, a crucial cofactor in endogenous antioxidative systems, has a controversial action in cancer. On the one hand, its deficiency could be associated with an increase in cancer incidence [2, 27]. On the other hand, selenium may have a relevant role in cancer association therapy with conventional chemotherapeutic drugs, since it has been shown to reduce their side effects or improve treatment efficacy [3, 28]. In this context, we analyzed selenium for pancreatic cancer treatment, alone and in association with standard GMZ treatment.

In vitro studies demonstrated that sodium selenite has relevant antitumor activity in several types of tumors, including lymphoma, leukemia, gastric, mesothelioma and colorectal carcinoma [5–10] with an IC₅₀ range between 1 and 20 μM . In a phase I clinical trial (SECAR clinical trial) with mainly lung cancer patients, similar plasma concentrations were tolerated, being significantly lower than the maximum tolerated dose (MTD) [31]. The mechanism of action and selectivity against tumors of selenite remains unclear, but may be due to intrinsic molecular mechanisms of the cells and the tumor microenvironment. In fact, Olm et al. [17] showed a process of selenite reduction (selenide, HSe⁻) in the acidic environment of the tumor that leads to sodium selenite activation, making it more permeable to the cell membrane. This phenomenon may be enhanced by drug resistant mechanisms (e.g., MRP) which decrease reduced glutathione within the tumor cell. Interestingly, pancreatic cancer cells showed elevated MRP expression [22]. In fact, the PANC-1 and Pan02 pancreatic cancer cell lines used in our study were characterized by high MRP expression [32,33]. The expression of MRP may favor selenite incorporation into and selectivity for tumor cells, which could

explain the sensitivity of pancreatic cancer cells to selenite in both in vitro and in vivo experiments. In fact, both PANC-1 and Pan02 cell lines were highly sensitive to selenite treatment, as demonstrated by their IC₅₀ value (5.6 and 4.6 μ M, respectively).

In addition, selenite was also able to enhance the activity of classic agents used in the treatment of pancreatic cancer such as GMZ. A significant antitumor synergistic effect was observed when different cytotoxic doses of selenite and GMZ were associated in pancreatic adenocarcinoma PANC-1 and Pan02 cell lines. As demonstrated by cell cycle analysis and mitochondrial membrane potential analysis, sodium selenite caused an apoptosis like-mediated cell death. However, previous studies such as developed by Soukupová et al. [34] demonstrated that sodium selenite at cytotoxic doses diminished mitochondrial membrane potential, but did not activate caspase 3 in a significant way. Parthanatos or cell death produced by PARP is activated when PARP has repaired extensive damage by base excision [35]. Selenite-mediated cytotoxicity, which causes reduced glutathione and thioredoxin depletion, leaves the cell defenseless to oxidative stress, which could activate this mechanism of cell death [8]. Our studies showed that PARP-mediated cell death could be involved in sodium selenite-induced apoptotic-like cell death. In fact, PARP inhibition by benzamide significantly reduced the antitumor effect of selenite. Moreover, a nuclear translocation of the AIF factor was detected in selenite-treated tumor cells. This mitochondrial factor is the effector of parthanatos and translocates to the nucleus when this cell death pathway is activated. Interestingly, the translocation was not detected in the combined treatment with benzamide, which supports the possible involvement of PARP in the mechanism of action of selenite. As shown in Figure 8, several molecular mechanisms may be involved in the antitumor action of sodium selenite in pancreatic cancer cells. Selenite causes a decrease in intracellular levels of reduced thioredoxin, which normally blocks the ASK1 factor. In turn, this factor is released and able to activate p38 (by phosphorylation), which induces cell death by apoptosis [36]. It has been demonstrated that p38 is the protein that mediates GMZ-induced apoptosis [37]. According to our results, the association of selenite and GMZ induced a higher p38 activation than both monotherapies, which could explain the synergy between cytotoxic doses of selenite and GMZ.

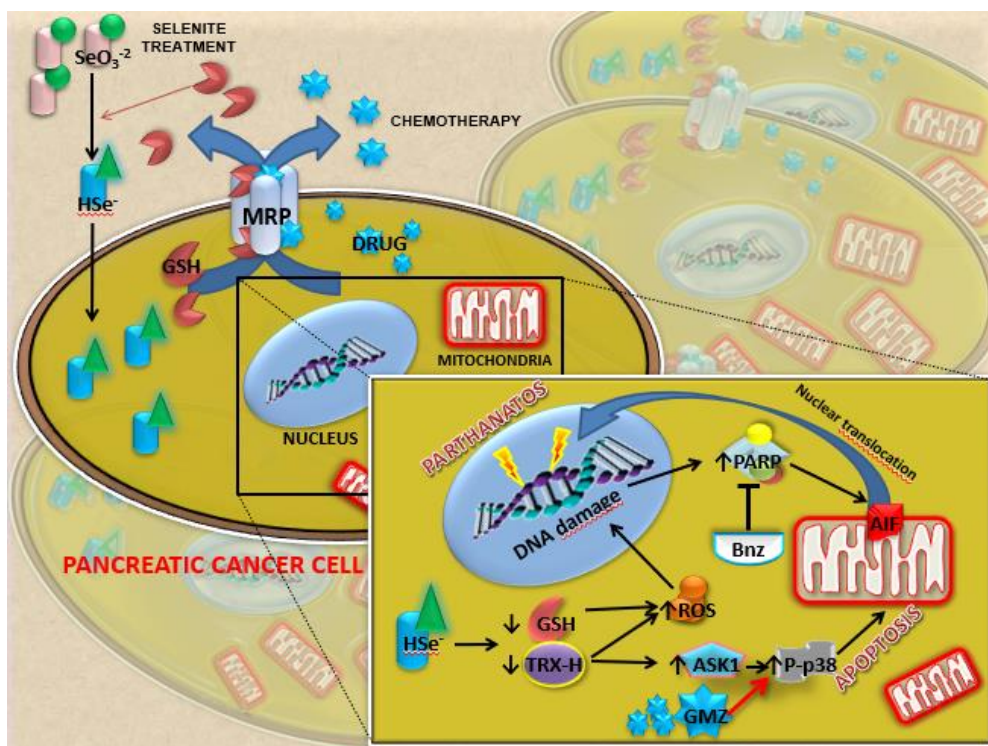


Figure 8. Molecular mechanisms involved in the anticancer activity of sodium selenite in pancreatic cancer cells. This model summarizes the mechanisms by which selenite can induce cell death in tumor cells and hypothesizes about the enhanced antitumor effect found when selenite and gemcitabine were associated.

On the other hand, selenite induced a significant growth inhibition of pancreatic cancer cell-derived MTS, an *in vitro* system that mimics tumors *in vivo*. This effect may be related to the high diffusion capacity of selenite and the lower pH within the tumor spheroid, which would make it more susceptible to treatment [19]. Migration and colony formation assays indicated that selenite significantly reduced these parameters relative to the effect of GMZ, suggesting a greater reduction in aggressiveness in this cell type [38]. Furthermore, selenite demonstrated a decrease in blood vessel formation when

an angiogenesis assay using the Pan02 cells was performed. These results were supported by the *in vivo* assay in which blood vessels development was assessed by histological methods (Figure 7). In addition, our assays on the ability of CSCs to form spheres in a conditioned medium after treatment showed that selenite affects this type of cell population more, reducing the number of spheres formed after previous treatment with selenite. The sensitivity of CSCs to selenite treatment could be related to the increased sensitivity of CSCs to oxidative stress, as described by Liu and Wang [39].

Finally, to our knowledge, this is the first experimental *in vivo* study using selenite against pancreatic cancer, a chemoresistant tumor with poor prognosis and limited treatment options. *In vivo* assays with mice bearing pancreatic tumors clearly corroborated the antitumor activity of selenite, both alone and in combination with GMZ. Using doses and cycles of selenite and GMZ in a range commonly used in other studies with mice [40], we demonstrated that the combination of selenite-GMZ was more effective in terms of decreasing tumor growth, survival and metabolic response in comparison with the rest of treatments, including GMZ monotherapy. The *in vivo* antitumor potential of selenite associated with other antitumor agents (e.g., carmustine or cisplatin) has been demonstrated in prostate, ovary, and colon tumors [11–13]. Caffrey et al. [9] showed that sodium selenite (1.5 mg/kg) in combination with cisplatin, but not alone, was effective in ovarian cancer. In addition, Thamilselvan et al. [11] showed that the association of selenite (1.5 mg/kg) and carmustine induced a higher antitumor effect against prostate cancer than both monotherapies, although no synergistic effect was detected. This study also revealed a significant antitumor activity of selenite against prostate cancer, but lower than that of carmustine. Our results using higher doses of selenite (3 mg/kg) associated with GMZ showed good tolerance, longer survival and significant tumor volume reduction (50%) compared to monotherapies (i.e., GMZ or selenite). Histological analysis verified that selenite and selenite + GMZ treatment decreased the expression of cell proliferation markers (i.e., Ki67) and that both treatments were able to inhibit MMP9, a protein closely related to the invasiveness of pancreatic cancer. Furthermore, selenite demonstrated a strong necrotic capacity and antiangiogenic activity which are not observed with GMZ as monotherapy. In fact, Saeed et al. [41] already described the antiangiogenic capacity of selenite in colon tumors, which correlates with the decrease in the expression of proangiogenic factors such as VEGF in the analyzed samples.

5. Conclusions

In this article we demonstrated for the first time the antitumor effect of sodium selenite against pancreatic cancer in cell cultures in vitro, three-dimensional models in vitro, and in vivo assays. Furthermore, selenite not only showed an antitumor effect as monotherapy, but also in combination with GMZ, showing an enhanced effect with GMZ. The mechanisms by which selenite acts on tumor cells (such as Parthanatos or AIF-mediated cell death) were different from those of traditional chemotherapeutic agents, suggesting that selenite could be an adjuvant therapy to overcome phenomena of resistance to traditional drugs. In addition, selenite demonstrated a significant effect against critical processes in tumor progression such as colony formation, migration, or the ability of CSCs to form spheres. In vivo assays demonstrated the efficacy of selenite (alone and in combination with GMZ) to increase survival and to significantly reduce tumor volume and the expression of markers related to tumor aggressiveness and progression. Therefore, sodium selenite should be considered as a promising antitumor agent against pancreatic cancer, either alone or in combination with GMZ. However, future studies will be necessary to determine its potential clinical applicability and the plausibility of clinical trials.

6. Patents

This section is not mandatory but may be added if there are patents resulting from the work reported in this manuscript.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: title, Table S1: title, Video S1: title.

Author Contributions: For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used “Conceptualization, X.X. and Y.Y.; methodology, X.X.; software, X.X.; validation, X.X., Y.Y. and Z.Z.; formal analysis, X.X.; investigation, X.X.; resources, X.X.; data curation, X.X.; writing—original draft preparation, X.X.; writing—review and editing, X.X.; visualization, X.X.; supervision, X.X.; project administration, X.X.; funding acquisition, Y.Y. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.” Please turn to the CRediT taxonomy for the term explanation. Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work reported.

Funding: Please add: “This research received no external funding” or “This research was funded by NAME OF FUNDER, grant number XXX” and “The APC was funded by XXX”. Check carefully that the details given are accurate and use the standard spelling of funding agency names at <https://search.crossref.org/funding>. Any errors may affect your future funding.

Institutional Review Board Statement: In this section, please add the Institutional Review Board Statement and approval number for studies involving humans or animals. Please note that the Editorial Office might ask you for further information. Please add “The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of NAME OF INSTITUTE (protocol code XXX and date of approval).” OR “Ethical review and approval were waived for this study, due to REASON (please provide a detailed justification).” OR “Not applicable.” for studies not involving humans or animals. You might also choose to exclude this statement if the study did not involve humans or animals.

Informed Consent Statement: Any research article describing a study involving humans should contain this statement. Please add “Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.” OR “Patient consent was waived due to REASON (please provide a detailed justification).” OR “Not applicable.” for studies not involving humans. You might also choose to exclude this statement if the study did not involve humans.

Written informed consent for publication must be obtained from participating patients who can be identified (including by the patients themselves). Please state “Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper” if applicable.

Data Availability Statement: In this section, please provide details regarding where data supporting reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated during the study. Please refer to suggested Data Availability Statements in section “MDPI Research Data Policies” at <https://www.mdpi.com/ethics>. You might choose to exclude this statement if the study did not report any data.

Acknowledgments: In this section, you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).

Conflicts of Interest: Declare conflicts of interest or state “The authors declare no conflict of interest.” Authors must identify and declare any personal circumstances or interest that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of reported research results. Any role of the funders in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results must be declared in this section. If there is no role, please state “The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results”.

The appendix is an optional section that can contain details and data supplemental to the main text—for example, explanations of experimental details that would disrupt the flow of the main text but nonetheless remain crucial to understanding and reproducing the research shown; figures of replicates for experiments of which representative data is shown in the main text can be added here if brief, or as Supplementary data. Mathematical proofs of results not central to the paper can be added as an appendix.

Appendix B

All appendix sections must be cited in the main text. In the appendices, Figures, Tables, etc. should be labeled starting with “A”—e.g., Figure A1, Figure A2, etc.

References

1. Satoh, M.; Naganuma, A.; Imura, N. Effect of Coadministration of Selenite on the Toxicity and Antitumor Activity of Cis-Diamminedichloroplatinum (II) given Repeatedly to Mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992, 30, 439–443, doi:10.1007/BF00685594.
2. Kieliszek, M.; Lipinski, B.; Błażej, S. Application of Sodium Selenite in the Prevention and Treatment of Cancers. *Cells* 2017, 6, doi:10.3390/cells6040039.
3. Noori, S.; Mahboob, T. Sodium Selenite Attenuated Cisplatin-Induced Toxicity in Rats: Role of Electrolytes Homeostasis. *Indian J Exp Biol* 2011, 49, 791–794.
4. Dennert, G.; Horneber, M. Selenium for Alleviating the Side Effects of Chemotherapy, Radiotherapy and Surgery in Cancer Patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2006, CD005037, doi:10.1002/14651858.CD005037.pub2.
5. Spyrou, G.; Björnstedt, M.; Skog, S.; Holmgren, A. Selenite and Selenate Inhibit Human Lymphocyte Growth via Different Mechanisms. *Cancer Res* 1996, 56, 4407–4412.
6. Olm, E.; Jönsson-Videsäter, K.; Ribera-Cortada, I.; Fernandes, A.P.; Eriksson, L.C.; Lehmann, S.; Rundlöf, A.-K.; Paul, C.; Björnstedt, M. Selenite Is a Potent Cytotoxic Agent for Human Primary AML Cells. *Cancer Letters* 2009, 282, 116–123, doi:10.1016/j.canlet.2009.03.010.
7. Li, Z.; Meng, J.; Xu, T.-J.; Qin, X.-Y.; Zhou, X.-D. Sodium Selenite Induces Apoptosis in Colon Cancer Cells via Bax-Dependent Mitochondrial Pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013, 17, 2166–2171.
8. Olm, E. Cytotoxic Mechanisms of Selenium in Cancer; Institutionen för laboratoriemedicin / Department of Laboratory Medicine, 2009; ISBN 978-91-7409-732-0.
9. Wallenberg, M.; Misra, S.; Björnstedt, M. Selenium Cytotoxicity in Cancer. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2014, 114, 377–386, doi:10.1111/bcpt.12207.

10. Tan, S.; Mo, J.; Zhang, Z.; Huang, C.; Zou, Y.; Sun, J. Sodium Selenite Accentuates the Therapeutic Effect of Adriamycin Prodrug (PADM) against Gastric Cancer. *Biomed Res Int* 2019, 2019, 2035682, doi:10.1155/2019/2035682.
11. Caffrey, P.B.; Frenkel, G.D. Selenite Enhances and Prolongs the Efficacy of Cisplatin Treatment of Human Ovarian Tumor Xenografts. *In Vivo* 2012, 26, 549–552.
12. YANG, Y.; LUO, H.; HUI, K.; CI, Y.; SHI, K.; CHEN, G.; SHI, L.; XU, C. Selenite-Induced Autophagy Antagonizes Apoptosis in Colorectal Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Oncol Rep* 2016, 35, 1255–1264, doi:10.3892/or.2015.4484.
13. Thamilselvan, V.; Menon, M.; Thamilselvan, S. Combination of Carmustine and Selenite Effectively Inhibits Tumor Growth by Targeting Androgen Receptor, Androgen Receptor-Variants, and Akt in Preclinical Models: New Hope for Patients with Castration Resistant Prostate Cancer. *Int J Cancer* 2016, 139, 1632–1647, doi:10.1002/ijc.30189.
14. Evans, S.O.; Khairuddin, P.F.; Jameson, M.B. Optimising Selenium for Modulation of Cancer Treatments. *Anticancer Res* 2017, 37, 6497–6509, doi:10.21873/anticancer.12106.
15. Mehdi, Y.; Hornick, J.-L.; Istasse, L.; Dufrasne, I. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. *Molecules* 2013, 18, 3292–3311, doi:10.3390/molecules18033292.
16. Ganther, H.E. Selenium Metabolism, Selenoproteins and Mechanisms of Cancer Prevention: Complexities with Thioredoxin Reductase. *Carcinogenesis* 1999, 20, 1657–1666, doi:10.1093/carcin/20.9.1657.
17. Qi, Y.; Schoene, N.W.; Lartey, F.M.; Cheng, W.-H. Selenium Compounds Activate ATM-Dependent DNA Damage Response via the Mismatch Repair Protein HMLH1 in Colorectal Cancer Cells. *J Biol Chem* 2010, 285, 33010–33017, doi:10.1074/jbc.M110.137406.
18. Rudolf, E.; Rudolf, K.; Cervinka, M. Selenium Activates P53 and P38 Pathways and Induces Caspase-Independent Cell Death in Cervical Cancer Cells. *Cell Biol Toxicol* 2008, 24, 123–141, doi:10.1007/s10565-007-9022-1.
19. Olm, E.; Fernandes, A.P.; Hebert, C.; Rundlof, A.K.; Larsen, E.H.; Danielsson, O.; Bjornstedt, M. Extracellular Thiol-Assisted Selenium Uptake Dependent on the x(c)(-) Cystine Transporter Explains the Cancer-Specific Cytotoxicity of Selenite. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106, 11400–11405, doi:10.1073/pnas.0902204106.
20. National Cancer Institute Available online: <https://www.cancer.gov/cancertopics/types/pancreatic>. (accessed on 5 March 2021).
21. Global Cancer Observatory Available online: <https://gco.iarc.fr/> (accessed on 12 December 2020).
22. O'Driscoll, L.; Walsh, N.; Larkin, A.; Ballot, J.; Ooi, W.S.; Gullo, G.; O'Connor, R.; Clynes, M.; Crown, J.; Kennedy, S. MDR1/P-Glycoprotein and MRP-1 Drug Efflux Pumps in Pancreatic Carcinoma. *Anticancer Res* 2007, 27, 2115–2120.
23. Ducreux, M.; Cuhna, A.S.; Caramella, C.; Hollebecque, A.; Burtin, P.; Goéré, D.; Seufferlein, T.; Haustermans, K.; Van Laethem, J.L.; Conroy, T.; et al. Cancer of the

- Pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann Oncol* 2015, 26 Suppl 5, v56-68, doi:10.1093/annonc/mdv295.
24. Chou, T.; Martin, N. *CompuSyn for Drug Combinations. Pc Software and User's Guide.* ComboSyn Inc Paramus NJ 2005.
 25. Grada, A.; Otero-Vinas, M.; Prieto-Castrillo, F.; Obagi, Z.; Falanga, V. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *J Invest Dermatol* 2017, 137, e11–e16, doi:10.1016/j.jid.2016.11.020.
 26. Prados, J.; Melguizo, C.; Rama, A.R.; Ortiz, R.; Segura, A.; Boulaiz, H.; Vélez, C.; Caba, O.; Ramos, J.L.; Aránega, A. Gef Gene Therapy Enhances the Therapeutic Efficacy of Doxorubicin to Combat Growth of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010, 66, 69–78, doi:10.1007/s00280-009-1135-1.
 27. Ware, M.J.; Colbert, K.; Keshishian, V.; Ho, J.; Corr, S.J.; Curley, S.A.; Godin, B. Generation of Homogenous Three-Dimensional Pancreatic Cancer Cell Spheroids Using an Improved Hanging Drop Technique. *Tissue Eng Part C Methods* 2016, 22, 312–321, doi:10.1089/ten.TEC.2015.0280.
 28. Doello, K. A New Pentachrome Method for the Simultaneous Staining of Collagen and Sulfated Mucopolysaccharides. *Yale J Biol Med* 2014, 87, 341–347.
 29. Hatfield, D.L.; Yoo, M.-H.; Carlson, B.A.; Gladyshev, V.N. Selenoproteins That Function in Cancer Prevention and Promotion. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1790, 1541–1545, doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.001.
 30. Radomska, D.; Czarnomysy, R.; Radomski, D.; Bielawski, K. Selenium Compounds as Novel Potential Anticancer Agents. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 1009, doi:10.3390/ijms22031009.
 31. Brodin, O.; Eksborg, S.; Wallenberg, M.; Asker-Hagelberg, C.; Larsen, E.H.; Mohlkert, D.; Lenneby-Helleday, C.; Jacobsson, H.; Linder, S.; Misra, S.; et al. Pharmacokinetics and Toxicity of Sodium Selenite in the Treatment of Patients with Carcinoma in a Phase I Clinical Trial: The SECAR Study. *Nutrients* 2015, 7, 4978–4994, doi:10.3390/nu7064978.
 32. Miller, D.W.; Batrakova, E.V.; Kabanov, A.V. Inhibition of Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP) Functional Activity with Pluronic Block Copolymers. *Pharm Res* 1999, 16, 396–401, doi:10.1023/a:1018873702411.
 33. Gock, M.; Linnebacher, M.; Nauheimer, D.; Schmidt, J.; Klar, E.; Eisold, S. Influence of Chemotherapeutic Treatment on Expression of Human Multidrug Resistance Protein (ABCC, ABCB) Family Members in Pancreatic Cancer Cell Lines. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research* 2013, 2, 719–725, doi:10.6051/.
 34. Soukupová, K.; Rudolf, E. Suppression of Proliferation and Activation of Cell Death by Sodium Selenite Involves Mitochondria and Lysosomes in Chemoresistant Bladder Cancer Cells. *J Trace Elem Med Biol* 2019, 52, 58–67, doi:10.1016/j.jtemb.2018.11.009.
 35. David, K.K.; Andrabi, S.A.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L. Parthanatos, a Messenger of Death. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009, 14, 1116–1128.
 36. Hsieh, C.-C.; Papaconstantinou, J. Thioredoxin-ASK1 Complex Levels Regulate ROS-Mediated P38 MAPK Pathway Activity in Livers of Aged and Long-Lived Snell Dwarf Mice. *FASEB J* 2006, 20, 259–268, doi:10.1096/fj.05-4376com.

37. Habiro, A.; Tanno, S.; Koizumi, K.; Izawa, T.; Nakano, Y.; Osanai, M.; Mizukami, Y.; Okumura, T.; Kohgo, Y. Involvement of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Gemcitabine-Induced Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 316, 71–77, doi:10.1016/j.bbrc.2004.02.017.
38. Xu, B.-Q.; Fu, Z.-G.; Meng, Y.; Wu, X.-Q.; Wu, B.; Xu, L.; Jiang, J.-L.; Li, L.; Chen, Z.-N. Gemcitabine Enhances Cell Invasion via Activating HAb18G/CD147-EGFR-PSTAT3 Signaling. *Oncotarget* 2016, 7, 62177–62193, doi:10.18632/oncotarget.11405.
39. Liu, J.; Wang, Z. Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 2015, 294303, doi:10.1155/2015/294303.
40. Espey, M.G.; Chen, P.; Chalmers, B.; Drisko, J.; Sun, A.Y.; Levine, M.; Chen, Q. Pharmacologic Ascorbate Synergizes with Gemcitabine in Preclinical Models of Pancreatic Cancer. *Free Radic Biol Med* 2011, 50, 1610–1619, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.007.
41. Saeed Ali, M.; Mohamed Hussein, R.; Ahmed Kandeil, M. The Pro-Oxidant, Apoptotic and Anti-Angiogenic Effects of Selenium Supplementation on Colorectal Tumors Induced by 1,2-Dimethylhydrazine in BALB/C Mice. *Rep Biochem Mol Biol* 2019, 8, 216–226.