

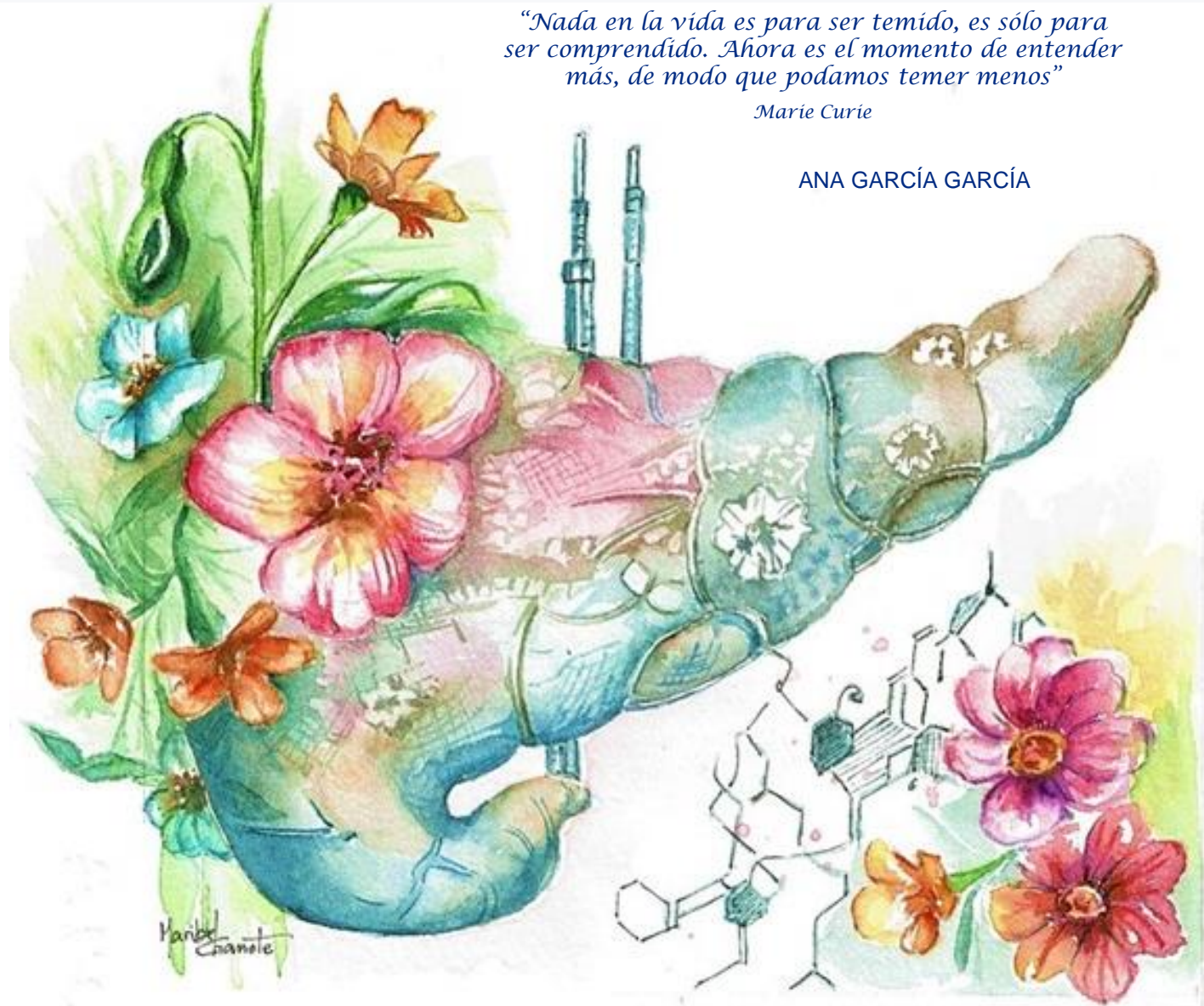
Las elongasas de ácidos grasos de cadena muy larga (ELOVLs) como dianas terapéuticas en el adenocarcinoma ductal de páncreas

El adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) es una enfermedad devastadora, marcada por una tasa de supervivencia de sólo el 12%. En consecuencia, la exploración de estrategias terapéuticas novedosas se convierte en un imperativo clínico crítico. Entre las alteraciones genéticas que contribuyen al ADP, la sobre expresión de c-MYC se debe a mutaciones secuencia arriba, amplificaciones y alteraciones en el número de copias. c-MYC es un regulador clave en la reprogramación metabólica tumoral y desempeña un papel fundamental en la proliferación, migración y metástasis. Este estudio profundiza en la investigación del papel de las elongasas de ácidos grasos de cadena muy larga en la transformación celular inducida por c-MYC, y su potencial como dianas terapéuticas en ADP. Demostramos que c-MYC regula la elongación lipídica para promover la transformación celular, ofreciendo una nueva vía de intervención terapéutica. Inicialmente, mostramos la regulación directa de la expresión de las ELOVLs por c-MYC en varios modelos de ratón y líneas celulares de ADP, elucidando su sobre expresión durante la transformación y progresión tumoral. La inhibición genética o química de ELOVL6 o ELOVL1 resulta en una disminución de la proliferación y migración, acompañada de alteraciones en la elongación de ácidos grasos. Estos cambios en la composición de ácidos grasos conducen a modificaciones en la rigidez, permeabilidad y grosor de la membrana, que afectan colectivamente a la micropinocitosis y macropinocitosis. Es importante destacar que observamos un aumento de la captación de Abraxane y un efecto sinérgico cuando se combina con la interferencia de ELOVL6 o ELOVL1 *in vitro*. La validación *in vivo* demuestra que la inhibición de ELOVL6 reduce significativamente el crecimiento tumoral y mejora la respuesta a Abraxane, aumentando así la supervivencia global. En conjunto, estos resultados posicionan al metabolismo lipídico, y específicamente a ELOVL6 y ELOVL1, como prometedoras dianas terapéuticas en el tratamiento del ADP.

“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”

Marie Curie

ANA GARCÍA GARCÍA



Programa de Doctorado en Biotecnología, Medicina y Ciencias Biosanitarias

TESIS DOCTORAL

Las elongasas de ácidos grasos de cadena muy larga (ELOVLs) como dianas terapéuticas en el adenocarcinoma ductal de páncreas



Ana García García

DIRECTOR

Dr. Víctor Javier Sánchez-Arévalo Lobo

Pozuelo de Alarcón (Madrid), 2025

“Me parece haber sido sólo un niño jugando en la orilla del mar, divirtiéndose y buscando una piedra más lisa o una concha más bonita de lo normal, mientras el gran océano de la verdad yacía ante mis ojos con todo por descubrir”

Isaac Newton (1642-1727)

AGRADECIMIENTOS

Para comenzar, quiero dar las gracias a todas las personas que han estado conmigo en estos casi cinco años en el grupo de Oncología Molecular.

Al doctor *Víctor Javier Sánchez-Arévalo*, mi director de mi tesis. Gracias por haberme acogido cuando mi relación con la ciencia estaba en su peor momento, y haberte dedicado personal y profesionalmente a que volviese a enamorarme de ella. Gracias Vic por hacerme parte de este magnífico grupo y haber depositado en mí la confianza para llevar a cabo este precioso proyecto. Gracias por tu dirección y dedicación, tus consejos y hasta tus regañinas cuando han sido necesarias. Gracias por tu cercanía, comprensión y enseñanzas. Pero sobre todo gracias por haberme guiado en mi carrera como científica, y por todas esas pequeñas conversaciones sobre lo verdaderamente importante. Siempre dices que, durante la tesis, habrá días que te amemos y días que te queramos matar. Te aseguro que los primeros se han comido a los segundos, y de los malos ratos ni me acuerdo. Aunque esta etapa llegue a su fin, me llevo para siempre todo lo que he aprendido contigo. Has sido el mejor jefe y maestro que podría imaginar.

A la *Universidad Francisco de Vitoria*, porque desde 2014 es hogar, literal y figuradamente, y me ha formado en mi carrera como biotecnóloga, poniendo a mi disposición los conocimientos acerca del campo más bonito que existe, abriendo mi mente a la inmensidad de la naturaleza que nos rodea y de las pequeñas cosas, pero también me ha visto crecer, cometer errores, forjar mi mentalidad y personalidad, madurar y conseguir mis objetivos. Quiero dar las gracias especialmente a *Maite Iglesias* y a *Cruz Santos*, por haber confiado en mí durante diez años y haberme brindado tantas oportunidades, solucionado los inconvenientes y celebrado los éxitos. Gracias también a mis profesores por haber estado ahí siempre que he necesitado a alguien con experiencia para pedir consejo, por vuestra cercanía, alegría y profesionalidad (*Javier Sierra, Noelia Valle, Ester Martín, Susana Martín, Javier Galán, Ana Bonnin, Olga Zafra* y el resto del equipo). Si a día de hoy me siento orgullosa de todo lo que sé, es gracias a vosotros.

A *Raúl*, porque desde hace diez años llevamos aguantándonos entre risas y puños. Por haberme recibido con tanta ilusión cuando la vida volvió a juntarnos en el hospital y haberme enseñado cómo funcionaba todo por aquí. Compartir contigo el doctorado es una de las mejores cosas que me han pasado en estos años. Ha sido un placer estar

contigo cada día, formando este “matrimonio” y criando a nuestros miles de “hijos”, cada uno a nuestra manera. Que lo que ha unido la UFV y ha reforzado la tesis, no lo separe nada.

A *María*, porque desde el primer día fuiste un gran descubrimiento, pero nunca imaginé que llegaría a encontrar a una amiga tan cercana. Te has convertido en mi pilar fundamental en el día a día en el hospital y has conseguido que disfrute del final de esta etapa, por increíble que parezca. Eres increíblemente válida, inteligente, generosa, paciente, ingeniosa, dulce y divertida. My petite little baby María, quiero que sepas que cuando piense en mi doctorado vas a ser lo primero que se venga a mi cabeza, porque en estos tres años me has cuidado, regañado, consolado, escuchado y apoyado en todo momento. Si tuviera que resumir la amistad y complicidad en el trabajo, simplemente diría tu nombre. Vas a conseguir todo lo que te propongas, porque eres la persona a la que más admiro de nuestro campo. Dejo nuestro barco con forma de zulo en buenísimas manos, capitana.

A *Ángela*, por ser la tía más simpática que conozco, aunque de eso me siento responsable. Llegaste a mi vida por obligación y te ganaste el hueco más grande de todos. Aunque siempre te repito que fuiste el embarazo más largo de la historia, no puedo estar más que orgullosa de lo bonito que nos quedó el resultado. Hasta que llegaste, yo siempre había sido la enseñada, y me hiciste ver lo mucho que me gustaba cambiar los papeles. ****, gracias por seguir aquí todos estos años después, por tu amistad y por lo bien que nos lo pasamos juntas, a voz en grito y de bar en bar.

A *Paula*, por acogerme desde el principio y pasar de conocidas a amigas. Siempre pensaré que te marchaste demasiado pronto y que no pude disfrutarte del todo, pero también sé que has encontrado tu lugar y eso me llena de alegría. Espero que allá donde vayas sigas demostrando lo talentosa y jovial que eres.

A *Sofía, Marian y Raquel* por haber hecho tan divertido mi primer año de tesis, a pesar de la situación tan extraña que vivíamos en el hospital por la pandemia. Sin duda fue uno de los años más divertidos y os tengo un cariño enorme. Sois unas niñas increíbles y os habéis convertido en unas auténticas profesionales, os admiro.

A *Raquel*, por enseñarme tantísimas cosas y haber sido un apoyo tan grande para avanzar en este proyecto. A *Javi*, por tu simpatía y buen corazón, y mantener el cariño

que nos tienes allá donde vas. A *Maru*, porque aunque estuviste poco me descubriste el maravilloso mundo de las telas aéreas.

A *Carmen*, por tu espontaneidad, alegría y optimismo; que nadie pare nunca tu fe y esa sonrisa que llevas por bandera. A *Ari*, por enseñarme que el camino no siempre es fácil, pero que con esfuerzo y constancia siempre se consiguen los resultados que uno desea; gracias por enseñarme además que las razones personales son la motivación más fuerte que existe. A *Esther*, por tu jovialidad y enseñarme que la vida tiene grandes lecciones y el mejor maestro es el mundo, no los libros.

A *Alberto, Germán, Antonio, Alejandra, Javi y Sara* por descubrirme el “maravilloso” mundo de la bioinformática. Os prometo que, hasta vuestra llegada, siempre me había horrorizado. Pero habéis sabido ayudarme infinitamente y tener una paciencia inmensa para hacer que esta negada llegue a comprender lo que es TrimGalore, un GSEA o un PCA, gracias a vuestro intensivo programa de “Bioinformatics for dummies”.

A *Maik*, por haber depositado tu confianza en mí para llevarla más allá de la amistad. Siempre agradeceré el haberte tenido aquí y poder tener un amigo que entienda lo que estoy haciendo y al que poder darle la chapa fuera del laboratorio. Eres lo más.

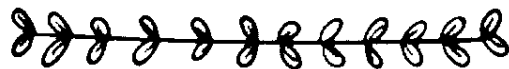
A *Elena*, por haber hecho siempre hincapié en lo mucho que te gustaban mis explicaciones y en lo agradecida que estabas de haber aprendido tanto en tan poco tiempo. Espero que mi pasión por lo que hacemos te haya llenado el corazón.

A *David*, por ser el pibardo más guay con el que me he cruzado en mi vida. Eres dulce, atento y trabajador como nadie. Muchísimas gracias por todos los momentos divertidos, atenderme en los malos y la complicidad que hemos llegado a tener. A las trillizas, *Lucía, Paula y Lis*, por haber sido un auténtico terremoto de alegría y diversión en este último año. Espero haber podido enseñaros e impulsaros, y haberos descubierto lo bonito que puede llegar a ser trabajar en un laboratorio, a pesar de todo el esfuerzo. A *Paula*, mi titi, por haberme demostrado lo increíblemente buena que eres desde la primera semana (en el laboratorio y en la vida) y haber hecho tan fácil el enseñarte. Espero que hayas aprendido y disfrutado a mi lado. Los cinco habéis hecho de este último año el caos más divertido de toda mi tesis, y nunca pensé que ser madre de tantos hijos podría llegar a ser tan alegre y agotador.

A *Daniela*, porque toda tu experiencia y serenidad me ha traído la calma y seguridad que necesitaba en el momento más estresante de mi tesis, y ojalá haber podido disfrutar más de ti, de tu buen hacer y de la dulzura e ilusión que pones en todo lo que haces.

A *Montse*, por haberme enseñado a tratar a los animales con los que trabajamos con ternura, respeto y humanidad, y haber escuchado mis dramas al son de suturas, inyecciones subcutáneas y sondas gástricas. A *Inés* y *Juan Carlos* por siempre brindar vuestra ayuda cuando la genómica y la proteómica se ponen feas. A *Juan*, por toda la ternura con la que me has tratado estos cinco años y haberme enseñado “un páncreas de verdad”.

A todos mis colaboradores del Hospital 12 de Octubre, el IIS La Fe, KU Leuven, la Universidad Francisco de Vitoria y la Universidad Complutense de Madrid, por haberme ayudado a sacar adelante muchos aspectos de este proyecto tan bonito. Sin vosotros no habría llegado a tan buen puerto, gracias.



Esta tesis está dedicada a las personas que me cuidan, refuerzan y sostienen constantemente. Mi familia: mis padres y Pedro.

A mis padres, *David* y *Cristina*, por apoyarme hasta en las decisiones más insignificantes y por luchar por hacer realidad cada uno de mis sueños. Habéis sabido educarme en el esfuerzo, la constancia, la disciplina y el amor. Os debo quién soy y todos mis logros. Nunca voy a poder demostraros lo agradecida que estoy y lo mucho que os quiero. Gracias por darlo todo por mí y por sanarme con vuestro amor.

A *Pedro*, por ser la luz de mi vida y agarrar mi mano en cada etapa del camino. Gracias por sostenerme en cada paso que doy, por tu dulzura, tu cariño y tu paciencia. Gracias por soportar todos mis dramas y mis lecciones magistrales cada vez que me toca exponer, a pesar de no entender ni una palabra de lo que digo. Gracias a tu familia por haberme acogido como una más. Eres todo lo que siempre soñé y no podría pedir un compañero de vida mejor. Te quiero.

A mis tíos *Nuria y Juan Pedro*, porque sois mis segundos padres y pase lo que pase estáis ahí, y porque habéis seguido mi día a día y confiado en mí desde el principio. A mis abuelos, *Manolo y Pepi*. Abuelo, gracias por considerarme la única persona que puede sacarte una sonrisa, incluso en los días en los que estás más gruñón; ahora ya por fin soy doctora, como llevas llamándome todos estos años. Abuela, gracias por enseñarme el esfuerzo que ponen las mujeres en conseguir sacar adelante las cosas que quieren; te mando un beso enorme a las estrellas y estoy segura de que estás orgullosa de mí.

Al resto de mi familia, porque tengo el privilegio de pertenecer a una familia grande y unida, y que siempre está presente en la vida de los demás para lo bueno y lo malo. Contar siempre con vuestra red de sustento es una de las suertes de mi vida.

A mis amigos, por ser vitamina y calma en la tempestad. A las *Pakis*, por ser mi familia lejos de casa; teneros cerca me hace sentir querida y segura. A los *Pikuches*, por seguir en mi vida un paso más y demostrarme que, también al revés, de la familia surgen los mejores amigos. A *Lucía y María*, por demostrarme el valor de la verdadera amistad, que perdura incluso en la distancia y en el tiempo. A *Vero y Raúl*, por haber comenzado conmigo este camino docente, en el que nos embarcamos con ilusión y apoyo mutuo.

A *Isa y Laura*, porque esta aventura empezó de vuestra mano, y siempre es reconfortante contar con personas que, además de brindarte su amistad, entiendan la montaña rusa que supone este trabajo. Las tres lo hemos conseguido, una vez más, juntas.

A mis compañeros del CNIC (*Jesús, Laura, Ana, Vane, Piedad y Carmen*) porque, aunque no acabase con vosotros, siempre hay que recordar de dónde viene uno, y vuestra dedicación sembró en mí la semilla que hoy da lugar a esta tesis. Gracias por no abandonarme incluso cuando quise dejarlo todo y por enseñarme a ser mejor científica y muchísimo más fuerte.

A mis profesores, especialmente *Inma y Juan Carlos*, porque desde bien temprano se dieron cuenta del potencial que había en mí y decidieron mostrarme las maravillas de la ciencia, depositaron su confianza en una Ana sin apenas conocimientos y siguen a día de hoy interesándose por mi camino y celebrando mis logros. La huella que dejasteis en mí sigue teniendo repercusión en cada etapa que vivo.

A *Maribel Garrote*, por diseñar la mejor ilustración de portada de tesis que podría haber imaginado, saber recoger mis gustos e ideas y elaborar una auténtica obra de arte que no ha dejado indiferente a ninguna persona a la que se la he mostrado. Siempre me ha fascinado tu pintura, pero ahora además formas parte del trabajo más importante que he realizado nunca.

A todos, gracias por ser y estar. Espero haceros sentir orgullosos.

ABSTRACT Y ABREVIATURAS

*“¿La ciencia ha prometido la felicidad? No lo creo.
Ha prometido la verdad y la cuestión es saber si con la
verdad se conseguirá algún día la felicidad”*

Émile Zola (1840-1902)

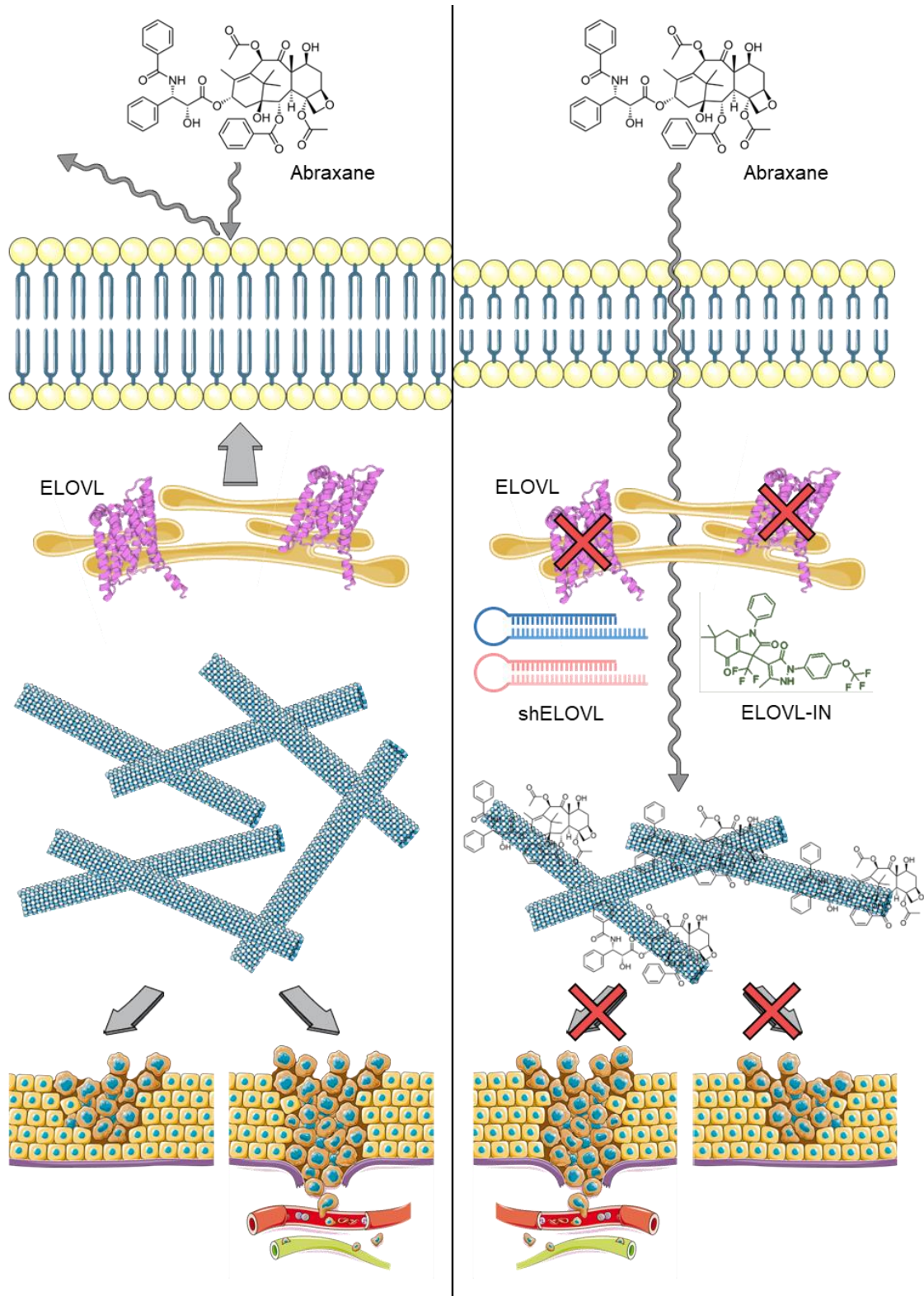


ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a devastating disease, marked by a survival rate of only 12%. Consequently, the exploration of novel therapeutic strategies becomes a critical clinical imperative. Among the genetic alterations contributing to PDAC, c-MYC overexpression arises due to upstream mutations, amplifications, and copy number alterations. c-MYC serves as a key regulator in the tumor's metabolic reprogramming, playing a pivotal role in proliferation, migration, and metastasis. This study delves into the investigation of the role of the elongases of very-long-chain fatty acids in c-MYC-induced cell transformation and its potential as therapeutic targets in PDAC. Here, we demonstrate that c-MYC regulates lipid elongation to promote cell transformation, offering a new avenue for therapeutic intervention. Initially, we show the direct regulation of ELOVLs expression by c-MYC in various PDAC mouse models and cell lines, elucidating its upregulation during transformation and tumor progression. Genetic or chemical inhibition of ELOVL6 or ELOVL1 results in decreased proliferation and migration, accompanied by alterations in fatty acid elongation. These changes in fatty acid composition led to modifications in membrane rigidity, permeability, and thickness, which collectively affect micropinocytosis and macropinocytosis. Importantly, we observe an increase in Abraxane uptake and a synergistic effect when combined with ELOVL6 or ELOVL1 interference *in vitro*. *In vivo* validation demonstrates that ELOVL6 inhibition significantly reduces tumor growth and enhances the response to Abraxane, thereby increasing overall survival. Altogether, these results position lipid metabolism, and specifically ELOVL6 and ELOVL1, as promising therapeutic targets in the treatment of PDAC.

RESUMEN

El adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) es una enfermedad devastadora, marcada por una tasa de supervivencia de sólo el 12%. En consecuencia, la exploración de estrategias terapéuticas novedosas se convierte en un imperativo clínico crítico. Entre las alteraciones genéticas que contribuyen al ADP, la sobre expresión de c-MYC se debe a mutaciones secuencia arriba, amplificaciones y alteraciones en el número de copias. c-MYC es un regulador clave en la reprogramación metabólica tumoral y desempeña un papel fundamental en la proliferación, migración y metástasis. Este estudio profundiza en la investigación del papel de las elongasas de ácidos grasos de cadena muy larga en la transformación celular inducida por c-MYC, y su potencial como dianas terapéuticas en ADP. Demostramos que c-MYC regula la elongación lipídica para promover la transformación celular, ofreciendo una nueva vía de intervención terapéutica. Inicialmente, mostramos la regulación directa de la expresión de las ELOVLs por c-MYC en varios modelos de ratón y líneas celulares de ADP, elucidando su sobre expresión durante la transformación y progresión tumoral. La inhibición genética o química de ELOVL6 o ELOVL1 resulta en una disminución de la proliferación y migración, acompañada de alteraciones en la elongación de ácidos grasos. Estos cambios en la composición de ácidos grasos conducen a modificaciones en la rigidez, permeabilidad y grosor de la membrana, que afectan colectivamente a la micropinocitosis y macropinocitosis. Es importante destacar que observamos un aumento de la captación de Abraxane y un efecto sinérgico cuando se combina con la interferencia de ELOVL6 o ELOVL1 *in vitro*. La validación *in vivo* demuestra que la inhibición de ELOVL6 reduce significativamente el crecimiento tumoral y mejora la respuesta a Abraxane, aumentando así la supervivencia global. En conjunto, estos resultados posicionan al metabolismo lipídico, y específicamente a ELOVL6 y ELOVL1, como prometedoras dianas terapéuticas en el tratamiento del ADP.



ABREVIATURAS

4-OHT	4-hidroxitamoxifeno (<i>4-hydroxytamoxifen</i>)
ACCA	Acetil-CoA carboxilasa alfa (<i>acetyl-CoA carboxylase alpha</i>)
ACLY	ATP citrato liasa (<i>ATP citrate lyase</i>)
ADM	Metaplasia acino-ductal (<i>acino-ductal metaplasia</i>)
ADP	Adenocarcinoma ductal de páncreas
AKT	Ruta de las proteínas quinasas B
AM	Acetoximetilada (<i>acetoxymethylated</i>)
ARID1A	Dominio 1A de interacción con zonas ricas en AT (<i>AT-rich interaction domain 1A</i>)
ATP	Adenosín trifosfato (<i>adenosine triphosphate</i>)
BRCA2	Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 2 (<i>breast cancer type 2 susceptibility protein</i>)
CAFs	Fibroblastos asociados al cáncer (<i>cancer associated fibroblasts</i>)
CDKN2A INK4A	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A (<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>)
CaCl₂	Cloruro de calcio (<i>calcium chloride</i>)
cDNA	DNA complementario (<i>complementary DNA</i>)
CH₃OH	Metanol (<i>methanol</i>)
CHCl₃	Cloroformo, triclorometano o tricloruro de metilo (<i>chloroform o trichloromethane</i>)
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina (<i>chromatin immunoprecipitation</i>)
c-MYC	Proto-oncogén c-MYC, factor de transcripción bHLH
CoA	Coenzima A
Cpa1	Carboxipeptidasa A1 (<i>carboxypeptidase A1</i>)
CRC	Carcinoma colorrectal (<i>colorrectal carcinoma</i>)
Cre	Recombinasa Cre
Ct	Umbral de ciclo

DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
ddCt	Delta-delta Ct (método $2^{-\Delta\Delta Ct}$)
DEGs	Genes diferencialmente expresados (<i>differentially expressed genes</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
E2F	Factor de transcripción E2F o proteína de unión a retinoblastoma (<i>E2F transcription factor o retinoblastoma-binding protein</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
EGTA	Ácido de etilenglicol tetraacético (<i>ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>)
Ela1	Elastasa tipo quimiotripsina 1 (<i>chymotrypsin like elastase 1</i>)
ELOVLs	Elongasas de ácidos grasos de cadena muy larga (<i>elongases of very-long-chain fatty acids</i>)
ELOVL1	Elongasa 1 de ácidos grasos de cadena muy larga (<i>elongase of very-long-chain fatty acids protein 1</i>)
ELOVL6	Elongasa 6 de ácidos grasos de cadena muy larga (<i>elongase of very-long-chain fatty acids protein 6</i>)
ER	Receptor de estrógenos (<i>estrogen receptor</i>)
ErbB2 HER2	Receptor tirosina quinasa 2 (<i>receptor tyrosine kinase 2</i>)
FAs	Ácidos grasos (<i>fatty acids</i>)
FASN	Ácido graso sintasa (<i>fatty acid synthase</i>)
FASTQ	<i>FAST-quality</i> (formato de texto de almacenamiento de secuencias biológicas y sus correspondientes valores de calidad)
FBS	Suero fetal bovino (<i>fetal bovine serum</i>)
FDR	Tasa de descubrimiento falso (<i>false discovery rate</i>)
FFT	Transformada Rápida de Fourier (<i>Fast Fourier Transform</i>)
FGF1	Factor de crecimiento de fibroblastos 1 (<i>fibroblast growth factor 1</i>)

FPKM	Fragmentos por millón de kilobases (<i>fragments per kilobase million</i>)
G12D	Mutación de sustitución de glicina (G) por ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 12
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i> (repositorio público de datos de genómicas funcionales)
GEPIA	<i>Gene Expression Profiling Interactive Analysis</i>
GO	Ontología génica (<i>Gene Ontology</i>)
GSEA	Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (<i>gene set enrichment analysis</i>), análisis de enriquecimiento funcional (<i>functional enrichment analysis</i>)
H₂O	Agua
HACD	3-hidroxiacil-CoA deshidratasa (<i>3-hydroxyacyl-CoA dehydratases</i>)
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HCl	Ácido clorhídrico o cloruro de hidrógeno (<i>hydrogen chloride</i>)
Hek	Riñón embrionario humano (<i>human embryonic kidney</i>)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-iletanosulfónico (<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid</i>)
HIF1A	Factor inducible por hypoxia 1, subunidad alfa (<i>Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha</i>)
HNSC	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HPRT	Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 (<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>)
HVG	Genes altamente variables (<i>highly variable genes</i>)
IgH	Cadena pesada de las inmunoglobulinas (<i>immunoglobulin heavy locus</i>)
IN	Inhibidor (<i>inhibitor</i>)
IPMNs	Neoplasias mucinosas papilares intraductales (<i>intraductal papillary mucinous neoplasias</i>)
KAR	3-cetoacil-CoA reductasa (<i>3-ketoacyl-CoA reductase</i>)

KD	<i>Knock-down</i>
KEGG	Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>)
KO	<i>Knockout</i>
KOH	Hidróxido de potasio (<i>potassium hydroxide</i>)
KPC	<i>Pdx1-Cre; Kras^{+/LSL-G12D}; Trp53^{+/LSL-R172H}</i>
KRAS	Proto-oncogén KRAS, GTPasa
Krt19	Queratina 19 (<i>keratin 19</i>)
LC-ESI/MS/MS	Cromatografía líquida-ionización por electrospray-espectrometría de masas en tándem (<i>Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry</i>)
LCFAs	Ácidos grasos de cadena larga (<i>long-chain fatty acids</i>)
LiCl	Cloruro de litio (<i>lithium chloride</i>)
LSI	Iniciativa de Estándares Lipidómicos (<i>Lipidomics Standards Initiative</i>)
LSL	<i>LoxP-Stop-LoxP</i> (casete utilizado en expresión génica para lograr la activación condicional de la expresión génica mediada por Cre, y que contiene dos sitios LoxP flanqueando una repetición triple de la secuencia de poliadenilación del papovirus SV-40)
MCNs	Neoplasias quísticas mucinosas (<i>mucinous cystic neoplasias</i>)
MEFs	Fibroblastos embrionarios de ratón (<i>mouse embryonic fibroblasts</i>)
microRNA	Micro RNA (<i>micro RNA</i>)
ARNm	ARN mensajero (<i>messenger RNA</i>)
MRM	Monitorización de reacciones múltiples (<i>Multiple Reaction Monitorization</i>)
NaCl	Cloruro de sodio (<i>sodium chloride</i>)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, reducido (<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NaOH	Hidróxido de sodio (<i>sodium hydroxide</i>)
NC	Recuentos normalizados (<i>normalized counts</i>)
NP-40	Nonilfenoxi-polietoxi-etanol (<i>nonyl phenoxy polyethoxy ethanol</i>)

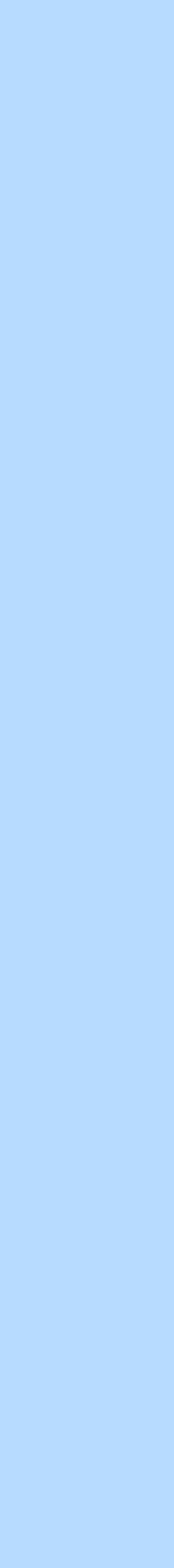
ORA	Análisis de sobrerrepresentación (<i>Over Representation Analysis</i>)
OTs	Pinzas ópticas (<i>optical tweezers</i>)
p	p-valor
p/v	Peso / volumen
PanINs	Neoplasias pancreáticas intraepiteliales (<i>pancreatic intraepithelial neoplasias</i>)
PCA	Análisis de componentes principales (<i>Principal Component Analysis</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pdx1	“Casilla de inicio” pancreática y duodenal 1 (<i>pancreatic and duodenal homeobox 1</i>)
PFA	Paraformaldehído o polyoxymethylene (<i>paraformaldehyde</i> o <i>polyoxymethylene</i>)
PRT	<i>Ptf1a-Cre-ER; Kras^{+LSL-G12D}; Rosa26^{LSL-tdTomato}</i>
Ptf1a	Factor de transcripción asociado al páncreas 1a (<i>pancreas associated transcription factor 1a</i>)
PVDF	Difluoruro de polivinilideno (<i>polyvinylidene difluoride</i>)
qPCR	PCR cuantitativa (<i>quantitative PCR</i>)
R172H	Mutación de sustitución de arginina (R) por histidina (H) en la posición del aminoácido 172
Ref	Referencia
RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
RNasa A	Ribonucleasa A
RPKM	Lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas (<i>reads per kilobase per million mapped reads</i>)
SCC	Carcinoma de pulmón de células escamosas (<i>squamous-cell carcinoma</i>)
SCLC	Carcinoma de pulmón de células pequeñas (<i>small-cell lung carcinoma</i>), carcinoma microcítico de pulmón
scRNA-seq	Secuenciación de RNA de célula única (<i>single-cell RNA-seq</i>)
SD	Desviación típica (<i>standard deviation</i>)

SDS	Dodecilsulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico o en condiciones desnaturizantes (<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
seq	Secuenciación (<i>sequencing</i>)
SFAs	Ácidos grasos saturados (<i>saturated fatty acids</i>)
shARN	RNA de horquilla corta u horquilla pequeña (<i>short hairpin RNA</i>)
SMAD4	Miembro 4 de la familia SMAD (<i>SMAD family member 4</i>)
SREBP1	Proteína de unión a elementos reguladores de esterol 1 (<i>sterol regulatory element-binding protein 1</i>)
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas Program</i>
TER	<i>Trans-2,3-enoyl-CoA reductasa (trans-2,3-enoyl-CoA reductase)</i>
TP53	Proteína tumoral P53 (<i>tumor protein P53</i>)
TRP53	
TPMs	Tránscritos por millón de lecturas (<i>transcripts per million of reads</i>)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano o 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i> o <i>2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol</i>)
TSS	Sitio de inicio de la transcripción (<i>transcriptional start site</i>)
TTBS	Tampón salino con Tris y Tween (<i>Tween-Tris-buffered saline</i>)
UMAP	<i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i>
UPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>ultra performance liquid chromatography</i>)
v/v	Volumen / volumen
VLCFAs	Ácidos grasos de cadena muy larga (<i>very-long-chain fatty acids</i>)

ÍNDICE

“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”

Marie Curie (1867-1934)



INTRODUCCIÓN	27
1. EL PÁNCREAS	29
2. EL ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO	30
2.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL ADP	30
2.2. ORIGEN Y PROGRESIÓN DEL ADP	31
2.3. FACTORES DE RIESGO DEL ADP	35
2.4. TERAPIAS Y TRATAMIENTOS ACTUALES DEL ADP	35
3. METABOLISMO Y CÁNCER.....	39
3.1. REPROGRAMACIÓN METABÓLICA EN CÁNCER.....	39
3.2. METABOLISMO LIPÍDICO Y ADP	41
4. PAPEL DE LOS LÍPIDOS EN LAS MEMBRANAS CELULARES	45
4.1. COMPOSICIÓN DE LAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS	45
4.2. FLUIDEZ, PERMEABILIDAD Y GROSOR DE LAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS.....	46
5. ELONGASAS DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA MUY LARGA	47
5.1. LA FAMILIA DE LAS ELONGASAS DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA MUY LARGA	47
5.2. PAPEL DE LAS ELOVLs EN CÁNCER.....	52
5.3. OTROS ROLES DE LAS ELOVLs	53
6. NUESTRO ESTUDIO	54
OBJETIVOS E HIÓPETSIS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	61
1. DATASETS DE REFERENCIA.....	63
2. RNA-seq	64
3. ANÁLISIS DE RNA-seq MEDIANTE GSEA.....	64
4. CHIP-seq.....	65
5. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL	65

6. scRNA-seq	66
7. CULTIVOS CELULARES	67
8. VECTORES RETROVIRALES Y LENTIVIRALES, Y PRODUCCIÓN VÍRICA	67
9. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL	69
10. WESTERN BLOT	70
11. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)	71
12. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN Y COLONIAS.....	73
13. ENSAYOS DE CICLO CELULAR	73
14. ENSAYOS DE MIGRACIÓN.....	74
15. ANÁLISIS DEL PERFIL LIPÍDICO	74
16. ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS.....	77
17. ENSAYO DE CALCEINA-AM	78
18. ENSAYO DE SINERGIA A FÁRMACOS	78
19. ENSAYO DE FLUTAX-2.....	79
20. ENSAYOS DE PINOCITOSIS	79
21. INMUNOFLUORESCENCIA.....	79
22. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	80
23. EXPERIMENTOS DE MEDIDA DE LA TENSIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA	80
24. EXPERIMENTOS DE INDENTACIÓN POR PINZAS ÓPTICAS (OTs).....	81
25. ENSAYO TUMOROGÉNICO POR XENOINJERTO <i>IN VIVO</i>	83
26. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85
RESULTADOS	87
1. c-Myc regula directamente la expresión de diferentes elongasas.....	89
2. Las <i>ELOVLs</i> están sobre expresadas durante la progresión tumoral	93
3. <i>ELOLV6</i> es la única elongasa restringida al compartimento tumoral en el ADP humano.....	95

4. c-MYC regula directamente la expresión de <i>ELOVL6</i> en líneas celulares de ADP	99
5. La interferencia de <i>ELOVL6</i> disminuye la proliferación celular y la migración <i>in vitro</i>	102
6. La interferencia de <i>ELOVL6</i> modifica la composición lipídica	113
7. La interferencia de <i>ELOVL6</i> altera las propiedades mecánicas de la membrana y su permeabilidad	118
8. La interferencia de <i>ELOVL6</i> favorece la pinocitosis.....	124
9. La interferencia de <i>ELOVL6</i> sensibiliza a la quimioterapia <i>in vitro</i>	128
10. La eficacia de la interferencia de <i>ELOVL6</i> es dependiente de los niveles de expresión de <i>c-MYC</i>	130
11. La interferencia de <i>ELOVL6</i> reduce el crecimiento tumoral y sinergiza con Abraxane <i>in vivo</i>	135
12. <i>ELOVL1</i> se presenta como otra elongasa con potencial terapéutico en ADP..	140
13. La interferencia de <i>ELOVL1</i> valida el potencial terapéutico de las elongasas en ADP	142
DISCUSIÓN.....	151
CONCLUSIONES.....	163
BIBLIOGRAFÍA.....	167

INTRODUCCIÓN

*"La imaginación es más importante que el conocimiento.
El conocimiento es limitado, mientras que
la imaginación no tiene límites"*

Albert Einstein (1879-1955)



1. EL PÁNCREAS

El páncreas es un órgano del aparato digestivo, de forma lobular y alargada, con un peso aproximado de 100 gramos, una longitud de 14 a 25 centímetros y un volumen promedio de $72,4 \pm 25,8 \text{ cm}^3$ en una persona adulta y sana (Beger et al., 2009; Saisho et al., 2007).

Está situado oblicuamente en la parte superior del abdomen, con la cabeza inmediatamente adyacente al duodeno. Su cuerpo y la cola se extienden por la línea media del cuerpo hasta un punto cercano al bazo (Atkinson et al., 2020).

Históricamente, el páncreas fue descubierto en la Antigua Grecia por los cirujanos Herófilo (325-280 a.C.) y Erasítrato (304-250 a.C.), siendo el primero fundador de la Escuela de Alejandría en Egipto y el primer médico en hacer disecciones a cadáveres humanos con fines formativos. En esta misma Escuela se formó siglos después Rufo de Éfeso, quien nombró el páncreas como tal, del griego *pan* (todo) y *kreas* (carne), debido a que en sus disecciones no apreciaba ni cartílagos ni huesos, sino que más bien se trataba de una glándula bastante uniforme. Finalmente, fue el médico del emperador Marco Aurelio, Claudio Galeno de Pérgamo (130-216 d.C.), quien intuyó por primera vez que la función de esta glándula era digestiva, debido a la similitud del jugo pancreático con la saliva (Howard & Hess, 2002; Navarro, 2014; Tando et al., 2010).

El páncreas desempeña una doble función (Bazira & Mahadevan, 2022; Kleeff et al., 2016):

Por un lado, actúa como un órgano exocrino, con funciones primordialmente digestivas. Este componente exocrino está formado a su vez de dos tipos celulares: las células acinares, que producen las enzimas digestivas, y las células ductales, responsables de formar los conductos o ductos por los que dichas enzimas se vierten al duodeno del intestino delgado, y que además secretan una solución de bicarbonato para facilitar la digestión.

Por otro lado, funciona como un órgano que secreta hormonas, denominado páncreas endocrino. Este componente está constituido por agrupaciones de células, llamadas islotes de Langerhans, las cuales son responsables de la producción y liberación de diversas hormonas a la sangre, como el glucagón y la insulina.

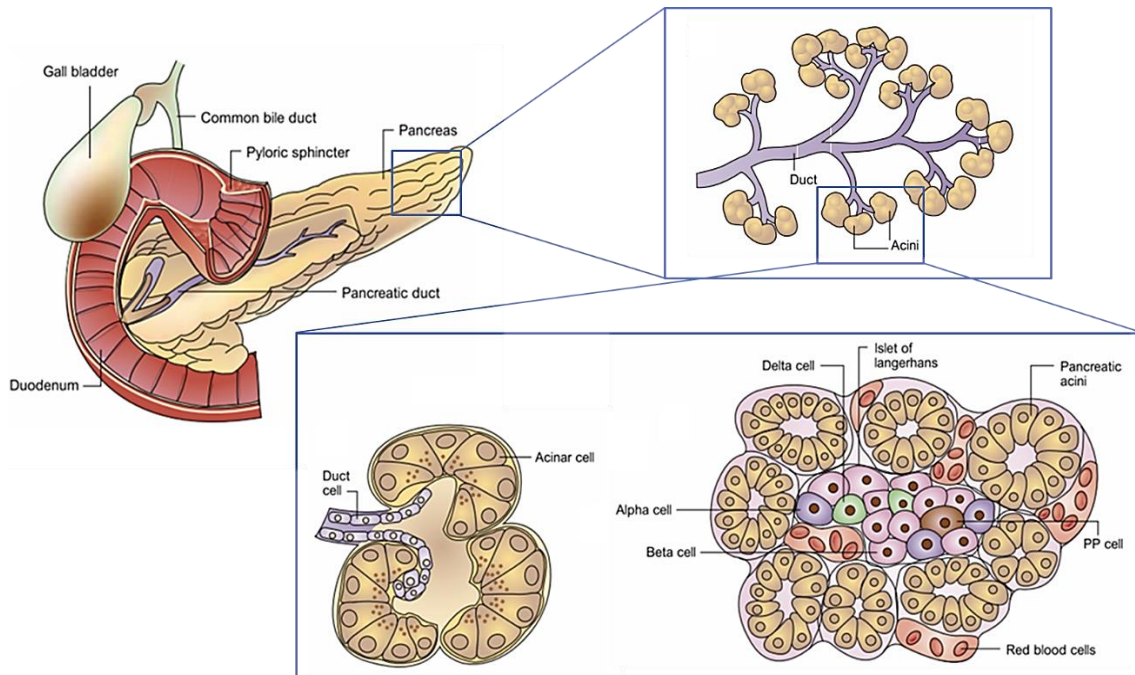


Ilustración 1. Anatomía del páncreas. El páncreas exocrino está formado por células acinares y ductales. El páncreas endocrino se organiza en islotes de Langerhans. Ilustración adaptada de Bardeesy y DePinho (Bardeesy & DePinho, 2002).

2. EL ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO

2.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL ADP

El cáncer de páncreas es una enfermedad altamente letal, con una tasa de supervivencia a cinco años de solo el 13% (Siegel et al., 2024), lo que lo convierte en uno de los cánceres más mortales a día de hoy. El impacto del cáncer de páncreas va en aumento, y se prevé que se convierta en el mundo occidental en la tercera causa de muerte por cáncer para 2025, tras el cáncer de pulmón y el colorrectal, y la segunda en 2030 (Carioli et al., 2021; Ilic & Ilic, 2022; Rahib et al., 2014; Sung et al., 2021).

Las neoplasias malignas del páncreas pueden desarrollarse a partir tanto del componente endocrino como del componente exocrino. Entre todos los subtipos de cáncer de páncreas, el adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP) es el más frecuente y representa más del 90% de los casos (Sarantis et al., 2020).

Muertes estimadas a causa del cáncer en EEUU en 2024


	Hombres			Mujeres	
Lung & bronchus	65,790	20%		Lung & bronchus	59,280 21%
Prostate	35,250	11%		Breast	42,250 15%
Colon & rectum	28,700	9%		Pancreas	24,480 8%
Pancreas	27,270 8%			Colon & rectum	24,310 8%
Liver & intrahepatic bile duct	19,120	6%		Uterine corpus	13,250 5%
Leukemia	13,640	4%		Ovary	12,740 4%
Esophagus	12,880	4%		Liver & intrahepatic bile duct	10,720 4%
Urinary bladder	12,290	4%		Leukemia	10,030 3%
Non-Hodgkin lymphoma	11,780	4%		Non-Hodgkin lymphoma	8,360 3%
Brain & other nervous system	10,690	3%		Brain & other nervous system	8,070 3%
All sites	322,800			All sites	288,920

Ilustración 2. Nuevos casos estimados de cáncer y muertes por sexo para los diez principales tipos de cáncer. Datos de Estados Unidos en 2024. Ilustración adaptada de *Siegel et al.* (Siegel et al., 2024).

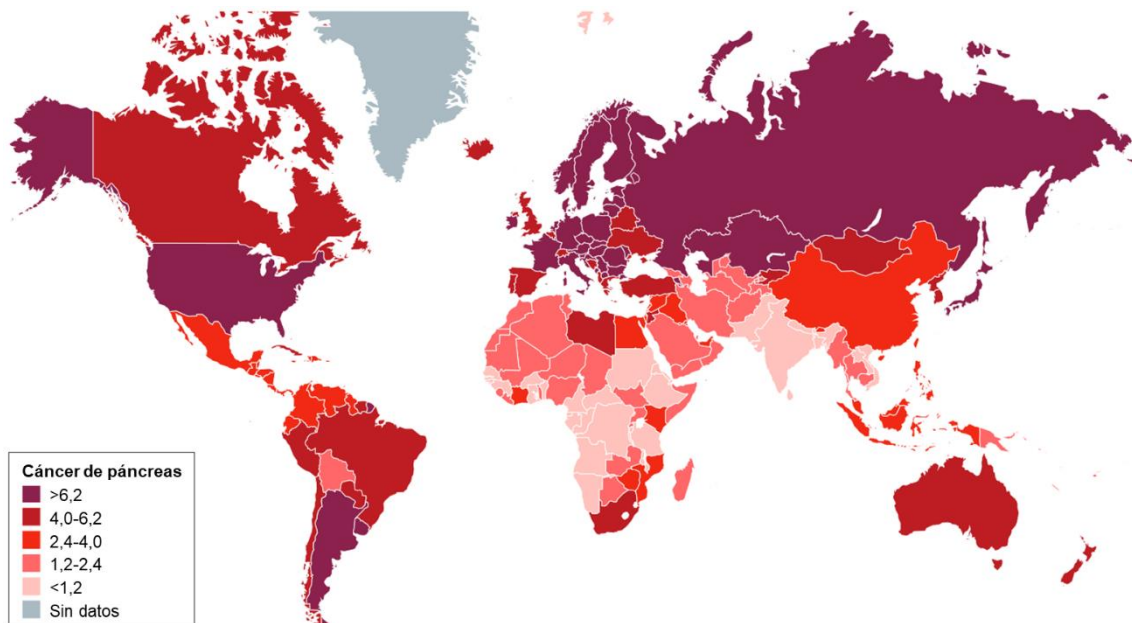


Ilustración 3. Muertes por cáncer de páncreas en el mundo. Tasas estimadas estandarizadas por edad para ambos sexos (por 100000 personas) en 2012. Ilustración extraída de *Kleeff et al.* (Kleeff et al., 2016).

2.2. ORIGEN Y PROGRESIÓN DEL ADP

Diferentes tipos celulares de los descritos anteriormente pueden ser responsables de originar el adenocarcinoma ductal de páncreas. En función de estas células

pancreáticas originarias y las lesiones precursoras que causan, se han descrito tres modelos de origen y progresión del ADP en función de sus características histológicas, genéticas y clínicas (Guerra et al., 2007; Rodríguez Gil et al., 2021; Singh et al., 2021).

En primer lugar, en los conductos pancreáticos, las células acinares y ductales pueden originar neoplasias mucinosas papilares intraductales (*intraductal papillary mucinous neoplasias*, IPMNs). Por otra parte, las células ductales pueden originar neoplasias quísticas mucinosas (*mucinous cystic neoplasias*, MCNs), responsables de la secreción de moco formando el estroma. Por último, en los conductos intralobulares, las células acinares pueden originar neoplasias pancreáticas intraepiteliales (*pancreatic intraepithelial neoplasias*, PanINs).

Estas últimas lesiones son las más prevalentes en el adenocarcinoma ductal pancreático y establecen el modelo tradicional de origen y progresión del ADP. Según este modelo, al igual que ocurre con otros tumores como el cáncer colorrectal, se van acumulando secuencialmente y de forma lineal una serie de alteraciones moleculares, que en última instancia se correlacionan con anomalías histológicas, las denominadas lesiones neoplásicas pancreáticas intraepiteliales (PanINs) (Bardeesy & DePinho, 2002; Guerra et al., 2007; Hruban et al., 2005; Makohon-Moore et al., 2017; Ren et al., 2019; Rodríguez Gil et al., 2021):

- En primer lugar, la lesión precursora de bajo grado PanIN-1A está caracterizada histológicamente por un fenotipo celular mucinoso, lo que implica una gran producción de moco supranuclear por parte de células ductales alargadas, cuyos núcleos son pequeños y se encuentran en la zona más basal. Respecto a las alteraciones moleculares, el 40% de las PanIN-1A tienen mutaciones en el gen *KRAS* y sobre expresiones en el receptor *HER2*.
- Las lesiones progresan hacia PanIN-1B, bastante similares a las PanIN-1A, con la distinción de que las células comienzan a tomar una morfología papilar o micropapilar. Genéticamente, se inactiva *CDKN2A* (*INK4A*).
- Posteriormente, las lesiones evolucionan hacia PanIN-2, de modo que las células adquieren una morfología papilar completa y anomalías nucleares moderadas. Molecularmente, aproximadamente el 55% de las PanIN-2 presentan pérdida de *CDKN2A*.

- Por último, la lesión previa al adenocarcinoma ductal de páncreas, aunque ya considerada carcinoma *in situ*, es el PanIN-3. En esta lesión podemos comenzar a apreciar necrosis y las anomalías nucleares van evolucionando hacia irregularidades graves, como una mitosis anormal y brotación de células en el lumen. Respecto a las anomalías moleculares o genéticas, nos encontramos con la inactivación del gen supresor de tumores *TP53* y con pérdidas de *SMAD4* y *BRCA2*.

- Ya en el adenocarcinoma ductal de páncreas, en el 42% de los casos se sobre expresa el oncogén *c-MYC*, como consecuencia de la sobre expresión de *KRAS*, ganancias en el número de copias o la amplificación de éstas (Hessmann et al., 2016). Del mismo modo, en este estadio tumoral aparecen mutaciones en *ARID1A* (en el 12-23% de los casos) (Witkiewicz et al., 2015) y una larga cola de mutaciones menos prevalentes.

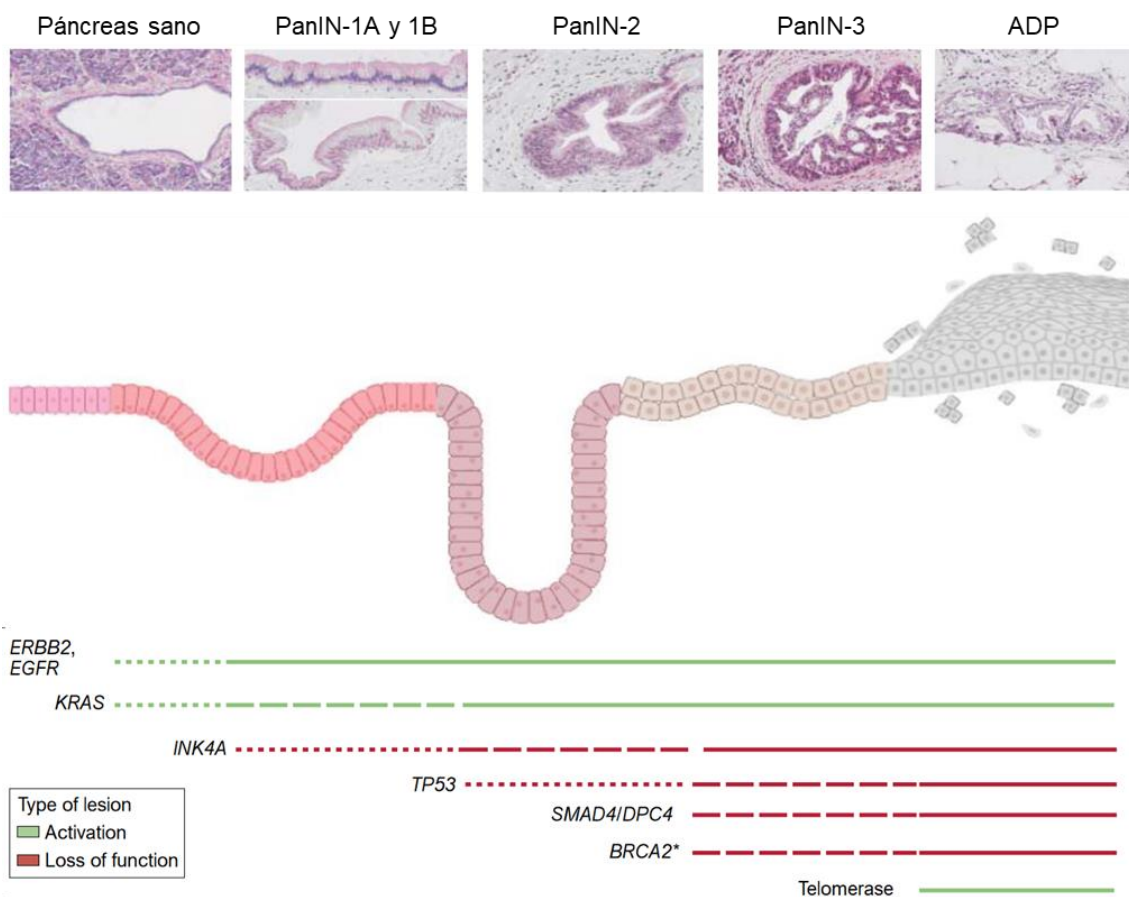


Ilustración 4. Alteraciones genéticas y anomalías histológicas de las lesiones neoplásicas pancreáticas intraepiteliales (PanINs). Ilustración adaptada de Bardeesy y DePinho y Maitra et al. (Bardeesy & DePinho, 2002; Maitra et al., 2003).

Este modelo lineal está siendo debatido en la actualidad. *Notta et al.* sugirieron que la inestabilidad del genoma y, en concreto, la cromotripsis en fases tempranas, podrían tener un impacto importante en la genética del ADP (*Notta et al., 2016*). Este modelo explicaría la rápida invasión y metástasis que presenta el ADP cuando el tumor está ya formado. También se ha demostrado recientemente la importancia de la epigenética y del metabolismo en el desarrollo y la progresión del ADP (*McDonald et al., 2017*).

Por otra parte, experimentos en modelos de ratón han demostrado que la célula acinar también puede ser precursora del desarrollo del ADP. En este sentido, los procesos inflamatorios, como la pancreatitis, inducen la des-diferenciación de la célula acinar y su posterior trans-diferenciación en una célula de tipo ductal (*ductal-like*), a través de un proceso conocido como metaplasia acinar a ductal (*acinar-to-ductal metaplasia, ADM*). Este cambio es reversible, dado que, una vez resultado el daño, la célula vuelve a su fenotipo acinar. Sin embargo, cuando el daño se mantiene, por ejemplo como consecuencia de una pancreatitis crónica, puede conducir a una transformación celular (*Guerra et al., 2007*).

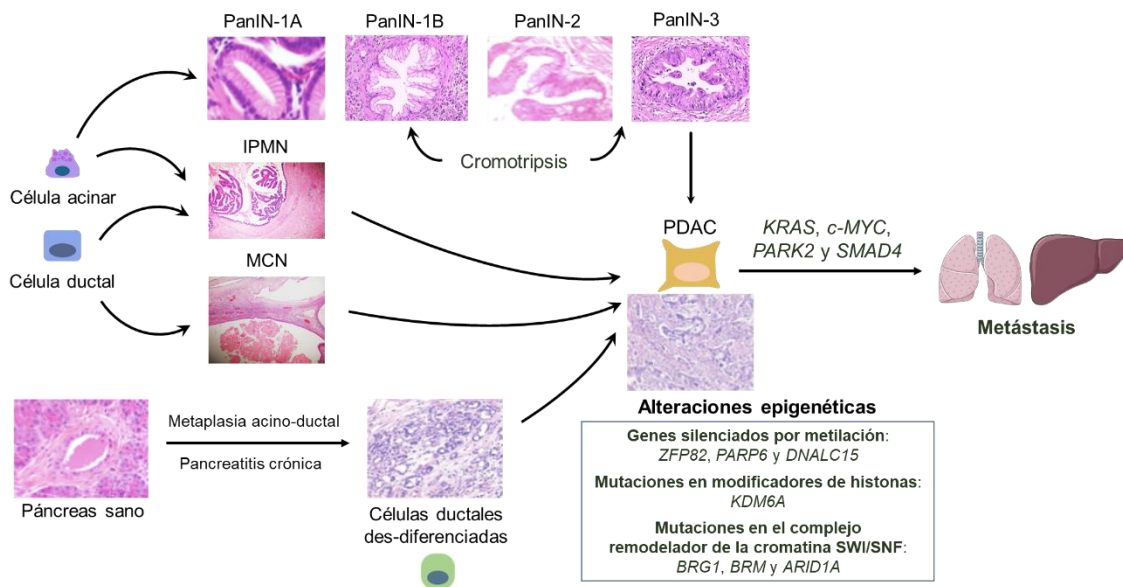


Ilustración 5. Modelos de origen y progresión del adenocarcinoma ductal de páncreas.

Ilustración adaptada de *Rodríguez Gil et al.* (*Rodríguez Gil et al., 2021*).

2.3. FACTORES DE RIESGO DEL ADP

Aunque se desconoce la etiología del desarrollo del ADP, se han identificado varios factores de riesgo que presentan cierta vinculación con su desarrollo. Dichos factores se clasifican en modificables y no modificables (Z. Zhao & Liu, 2020).

Entre los factores modificables, el tabaquismo representa el factor ambiental más importante. El consumo de cigarrillos aumenta de dos a tres veces el riesgo de padecer la enfermedad, y es proporcional al número de paquetes consumidos anualmente (Sellam et al., 2015). Además, el desarrollo del ADP se ha relacionado con el elevado consumo de alcohol, la obesidad, la baja actividad física, la exposición a agentes químicos o radiactivos, y con procesos inflamatorios, como la pancreatitis crónica (Behrens et al., 2015; Bosetti et al., 2012; Genkinger et al., 2015; Rodríguez Gil et al., 2021; Whiteman et al., 2015; Z. Zhao & Liu, 2020).

Entre los factores de riesgo no modificables, se encuentran la edad avanzada (el diagnóstico se realiza entorno a los 70 años) y el sexo, siendo ligeramente más frecuente en hombres que en mujeres. También se ha vinculado con la diabetes tipo I y II (Z. Zhao & Liu, 2020). Además, aproximadamente el 10% de los pacientes presentan predisposición genética debido a variaciones o alteraciones genéticas. Varias mutaciones germinales en *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *CDKN2A*, *STK11* y *TP53*, y en genes de reparación de errores como *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* y *EPCAM* se han identificado como genes de susceptibilidad hereditarios (Kasuga et al., 2022). También se ha observado una asociación con síndromes de cáncer familiar como el cáncer colorrectal hereditario (síndrome de Lynch), el melanoma atípico familiar de lunares múltiples, síndrome de Peutz-Jeghers, síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario y cáncer de páncreas familiar (Kasuga et al., 2022; Rodríguez Gil et al., 2021).

2.4. TERAPIAS Y TRATAMIENTOS ACTUALES DEL ADP

Como se ha mencionado anteriormente, el cáncer de páncreas es una enfermedad con una alta mortalidad, ya que su tasa de supervivencia relativa a los cinco años es de únicamente el 13%, y que apenas ha mejorado su pronóstico en las últimas décadas (Siegel et al., 2024). Estos terribles datos se deben a varios factores.

En primer lugar, destaca el diagnóstico tardío, cuando el tumor ya ha metastatizado, el cual se da en el 47% de los casos, y cuya supervivencia relativa a cinco años asociada es del 3% (Siegel et al., 2024). Este hecho se debe a que los pacientes apenas presentan síntomas durante las primeras etapas de la enfermedad, hasta que aproximadamente el 90% del páncreas está dañado, y por lo tanto la presencia de metástasis es elevada. Es por ello que la resección quirúrgica solo es posible en aproximadamente el 10% de los casos.

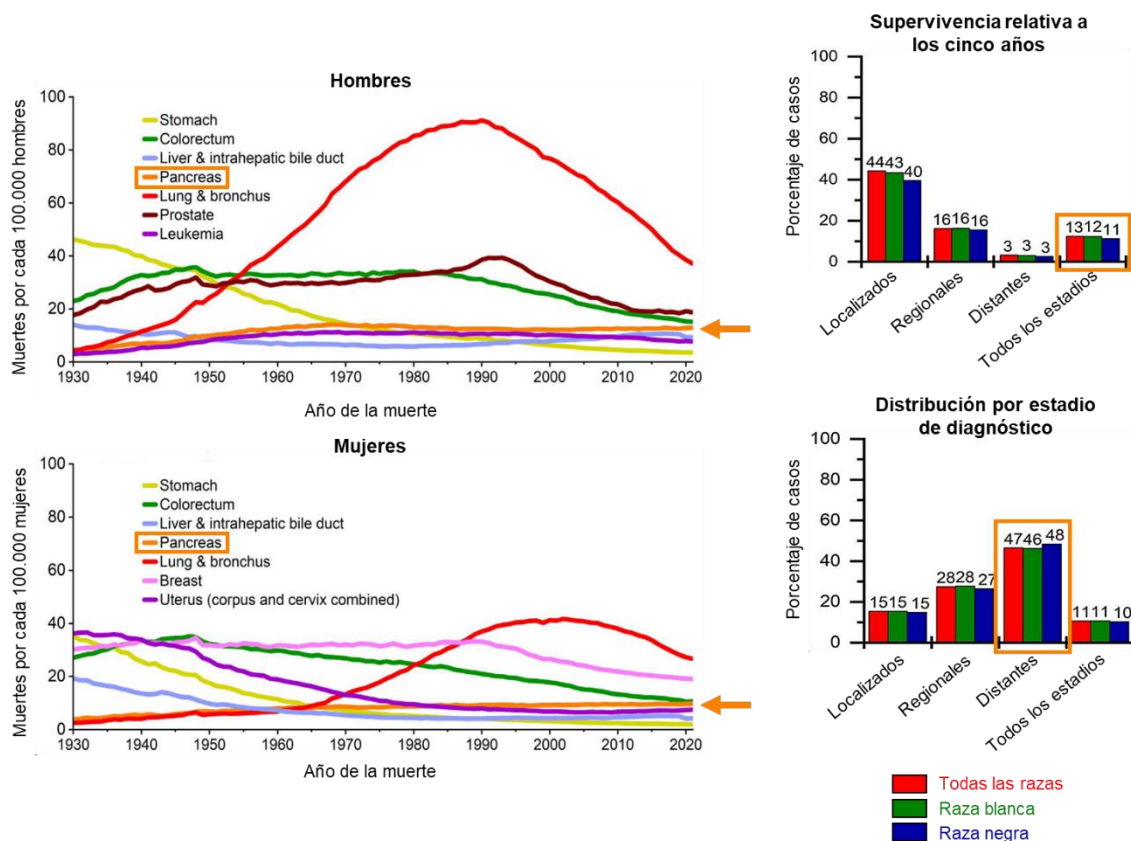


Ilustración 6. Estadísticas sobre la supervivencia del cáncer de páncreas. En la parte izquierda, podemos observar la tendencia de la tasa de mortalidad para cada cáncer según el sexo; el cáncer de páncreas se señala en naranja; datos de Estados Unidos en 1930-2021. En la parte derecha, se aprecia la supervivencia relativa a los cinco años del cáncer de páncreas y el estadio en el cual se realiza el diagnóstico; datos de Estados Unidos en 2013-2019 y analizados en 2020. Ilustración adaptada de Siegel et al. (Siegel et al., 2024).

Por otra parte, el adenocarcinoma ductal pancreático presenta una alta quimiorresistencia debida a una pobre vascularización y un denso estroma fibroso (Bijlsma & van Laarhoven, 2015; Kleeff et al., 2016; Zeng et al., 2019; Z. Zhao & Liu, 2020). Estos dos factores, junto a un microambiente tumoral inmunosupresor,

convierten al ADP en un tumor frío, es decir, con una muy baja infiltración inmune antitumoral (Velasco et al., 2023; Zhan et al., 2017).

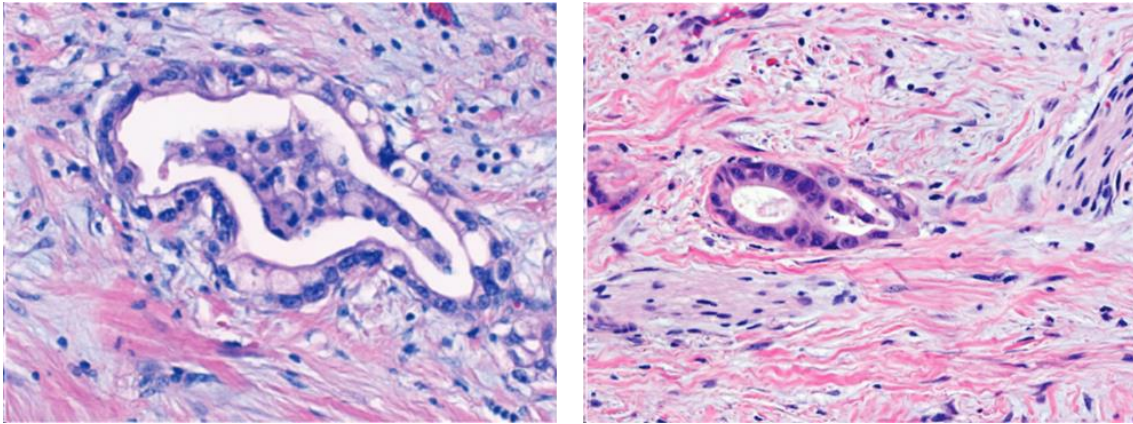


Ilustración 7. Los adenocarcinomas se caracterizan por glándulas neoplásicas atípicas en un estroma denso. Destaca la extensa fibrosis asociada a las glándulas neoplásicas. Imagen de adenocarcinoma ductal de páncreas teñido con hematoxilina y eosina. Ilustración extraída de Kleeff et al. (Kleeff et al., 2016).

A pesar de que este denso estroma y quimiorresistencia dificulta el acceso de los quimioterápicos a la zona diana (Sarantis et al., 2020), el abordaje terapéutico estandarizado se centra en la quimioterapia (Z. Zhao & Liu, 2020):

- Si ha sido posible la resección radical, se suele administrar una quimioterapia adyuvante basada en FOLFIRINOX (leucovorina cálcica, 5-fluorouracilo, clorhidrato de irinotecán y oxaliplatino) durante seis meses, o bien la combinación gemcitabina y capecitabina, para mejorar significativamente la tasa de supervivencia global y libre de enfermedad.
- Para pacientes con metástasis, se administra con mayor frecuencia una combinación de fármacos como FOLFIRINOX, gemcitabina y Abraxane (paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina, nab-paclitaxel). Si el paciente no es apto para la quimioterapia combinada, la gemcitabina es la primera elección.
- Para los pacientes con ADP localmente avanzado, la terapia combinada de quimioterapia (gemcitabina) y radioterapia es la primera elección (Seufferlein et al., 2019).

Por lo tanto, las tres aproximaciones quimioterapéuticas más empleadas para el tratamiento del adenocarcinoma ductal de páncreas son:

- Gemcitabina: pertenece al grupo de los análogos de nucleósidos. Está indicada en el tratamiento de pacientes con adenocarcinoma localmente avanzado o metastático del páncreas. Según su ficha técnica, la dosis recomendada es de 1000 mg/m² de superficie corporal, administrados en perfusión intravenosa de 30 minutos en ciclos de tres a siete semanas. La reducción de la depende del grado de toxicidad experimentado por el paciente.

- Abraxane o paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina: el paclitaxel pertenece a un grupo de medicamentos denominados “taxanos” que estabilizan los microtúbulos e impiden su despolimerización. El paclitaxel es la parte del medicamento que actúa como fármaco antitumoral, mientras que la albúmina es la parte que ayuda al paclitaxel a disolverse en la sangre y atravesar las paredes de los vasos sanguíneos para llegar al tumor. El nab-paclitaxel entra en las células mediante pinocitosis (Cullis et al., 2017; Lim & Gleeson, 2011). Según su ficha técnica, la dosis recomendada es de 125 mg/m² de superficie corporal, administrados durante 30 minutos una vez por semana durante tres semanas, seguido de gemcitabina.

- FOLFIRINOX: quimioterapia combinada que incluye los medicamentos leucovorina cálcica, 5-fluorouracilo, clorhidrato de irinotecán y oxaliplatino. La leucovorina cálcica es el único componente que no es quimioterápico en sí, sino que se trata de una forma de ácido fólico que aumenta el efecto anticancerígeno del 5-fluorouracilo. Según el protocolo de tratamiento farmacológico antitumoral del Área de Farmacia Oncológica del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario de Getafe, se administra en orden oxaliplatino (2 horas), irinotecán (1,5 horas), leucovorina (15 minutos) y 5-fluorouracilo (15 minutos + 46 horas) en ciclos de 15 días.

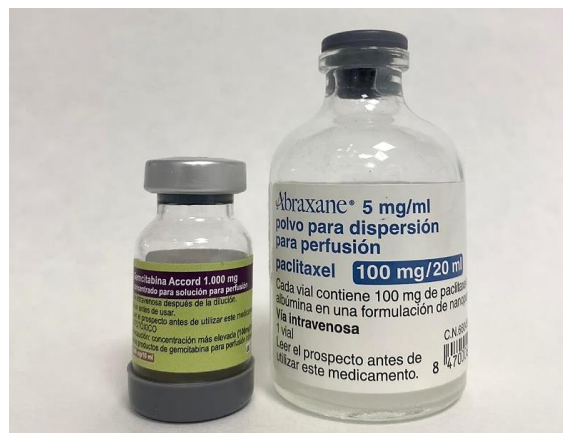


Ilustración 8. Aproximaciones quimioterapéuticas más empleadas para el tratamiento del adenocarcinoma ductal de páncreas. A la izquierda, gemcitabina. A la derecha, Abraxane.

En el futuro, los tratamientos específicos basados en las características moleculares de los órganos de los pacientes serán una realidad y tendrán perspectivas considerables (Springfeld et al., 2019).

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de profundizar en nuestra comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes al ADP para desarrollar nuevas y mejores opciones terapéuticas.

3. METABOLISMO Y CÁNCER

3.1. REPROGRAMACIÓN METABÓLICA EN CÁNCER

El cáncer está caracterizado por una serie de rasgos propios, como pueden ser una señalización proliferativa sostenida, la reprogramación epigenética, la evasión del sistema inmune, la activación de la metástasis y la angiogénesis, etc. Del mismo modo, las variaciones en el metabolismo celular son un rasgo distintivo de la carcinogénesis, dado que, durante la transformación celular, son necesarios cambios metabólicos para satisfacer las demandas energéticas, las cuales han sido alteradas, y generar los componentes celulares requeridos por la alta tasa proliferativa (Hanahan, 2022; Martin-Perez et al., 2022; C. Qin et al., 2020).

Respecto a estas alteraciones metabólicas, el efecto Warburg describe que las células tumorales presentan una tasa elevada de glucólisis y convierten la mayor parte de la glucosa en lactato, incluso en presencia de oxígeno (Liberti & Locasale, 2016). Esto es debido a que la glucosa y la glutamina son las principales fuentes de energía y carbono para las células, y a que KRAS, c-MYC y HIF1A, cuya actividad o expresión se encuentra alterada en la mayoría de cánceres, aumentan su adquisición y uso, contribuyendo a la síntesis de lípidos (Swierczynski et al., 2014; Yin et al., 2022).

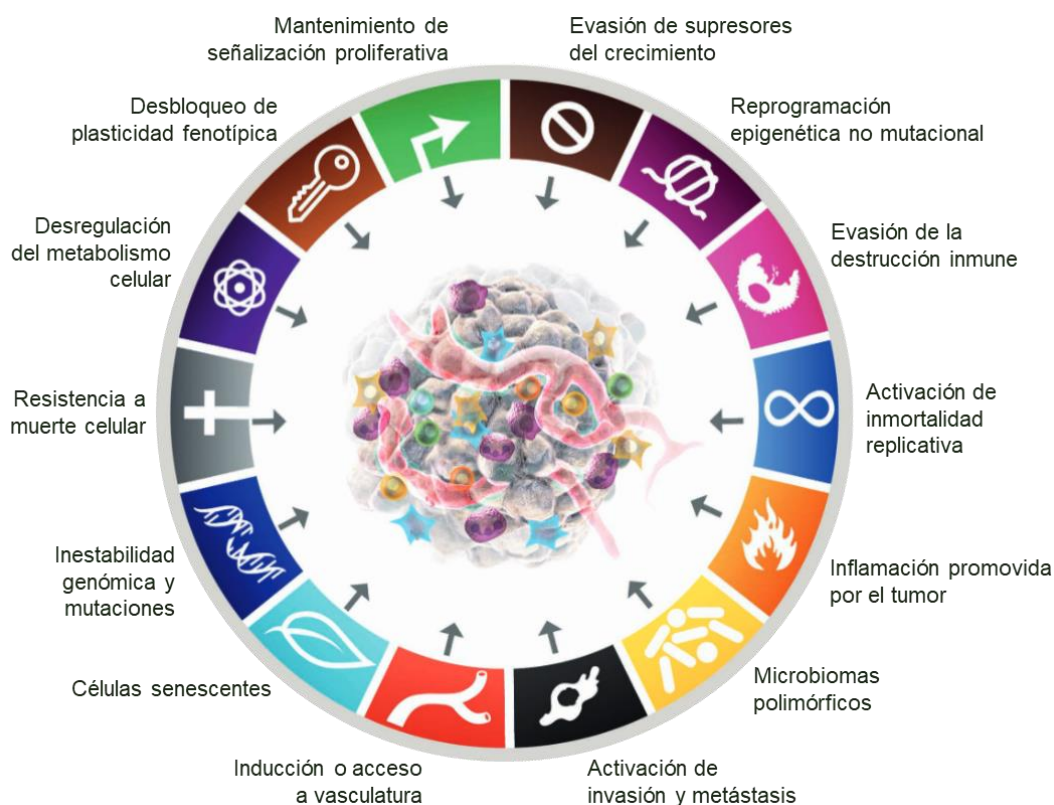


Ilustración 9. Rasgos distintivos de la carcinogénesis. Nuestro objeto de estudio es la reprogramación metabólica asociada al proceso tumoral. Ilustración adaptada de *Hanahan* (Hanahan, 2022).

Centrándonos en el adenocarcinoma ductal de páncreas, como ya se ha señalado, este tipo de tumor se caracteriza por un microambiente severamente hipóxico y privado de nutrientes debido al denso estroma y a la pobre vascularización (Erkan et al., 2009; B. Kong et al., 2015). Las células del ADP se han adaptado metabólicamente para sobrevivir en estas condiciones mediante diversos mecanismos, principalmente impulsados por el factor de transcripción inducible por hipoxia 1 α (HIF1A) (Schönenberger, 2015; Ye et al., 2014) y KRAS oncogénico.

Por otra parte, la macropinocitosis es una importante vía por la que las proteínas extracelulares son transportadas al interior de las células de adenocarcinoma ductal de páncreas (Commisso et al., 2013). De hecho, la captación macropinocítica de proteínas y la degradación lisosomal son necesarias para satisfacer las necesidades de glutamina, así como de otros aminoácidos, de las células del cáncer de páncreas (Kamphorst et al., 2015), reduciendo así la dependencia de la glutamina extracelular libre. Es por ello que el bloqueo de la misma reduce el crecimiento celular del ADP en un modelo de xenoinjerto transformado con KRAS (Commisso et al., 2013).

Atacar todas estas adaptaciones metabólicas específicas es una estrategia emergente para el cáncer de páncreas (Cohen et al., 2015).

3.2. METABOLISMO LIPÍDICO Y ADP

Antes de adentrarnos en el papel del metabolismo lipídico en la tumorigénesis y, más concretamente, en el adenocarcinoma ductal de páncreas, es necesario identificar a un oncogén crucial en la regulación de estas rutas metabólicas.

c-MYC, un factor de transcripción implicado en un tercio de todas las enfermedades humanas, desempeña un papel fundamental en el cáncer, influyendo en procesos como la transcripción de genes, la traducción de proteínas, el ciclo celular y, nuestro objeto de estudio, el metabolismo (Chen et al., 2018). Además, este factor de transcripción se encuentra sobre expresado en un gran número de tumores (Dang, 2012).

En particular, la participación de c-MYC es crucial en el ADP (Skoudy et al., 2011), donde se sobre expresa en el 42% de los casos, principalmente debido a la activación de KRAS, la amplificación en el número de copias, la pérdida de *SMAD4* y/o a amplificaciones del locus 8q24.13 (Hessmann et al., 2016; Raphael et al., 2017). Asimismo, la secreción de FGF1 por los fibroblastos asociados al cáncer (*cancer associated fibroblasts*, CAFs), presentes en el microambiente tumoral, puede mantener niveles elevados de c-MYC en las células tumorales pancreáticas (Bhattacharyya et al., 2020).

De hecho, las PanIN-2, las PanIN-3 y el ADP ya establecido sobre expresan c-MYC independientemente de la carga mutacional, asociándose dicha expresión a un peor pronóstico (Witkiewicz et al., 2015).

Los modelos de ratón han sido extremadamente útiles para descifrar el papel de c-MYC en la homeostasis del páncreas y el desarrollo del ADP. Se ha revelado que c-MYC es necesario para el desarrollo del propio páncreas, y que una bajada de su expresión es necesaria para la diferenciación acinar completa (Nakhai et al., 2008; Sánchez-Arévalo Lobo et al., 2017). De forma contraria, su sobre expresión en el compartimento acinar (ratón *Ela1-Myc*) induce ADM y transformación (Sánchez-Arévalo Lobo et al., 2017). Su co-expresión con KRAS^{G12D} reprime la vía del interferón tipo I y aumenta la expresión

de citoquinas y quimioquinas que generan un microambiente inmunosupresor (Kortlever et al., 2017; Muthalagu et al., 2020; Sodir et al., 2020).

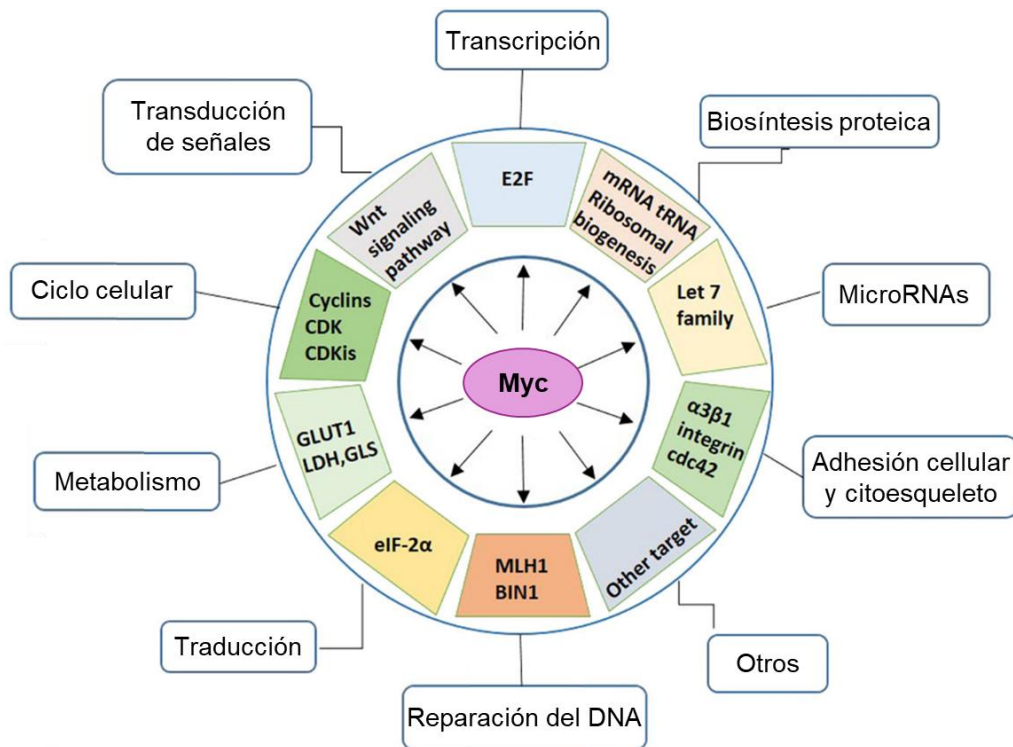


Ilustración 10. c-MYC regula un espectro de funciones celulares. c-MYC regula un gran número de genes que intervienen en distintas funciones celulares, como el ciclo celular, la biogénesis de proteínas, la adhesión celular, el metabolismo, la transducción de señales, la transcripción y la traducción. Ilustración adaptada de *Chen et al.* (Chen et al., 2018).

A pesar de su importancia, dirigir terapias contra c-MYC directamente es un reto, dada su implicación en numerosos procesos celulares, puesto que podría resultar contraproducente la alteración de un número tan elevado de funciones. Por lo tanto, resulta imperativo identificar otros efectores posteriores que sirvan como dianas terapéuticas más concretas y dirigir terapias contra ellas.

La glucólisis y la glutaminólisis están enriquecidas en las células tumorales, ambos procesos también regulados por c-MYC, el cual controla virtualmente genes de la glucólisis y muchos de la glutaminólisis (Stine et al., 2015; Wahlström & Arsenian Henriksson, 2015).

Sin embargo, aunque el estudio del metabolismo se ha centrado principalmente en la glucólisis y en la glutaminólisis, hay estudios recientes que demuestran la importancia del metabolismo lipídico en la transformación y progresión tumoral, así como también

en procesos de resistencia a fármacos y metástasis (C. Qin et al., 2020; Swierczynski et al., 2014). Es por ello que el metabolismo lipídico está atrayendo recientemente la atención de la comunidad científica, puesto que se ha demostrado que está regulado por c-MYC (Gouw et al., 2019) y ha probado ser un buen elemento contra el que dirigir estrategias terapéuticas (Yi et al., 2018; C. Zhang et al., 2022).

Los lípidos desempeñan un papel vital en la función celular, contribuyendo al equilibrio energético y manteniendo la integridad celular mediante la formación de membranas. Estas biomoléculas pueden adquirirse a través de la dieta o mediante su biosíntesis. En las células transformadas, se activa la lipogénesis *de novo*, de modo que el 93% de los ácidos grasos sintetizados provienen de esta biosíntesis (Menendez & Lupu, 2007). Esto supone una ventaja metabólica para las células tumorales, pues las libera de la necesidad de dependencia de lípidos externos, por ejemplo de la dieta, para satisfacer sus necesidades energéticas y estructurales (Guo et al., 2013; Menendez & Lupu, 2007; Röhrig & Schulze, 2016; Snaebjornsson & Schulze, 2019; Tennant et al., 2010). De hecho, en el cáncer de páncreas se ha demostrado que este proceso se encuentra activado (Menendez & Lupu, 2007; Walter et al., 2009). El aumento de la lipogénesis *de novo* en las células tumorales se refleja a su vez en un incremento significativo de las enzimas lipogénicas (Ameer et al., 2014).

La biosíntesis de lípidos tiene lugar en el citoplasma. En el ADP, MYC colabora con KRAS y HIF1A en la reprogramación metabólica de las células tumorales, dirigiendo los carbonos de las glutaminas al ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) mitocondrial, y resultando en citrato al final del proceso (Boroughs & DeBerardinis, 2015; Sun et al., 2015; Ying et al., 2012). Este citrato sale posteriormente de la mitocondria a través de transportadores, por lo que su localización subcelular es clave para determinar su destino metabólico.

La biosíntesis de lípidos comienza cuando la ATP citrato liasa (ACLY) escinde el citrato citosólico en acetil-CoA y oxalacetato. Tanto los ácidos grasos como el colesterol se sintetizan a partir de este acetil-CoA (Currie et al., 2013). Para la síntesis de los primeros, la acetil-CoA carboxilasa (ACCA) convierte de forma irreversible el acetil-CoA en manoil-CoA, un paso potenciado en el ADP (R. Lin et al., 2013; Petrova et al., 2016). Posteriormente, el complejo multiproteico ácido graso sintasa (FASN) utiliza como sustratos fuente de carbonos el acetil-CoA y el manoil-CoA para, junto con NADPH, generar ácido palmítico, un ácido graso saturado de cadena larga (C16:0) (Currie et al.,

2013; Menendez & Lupu, 2007). El palmitato es elongado y modificado posteriormente para sintetizar el resto de ácidos grasos (Broadfield et al., 2021).

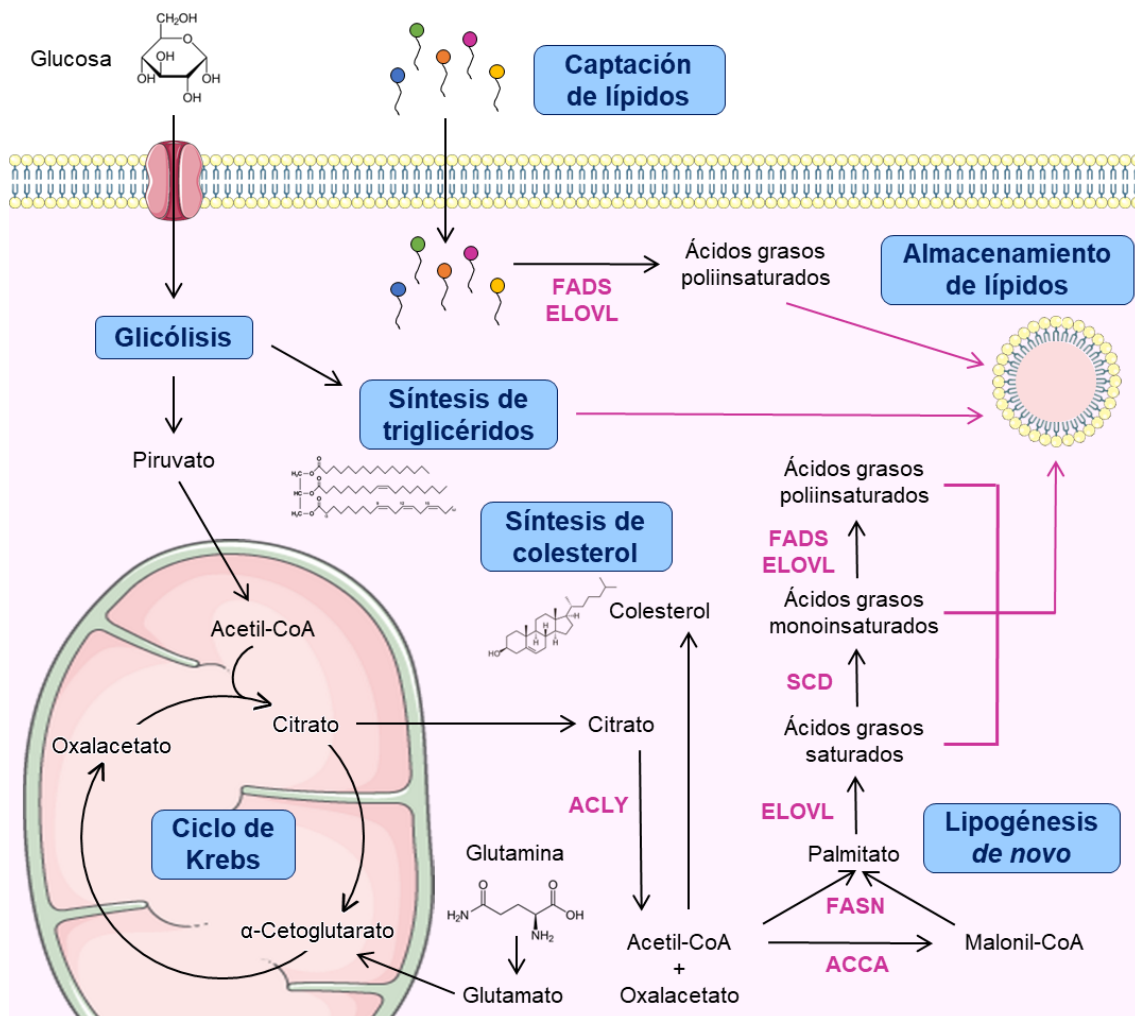


Ilustración 11. Rutas metabólicas implicadas metabolismo lipídico. El metabolismo lipídico celular se apoya en todas las macromoléculas principales. Ilustración adaptada de *Broadfield et al.* (Broadfield et al., 2021).

En varios tipos de cáncer, entre ellos el ADP, estas enzimas están sobre expresadas y contribuyen a la progresión tumoral (C. Qin et al., 2020). *Gouw et al.* demostraron que MYC y el factor de transcripción SREBP1 inducen la expresión de las enzimas implicadas en todo este proceso de biosíntesis y elongación de ácidos grasos, promoviendo la tumorigénesis (Gouw et al., 2019; Sun et al., 2015). Asimismo, KRAS activa la vía de señalización AKT (proteínas quinasas B) y regula a ACLY en los procesos tumorales (Carrer et al., 2019). Cabe destacar que la sobre expresión de FASN se asocia con un mal pronóstico y con quimiorresistencia en el cáncer de páncreas (Tadros et al., 2017),

y que la inhibición de FASN, ACLY y ACCA disminuye la proliferación y el crecimiento tumoral (Currie et al., 2013).

4. PAPEL DE LOS LÍPIDOS EN LAS MEMBRANAS CELULARES

4.1. COMPOSICIÓN DE LAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS

Los ácidos grasos (*fatty acids*, FAs) son los componentes de la mayoría de los lípidos. Estas biomoléculas son imprescindibles para almacenar energía y sintetizar los componentes estructurales de las membranas celulares, además de actuar como moléculas de señalización (Harayama & Riezman, 2018).

En concreto, los lípidos que componen las membranas celulares son los glicerofosfolípidos o fosfoglicéridos, los esfingolípidos y los esteroides, presentándose una distribución asimétrica dependiendo del tipo de célula y la cara de la membrana plasmática. La fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina representan el 50% y el 20% de los fosfolípidos, respectivamente (Van Meer et al., 2008; Vance & Tasseva, 2013), convirtiéndolos en los dos fosfolípidos más abundantes de la membrana plasmática.

La alteración del metabolismo lipídico asociada a la tumorigénesis tiene como consecuencia el cambio en la composición y propiedades de las membranas (Du et al., 2023). En este sentido, la composición lipídica de las células tumorales difiere de la de las células normales. Toda esta reorganización de membranas se lleva a cabo con el fin de, por una parte, favorecer la proliferación, y por otra, evitar la apoptosis y la entrada de quimioterápicos (Bernardes & M. Fialho, 2018). Sin embargo, desafortunadamente este proceso es diferente para cada tipo de cáncer y estadio, por lo que no existe un perfil lipídico específico característico para las células tumorales que las identifique y diferencie de las células no malignas (Perrotti et al., 2016).

4.2. FLUIDEZ, PERMEABILIDAD Y GROSOR DE LAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS

Además de la composición de la membrana plasmática, la longitud de la cola de los fosfolípidos también afecta a la permeabilidad celular. Esto se debe no sólo a la influencia de dicha longitud sobre el grosor de la membrana, sino también a la cantidad de interacciones que los ácidos grasos pueden establecer entre sí y que afectan, en última instancia, al tráfico de moléculas a través de la membrana. Concretamente, el alargamiento de las colas lipídicas en dos carbonos disminuye en 1,5 el coeficiente de permeabilidad para longitudes de cola de entre 14 a 26 carbonos (Frallicciardi et al., 2022).

Las células tumorales cuentan con un mayor grado de ácidos grasos saturados (*saturated fatty acids*, SFAs) y colesterol, lo que les confiere mayor rigidez en la membrana, haciéndolas menos susceptibles al estrés oxidativo inducido por agentes quimioterapéuticos (Rysman et al., 2010). En cambio, las células altamente metastáticas presentan membranas más fluidas, con un menor contenido en SFAs y colesterol, favoreciendo de este modo la migración celular (Zeisig et al., 2007; W. Zhao et al., 2016).

Del mismo modo, como la fluidez de la membrana está relacionada con la permeabilidad, las células tumorales tienen afectada la sensibilidad a la captación de quimioterapia (Hendrich & Michalak, 2003).

Además, la composición lipídica, el grosor y la fluidez desempeñan un papel muy importante en la disposición de proteínas involucradas en la señalización, así como también en la formación de diferentes microdominios como balsas lipídicas (Harayama & Riezman, 2018). Estos dominios están implicados en la transducción de señales, el control del ciclo celular, procesos de supervivencia y apoptosis (Mollinedo & Gajate, 2015, 2020; Zalba & Ten Hagen, 2017). Por ello, modular la composición de la membrana, aparte de afectar a su fluidez y permeabilidad, también puede influir en procesos de señalización, al desestabilizar las balsas lipídicas (Hryniewicz-Jankowska et al., 2014; B. Li et al., 2022).

Por todos estos motivos, bloquear la síntesis de lípidos ofrece opciones terapéuticas prometedoras para prevenir la progresión tumoral y tratar la metástasis (Currie et al., 2013; Martin-Perez et al., 2022), así como para modular la fluidez de la membrana (Zalba & Ten Hagen, 2017).

5. ELONGASAS DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA MUY LARGA

5.1. LA FAMILIA DE LAS ELONGASAS DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA MUY LARGA

Los ácidos grasos (*fatty acids*, FAs) tomados en la dieta o el ácido palmítico producido por FASN durante la lipogénesis *de novo* pueden ser modificados (β -oxidados), alargados (elongados) o desaturados. De esta manera, los FAs se pueden clasificar en base al número de carbonos que conforman la cadena (Sassa & Kihara, 2014), pudiendo distinguir:

- Ácidos grasos de cadena larga (*long-chain fatty acids*, LCFAs), con 11-20 carbonos, siendo los ácidos grasos de 16C (palmítico) y 18C (esteárico) los más frecuentes en las células eucariotas.
- Ácidos grasos de cadena muy larga (*very-long-chain fatty acids*, VLCFAs), con más de 20 carbonos. Son menos abundantes que los LCFAs.

Asimismo, los ácidos grasos también pueden clasificarse en base al número de insaturaciones, es decir, dobles enlaces, distinguiendo (Sassa & Kihara, 2014):

- Ácidos grasos saturados (*saturated fatty acids*, SFAs), sin insaturaciones.
- Ácidos grasos monoinsaturados (*monounsaturated fatty acids*, MUFAs), con una única insaturación.
- Ácidos grasos poliinsaturados (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs), con dos o más insaturaciones. Los PUFAs se subclasifican a su vez en las familias ω 3 y ω 6, en función de la posición del doble enlace terminal, es decir, el más alejado del grupo carboxilo.

En el ADP, los SFAs, MUFAs y ω 6-PUFAs promueven el crecimiento de las células tumorales cuando se administran en altas dosis en la dieta, mientras que los ω 3-PUFAs lo inhiben (Yu et al., 2015).

Los VLCFAs son componentes esenciales de varios procesos celulares, como el metabolismo de los lípidos, la estructura de las membranas y la señalización celular (Kyselová et al., 2022; Lai et al., 2023).

La elongación de los ácidos grasos para sintetizar VLCFAs se basa un proceso cíclico consistente en la adición de dos carbonos a la cadena de acil-CoA por ciclo. En concreto, los ácidos grasos que tienen 16 o más carbonos se elongan en cuatro reacciones secuenciales distintas mediante enzimas unidas a la membrana del retículo endoplasmático: condensación, reducción, deshidratación y una nueva reducción (Sassa & Kihara, 2014).

El primer paso de la reacción de elongación de los ácidos grasos consiste en la condensación del acil-CoA con malonil-CoA dando lugar a 3-cetoacil-CoA. Esta reacción es llevada a cabo por las elongasas de ácidos grasos de cadena muy larga (*elongases of very-long-chain fatty acids*, ELOVLs) (Guillou et al., 2010; Jakobsson et al., 2006; Ohno et al., 2010). A continuación, ocurre la reducción del 3-cetoacil-CoA a 3-hidroxiacil-CoA, catalizada por la enzima 3-cetoacil-CoA reductasa (*3-ketoacyl-CoA reductase*, KAR) y utilizando NADPH (Moon & Horton, 2003). Posteriormente el 3-hidroxiacil-CoA es deshidratado por las enzimas 3-hidroxiacil-CoA deshidratasas (*3-hydroxyacyl-CoA dehydratases*, HACD1-4) y forma *trans*-2-enoyl-CoA (Ikeda et al., 2008). El último paso es otra reducción catalizada por la enzima *trans*-2,3-enoyl-CoA reductasa (*trans*-2,3-enoyl-CoA reductase, TER), utilizando de nuevo NADPH (Moon & Horton, 2003). Finalmente, la cadena de acil-CoA resultante se ha alargado en dos carbonos.

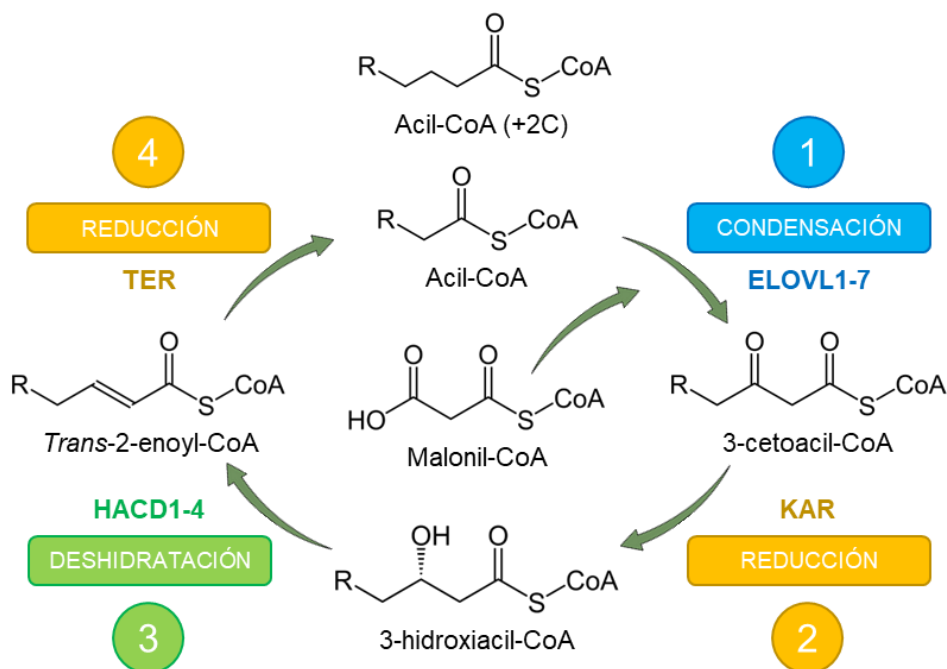


Ilustración 12. Ciclo de elongación de ácidos grasos en mamíferos. En cada ciclo, el acil-CoA incorpora dos unidades de carbono procedentes del malonil-CoA. Ilustración adaptada de Sassa & Kihara (Sassa & Kihara, 2014).

Tanto en *Homo sapiens* como en *Mus musculus*, existen siete tipos de elongasas (ELOVL1-7 y Elovl1-7, respectivamente), encargadas de la elongación de los ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFAs). Mediante su participación en la síntesis y modificación de lípidos, las elongasas influyen en procesos celulares vitales, como la composición y fluidez de las membranas, la formación de gotas lipídicas y ciertas vías de señalización.

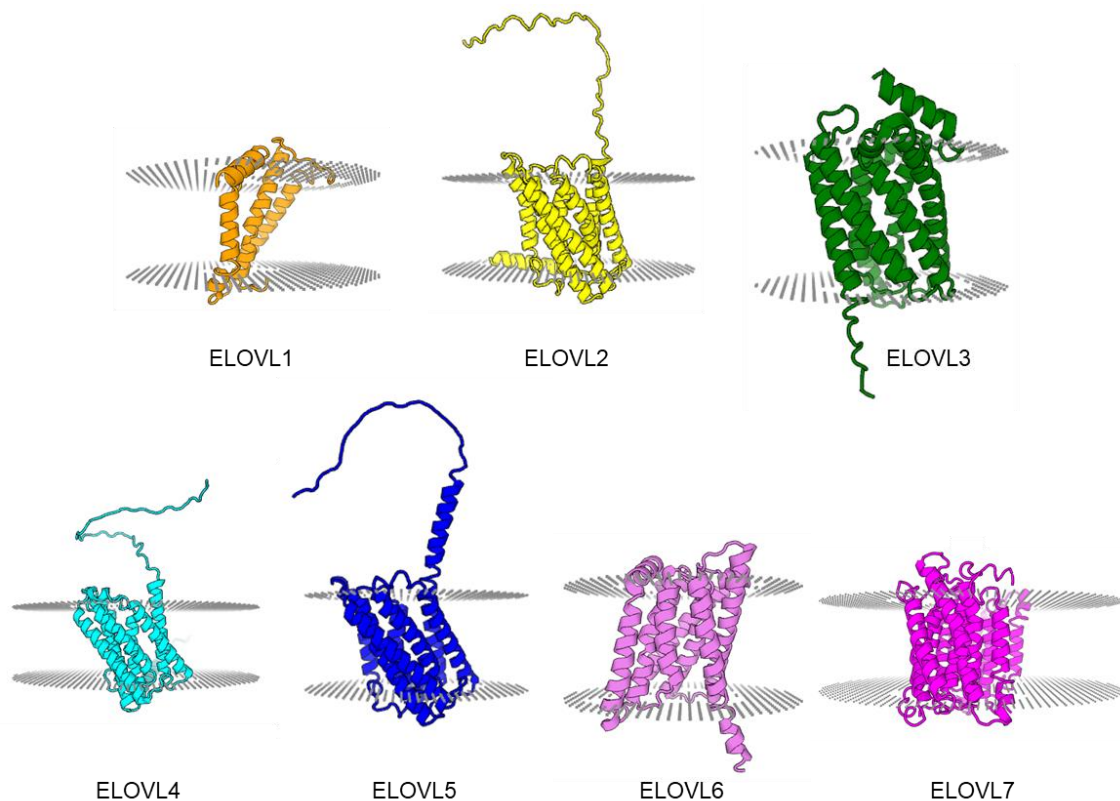


Ilustración 13. Estructura de los miembros de la familia ELOVL humana. Las elongasas están ancladas a la membrana del retículo endoplásmico a través de dominios transmembrana, y poseen dominios catalíticos para su actividad enzimática. Ilustración creada a partir del modelado de proteínas empleando la base de datos SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018).

Los siete miembros de la familia ELOVL comparten rasgos estructurales y características funcionales. Estructuralmente, las elongasas de ácidos grasos de cadena muy larga constan de dominios transmembrana que las anclan de manera integral a la membrana del retículo endoplásmico, así como de dominios catalíticos que facilitan las reacciones enzimáticas. Estos últimos dominios suelen contener motivos conservados y residuos esenciales para la unión de sustratos y la actividad enzimática (Nie et al., 2021).

Estas enzimas se diferencian según su nivel de expresión en los diferentes tejidos (regulada por diversos factores, como la transcripción diferencial, la señalización hormonal y las señales de desarrollo (Carmona-Antoñanzas et al., 2014; Morigny et al., 2018; Y. Wang et al., 2005) y su localización subcelular.

Sin embargo, lo más característico es que presentan especificidad de sustrato, puesto que actúan prevalentemente unas u otras en función de la longitud o el grado de saturación del ácido graso a elongar (Guillou et al., 2010; Ohno et al., 2010):

ELOVL6 elonga SFAs y MUFAs de 12 a 16 carbonos, catalizando específicamente el primer paso de elongación. Es especialmente importante, pues los ácidos grasos que sintetiza sirven de sustrato para el resto de las elongasas. En concreto, podemos destacar la elongación de ácido palmítico (C16:0) a ácido esteárico (C18:0). *Elov6* se expresa de manera ubicua en ratón (Ohno et al., 2010), aunque principalmente en el hígado, el tejido adiposo (tanto blanco como pardo), el cerebro, el colon y los pulmones (Guillou et al., 2010; Kihara, 2012; Ohno et al., 2010). En humanos, de forma similar, **ELOVL6** se expresa especialmente en los tejidos adiposos e hígado (Iizuka et al., 2020). Se ha demostrado que los ratones con delección de *Elov6* están protegidos contra la resistencia a la insulina inducida por obesidad, y por lo tanto *Elov6* parece ser un punto de control metabólico crucial, y limitar la expresión o actividad de *Elov6* podría representar un nuevo enfoque terapéutico para tratar la diabetes mellitus tipo 2 (Matsuzaka, 2021).

ELOVL1, ELOVL3 y ELOVL7 comparten la misma función al elongar SFAs y MUFAs de entre 16 a 26 carbonos. ELOVL1 elonga preferiblemente estos ácidos grasos desde 20 a 26 carbonos (Sassa et al., 2013), ELOVL3 de 16 a 24 carbonos y ELOVL7 de 16 a 22 carbonos. En ratón, *Elov1* se considera un gen de control endógeno, ya que se expresa en todos los tejidos murinos analizados (Ohno et al., 2010), y **ELOVL1** está sobre expresado en piel humana, donde desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la función de barrera de la piel y de los niveles de esfingolípidos (Isokawa et al., 2019). *Elov3*, por su parte, se expresa en bajas cantidades en ratón, sobre todo en testículos y bazo (Ohno et al., 2010), y en humanos se ha identificado como un gen sobre expresado en el tejido adiposo pardo (Jørgensen et al., 2007). *Elov7* y **ELOVL7** parecen expresarse en todos los tejidos murinos menos en el muscular, ya sea cardíaco o esquelético, y con expresión especialmente elevada en páncreas, riñón, próstata y colon (Naganuma et al., 2011; Ohno et al., 2010).

ELOVL2 elonga PUFAs de 20 a 22 carbonos. Se encuentra expresada principalmente en testículos, hígado, cerebro y tejido adiposo (Guillou et al., 2010; Kihara, 2012; Ohno et al., 2010; Sliker et al., 2018).

ELOVL4 elonga SFAs y PUFAs de más de 24 carbonos, llegando a elongar ácidos grasos de hasta 38 carbonos. Se ha detectado en la piel y en la retina (Guillou et al., 2010; Kihara, 2012; Yeboah et al., 2021), siendo en este segundo órgano indispensable para la síntesis de PUFAs de cadena muy larga en humanos, necesarios para una visión adecuada (Barabas et al., 2013).

ELOVL5 elonga PUFAs de entre 18 y 22 carbonos. Se expresa en las glándulas adrenales, los testículos y la próstata (Guillou et al., 2010; Kihara, 2012; Leonard et al., 2000).

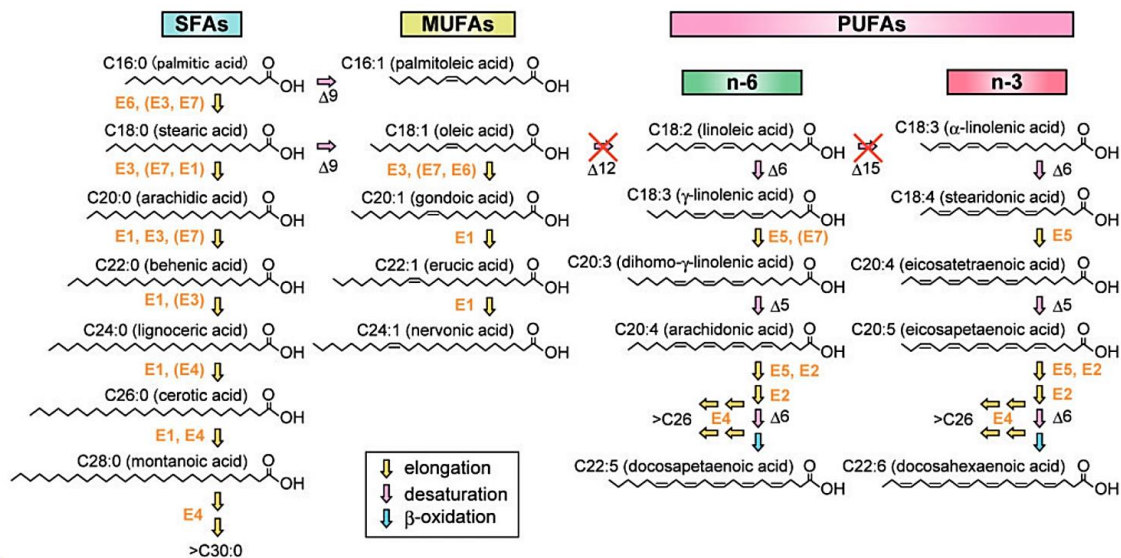


Ilustración 14. Rutas de elongación de los ácidos grasos en humanos. Ex y Δx representan, respectivamente, ELOVLx y Δx desaturasa, donde x denota el número de la enzima. Los paréntesis indican que esa ELOVL tiene una actividad débil en las reacciones indicadas. Ilustración extraída de Kihara (Kihara, 2012).

La relación de las ELOVLs con la actividad de las desaturasas es fundamental para la biosíntesis de MUFAs y PUFAs (Guillou et al., 2010; Sassa & Kihara, 2014). Además, su actividad limita todo el proceso de elongación de los VLCFAs, ya que controlan la primera reacción del ciclo (Guillou et al., 2010; Jakobsson et al., 2006; Kihara, 2012; Sassa & Kihara, 2014).

5.2. PAPEL DE LAS ELOVLs EN CÁNCER

A pesar de que se conoce poco acerca del papel que esta familia de elongasas desempeña en los diferentes tipos de cánceres, hay pequeños esbozos sobre la función de algunas de ellas en tipos concretos de tumores.

Respecto a *ELOVL1*, aunque no está sobre expresada en cáncer de mama, se ha demostrado que su silenciamiento reduce la viabilidad de las células tumorales (Hilvo et al., 2011). En cambio, en cáncer de colon, se ha demostrado que su sobre expresión promueve la acumulación de VLCFA (Hama et al., 2021). Por último, en el carcinoma hepatocelular, se ha asociado con un mal pronóstico y podría ser un indicador de eficacia de la inmunoterapia (Y. Zhang et al., 2022).

De manera contraria a lo observado con *ELOVL1*, el silenciamiento de *ELOVL2* promueve la proliferación y migración celular en cáncer de mama, asociándose su menor expresión con un peor pronóstico (Kang et al., 2019). En cáncer renal, *ELOVL2* está sobre expresada y se ha asociado con peor pronóstico, debido al aumento de la proliferación y la inhibición de la apoptosis (Lucarelli et al., 2020; Tanaka et al., 2021).

En los que respecta a *ELOVL4*, su sobre expresión se ha relacionado con una menor supervivencia global en cáncer de estómago (Xu et al., 2022). Del mismo modo, en el cáncer de vejiga es un gen de riesgo que predice la supervivencia global (J. Lin et al., 2020).

En cáncer de mama, la baja expresión de *ELOVL5* se asocia con un peor pronóstico (Kieu et al., 2022). Sin embargo, en cáncer de próstata, *ELOVL5* está sobre expresada y su inhibición resulta en la supresión de la proliferación celular y del crecimiento tumoral (Centenera et al., 2021).

ELOVL6 es la elongasa que más se ha estudiado en cáncer. Su silenciamiento en células de carcinoma hepatocelular reduce la proliferación celular, el crecimiento tumoral y prolonga la supervivencia en ratones (Y.-C. Su et al., 2018). Además, *ELOVL6* está sobre expresada en cáncer de mama, y se ha relacionado con metástasis y una baja supervivencia libre de enfermedad (Feng et al., 2016). Del mismo modo, en el carcinoma de células escamosas de pulmón, su inhibición mediante siARNs e inhibidores químicos tiene un efecto antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo* (Marien et al., 2016). En cambio,

en mieloma múltiple, niveles bajos de *ELOVL6* se han correlacionado con la resistencia a bortezomib, tanto en pacientes como en líneas celulares (Lipchick et al., 2021).

Por otra parte, análisis lipidómicos detallados han revelado a *ELOVL6* como un importante contribuyente al proceso de elongación de ácidos grasos en el SCC de pulmón, y su inhibición ha demostrado perjudicar notablemente el crecimiento tumoral y la proliferación celular en el SCC de pulmón y en el cáncer hepático (Nagarajan et al., 2021). Además, se ha demostrado que la inhibición de *ELOVL6* por varios microRNAs reduce la proliferación celular en el glioblastoma, lo que subraya su potencial como diana terapéutica (Istiqamah et al., 2023).

Por último, *ELOVL7* se sobre expresa en el cáncer de próstata y promueve el crecimiento de las células tumorales a través del metabolismo de los SFAs de cadena larga (Tamura et al., 2009). Del mismo modo, también en cáncer de próstata, su silenciamiento disminuye el crecimiento de las células tumorales *in vitro* y reduce el tamaño de tumores en ratones (Han et al., 2018), sugiriéndose por lo tanto una posible relación de *ELOVL7* con la metástasis (Tolkach et al., 2015). En cánceres ginecológicos, una alta expresión de *ELOVL7* también se relaciona con una menor supervivencia global (X. Zhang & Wang, 2019).

En cuanto al adenocarcinoma ductal de páncreas, se desconoce el papel que las diferentes *ELOVLs* podrían tener en el metabolismo lipídico y progresión de este tipo de tumor.

5.3. OTROS ROLES DE LAS *ELOVLs*

Además, de su importante papel en la síntesis y modificación de lípidos, la familia de las *ELOVLs* participa en otras funciones, como son las dos mencionadas a continuación.

Por una parte, las elongasas también están implicadas en el mantenimiento de la estructura y funcionalidad de las membranas celulares, puesto que, al incorporar los VLCFAs a los lípidos de membrana, estas enzimas influyen en sus propiedades y contribuyen a la homeostasis celular. Por ejemplo, las elongasas contribuyen a la incorporación de los VLCFAs a los fosfolípidos de membrana, determinando así su fluidez y permeabilidad, puesto que estos ácidos grasos de cadena muy larga aumentan

la rigidez y estabilidad de la membrana gracias al mayor número de interacciones que pueden establecer (L. Kong et al., 2020; Molino & Galli, 2014).

Del mismo modo, ELOVLs contribuyen a la generación y el mantenimiento de las balsas lipídicas mediante la incorporación de VLCFAs, los cuales son cruciales en su composición. Estas balsas lipídicas forman microdominios especializados dentro de las membranas celulares, por lo que desempeñan un papel fundamental en la organización de las proteínas de membrana y facilitan diversos procesos de señalización (Fantini, 2023).

Por otra parte, y como se deduce de la función anterior, las ELOVLs se encargan de la regulación de vías de señalización celular, no sólo por su implicación en la generación de las balsas lipídicas, sino, más importante, mediante la producción de especies lipídicas específicas que modulan diversos procesos fisiológicos. En este sentido, los VLCFAs y sus derivados están implicados en la regulación de las vías de división y supervivencia celular, puesto que estos lípidos pueden modular a factores reguladores del ciclo celular, influyendo de este modo en la proliferación y diferenciación celulares (Robichaud et al., 2018).

Asimismo, los lípidos derivados de estos ácidos grasos de cadena muy larga, como los esfingolípidos o las ceramidas, participan en diversas vías de transducción de señales, regulando así las respuestas celulares a estímulos extracelulares. Esto es debido a la actuación de los mencionados lípidos como moléculas señalizadoras o moduladoras de la función proteica (Ishihara et al., 2017).

6. NUESTRO ESTUDIO

Este estudio arroja luz sobre el mecanismo por el cual c-MYC regula el metabolismo lipídico en el adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) a través de la expresión y función de las elongasas de ácidos grasos de cadena muy larga (ELOVLs).

En este sentido, hemos identificado ELOVL6 y ELOVL1 como dianas prometedoras para la intervención terapéutica en el adenocarcinoma ductal de páncreas. La interferencia a nivel genético o proteico de estas elongasas en células de ADP impide el crecimiento

tumoral *in vitro* e *in vivo*, además de alterar la composición y el grosor de la membrana, lo que aumenta la permeabilidad a los agentes terapéuticos.

Estos hallazgos subrayan el potencial terapéutico de la inhibición de ELOVL6 y ELOVL1, por sí mismas o en combinación con el quimioterápico Abraxane, en el tratamiento del ADP.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

*"La ciencia no sólo es compatible con la espiritualidad;
es una fuente profunda de espiritualidad"*

Carl Sagan (1934-1996)



HIPÓTESIS

La hipótesis principal de esta tesis doctoral es que el metabolismo lipídico, y concretamente las elongasas de ácidos grasos de cadena muy larga, representan una potencial diana terapéutica en la progresión tumoral inducida por c-MYC en el adenocarcinoma ductal de páncreas.

OBJETIVOS

El objetivo principal del proyecto es estudiar el papel de las elongasas de ácidos grasos de cadena muy larga en la progresión tumoral inducida por c-MYC y su potencial como dianas terapéuticas en el adenocarcinoma ductal de páncreas.

Para su consecución, se abordarán los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la relación entre c-MYC y las diferentes elongasas de ácidos grasos de cadena muy larga (ELOVLs).
2. Definir las elongasas que representan una buena diana terapéutica en el adenocarcinoma ductal de páncreas.
3. Analizar la utilidad terapéutica de la interferencia genética o química de ELOVL6 *in vitro* e *in vivo*.
4. Establecer la sinergia de la interferencia de ELOVL6 con los tratamientos empleados para el adenocarcinoma ductal de páncreas.
5. Describir las características genéticas de los tumores respondedores a dicha sinergia.
6. Validar el potencial terapéutico de la interferencia de ELOVL6 en otra elongasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

"La ciencia no tiene patria, porque el conocimiento pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina el mundo"

Louis Pasteur (1822-1895)



1. Datasets de referencia

Dataset Sanchez-Arevalo et al. Se utilizaron páncreas de ratones *Ela1-Myc* y ratones control para evaluar el perfil transcriptómico mediado por Myc mediante RNA-seq, y sus sitios de unión mediante CHIP-seq. Se descargaron los archivos FASTQ a través de los números de acceso de las series GEO GSE77411 y GSE77410.

Dataset Walz et al. Se sometieron tumores pancreáticos aislados de páncreas de ratones KPC (*Pdx1-Cre; Kras^{+LSL-G12D}; Trp53^{+LSL-R172H}*) a CHIP-seq contra c-Myc. Se descargaron los archivos FASTQ a través del número de acceso de la serie GEO GSE44672.

Dataset Sabò et al. Se infectaron células 3T9 de fibroblastos de ratón con *MYC-ER*, se trataron las células con 4-OHT y se recogieron muestras a 2, 4, 8 y 16 horas para RNA-seq. Las células B obtenidas del modelo de ratón *Eμ-Myc* se aislaron en diferentes estadios (Control, Pre-tumoral y Tumoral) para RNA-seq y CHIP-seq. Se descargaron los archivos FASTQ a través del número de acceso de la serie GEO GSE51011.

Dataset Schlesinger et al. Para explorar la heterogeneidad celular tras la expresión de *Kras* constitutivamente activo en células acinares, que causa metaplasia acinar y displasia pancreática, llevamos a cabo análisis de experimentos scRNA-seq de tejidos pancreáticos. Se inyectó tamoxifeno en ratones PRT (*Ptf1a-Cre-ER; Kras^{+LSL-G12D}; Rosa26^{LSL-tdTomato}*) de entre seis y ocho semanas de edad, y se recogió el páncreas para aislar células individuales en seis momentos diferentes tras la inyección de tamoxifeno. Se descargaron los archivos FASTQ a través del número de acceso de la serie GEO GSE141017.

Dataset Peng et al. Se analizaron perfiles de scRNA-seq de 24 muestras tumorales de ADP y 11 páncreas control sin ningún tratamiento. Para estos últimos, se recogieron muestras frescas de páncreas control de 3 casos de pacientes con tumores no pancreáticos (por ejemplo, tumores del conducto biliar o tumores duodenales) y 8 casos de pacientes con tumores pancreáticos no malignos (por ejemplo, quistes pancreáticos) sometidos a pancreatoduodenectomía o pancreatectomía distal. Se descargó el *dataset* a través del número de acceso de GSA CRA001160.

2. RNA-seq

Trimming: la calidad de los datos y el *trimming* (“recorte”) se controló con FastQC (v.0.11.9). Tras recortar el adaptador y eliminar las lecturas de baja calidad con Trim Galore (v.0.6.10), se procedió al mapeo.

Mapeo: la alineación de los archivos fastq recortados se realizó con STAR aligner (v.2.7.10b) (Dobin et al., 2013) utilizando GRCh38 como genoma de referencia. Los datos de expresión a nivel de gen en términos de recuentos esperados se obtuvieron utilizando FeatureCounts del paquete Subread R (v.2.01) (Liao et al., 2019).

Expresión diferencial: se realizaron análisis diferenciales de los perfiles de expresión entre diferentes condiciones utilizando el paquete DESeq2 (v.1.38.0) basado en la distribución binomial negativa (Love et al., 2014). Los p-valores se ajustaron por FDR con el método de Benjamini-Hochberg.

3. Análisis de RNA-seq mediante GSEA

Llevamos a cabo un análisis funcional para determinar los procesos celulares alterados en las células T3M4 tratadas con ELOVL6-IN-2 frente a las no tratadas, utilizando GSEA (análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes, *gene set enrichment analysis*) (Subramanian et al., 2005). Los archivos de firmas moleculares analizados fueron HALLMARK_G2M_CHECKPOINT.gmt, HALLMARK_MYC_TARGETS_V2.gmt, GOBP_FATTY_ACID_METABOLIC_PROCESS.gmt, GOBP_MEMBRANE_LIPID_METABOLIC_PROCESS.gmt, HALLMARK_MYC_TARGETS_V1.gmt, GOBP_CELL_CYCLE_PROCESS.gmt, GOBP_FATTY_ACYL_COA_METABOLIC_PROCESS.gmt, GOBP_LONG_CHAIN_FATTY_ACYL_COA_METABOLIC_PROCESS.gmt, GOBP_FATTY_ACID_DERIVATIVE_METABOLIC_PROCESS.gmt, GOBP_ERBB2_EGFR_SIGNALING_PATHWAY.gmt y KOBAYASHI_EGFR_SIGNALING_6HR_DN. Los *genesets* significativos enriquecidos por el tratamiento de las células control se identificaron utilizando una tasa de descubrimiento falso FDR-q-valor < 0,25 (corrección de Benjamini-Hochberg) y un p-valor nominal < 0,05. Todos los análisis se realizaron utilizando el software GSEA v2.1 (www.broadinstitute.org/gsea) con 1000 permutaciones de los datos.

4. ChIP-seq

Trimming: la calidad de los datos y el *trimming* se controló con FastQC (v.0.11.9). Tras recortar el adaptador y eliminar las lecturas de baja calidad con Trim Galore (v.0.6.10), se procedió al mapeo.

Mapeo: los datos limpios obtenidos se alinearon con el genoma humano GRCh38 mediante la herramienta Burrows-Wheeler Aligner BWA (v.0.7.17) (H. Li & Durbin, 2009).

Controles de calidad de ChIP: los recuentos de lecturas se analizaron mediante Deeptools (v.3.13.3) (Ramírez et al., 2016). Como controles de calidad de los experimentos se utilizaron las funciones plotFingerprint y plotCoverage. Para generar los plotHeatmap y plotProfile se usó la función computeMatrix. Se generaron archivos Bigwig para la visualización de picos utilizando la función bamCompare.

Visualización de pistas (track visualization): para el *track visualization* se utilizó Integrative Genomics Viewer (IGV) (v.2.4.9).

Llamada de picos: se realizó un análisis de llamada de picos utilizando MACS2 (v.2.2.71) (Y. Zhang et al., 2008) con los siguientes parámetros: `macs2callpeak -t Bam_file_sort_nondup.bam -c Bamfile_file_control_sort_nondup.bam -f BAM -g 1.87e9 -n File_name -B -q 0.05`.

Análisis de motivos: los sitios de inicio de la transcripción (*transcriptional start sites*, TSSs) se anotaron a las “características genómicas” (*genomic features*) utilizando el `annotatePeaks.pl` del software HOMER (v.4.11) (Heinz et al., 2010). Los motivos de unión de los factores de transcripción se identificaron con la herramienta `findMotifsGenome.pl` de HOMER en la región accesible desde la cromatina. Aquellos con p-valor < 0,05 se consideraron significativos.

5. Análisis de enriquecimiento funcional

El análisis de sobrerrepresentación (*Over Representation Analysis*, ORA) se realizó utilizando el paquete GSEAPy de Python (Fang et al., 2022), que implementa GSEA y el análisis de sobrerrepresentación (ORA). Se validaron los resultados para el enriquecimiento de términos de ontología génica (*gene ontology*, GO) y la Enciclopedia

de Genes y Genomas de Kioto (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KEGG). Se consideraron estadísticamente significativos los términos o firmas moleculares enriquecidos (*enriched terms*) con un p-valor ajustado por FDR < 0,05.

6. scRNA-seq

Preprocesamiento de datos: los datos de recuentos brutos filtrados se importaron en Scanpy (v.1.7.2) para su posterior procesamiento y análisis (Wolf et al., 2018). Los recuentos de transcritos brutos de las matrices gen-célula se filtraron para eliminar las células con menos de 200 transcritos, y se excluyeron del análisis las células con un contenido mitocondrial superior al 20%. También se excluyeron las *features* expresadas en menos de tres células. Se excluyeron los dobletes en los *datasets* utilizando Solo del paquete scVI tools (v.0.19.0) (Bernstein et al., 2020; Gayoso et al., 2022).

Reducción dimensional y análisis de clustering (“agrupamiento”): se utilizó Scanpy para el análisis y la visualización de los datos con los siguientes pasos realizados en orden: normalización de los datos, transformación logarítmica, selección de genes altamente variables (*highly variable genes*, HVG) y análisis de componentes principales (*principal component analysis*, PCA). Los genes con la mayor varianza se utilizaron para realizar una reducción dimensional lineal (análisis de componentes principales), y el número de componentes principales utilizados en los análisis posteriores se eligió teniendo en cuenta Elbowplot. Los niveles de expresión se normalizaron a recuentos por 10.000. A continuación, los recuentos normalizados (*normalized counts*, NC) se transformaron mediante $\log_2(\text{NC} + 1)$ y se utilizaron para análisis posteriores. Los genes altamente variables se seleccionaron en base a los datos transformados logarítmicamente. El análisis de componentes principales se ejecutó con los genes altamente variables seleccionados. En caso necesario, los HVG y el PCA se volvieron a calcular para subconjuntos de células. El *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP) y el Leiden *clustering* se realizaron utilizando Scanpy. En primer lugar, se calcularon los “vecindarios” (*neighborhoods*) con 'scanpy.pp.neighbors'. Las conexiones se calcularon utilizando el método 'umap' con distancia euclidiana. Luego se calculó la integración UMAP usando 'scanpy.tl.umap'. El Leiden *clustering* se calculó utilizando 'sc.tl.leiden' en los *neighborhoods* calculados en los pasos anteriores, con la resolución de 1 para el *dataset* de Schlesinger et al. (Schlesinger et al., 2020) y 0,7 para

el *dataset* de Peng et al. (Peng et al., 2019). Se utilizaron Scanpy y Seaborn para la visualización de datos.

Integración: se usaron las herramientas scVI (v.0.19.0) para integrar los datos de diferentes muestras.

Genes diferencialmente expresados (*differentially expressed genes*, DEGs): se utilizó la prueba de Wilcoxon implementada en la función 'sc.ranked_genes_group()' para obtener los DEGs entre tipos celulares. Los genes con p-valor ajustado $< 0,05$ y $|\text{Log}_2\text{foldchange}| > 1$ se seleccionaron como DEGs.

7. Cultivos celulares

Las células embrionarias de riñón humanas (Hek293T) y las células de ADP humanas (Patu 8988T, Panc1 y T3M4) se cultivaron en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; LONZA, Ref. 12-604F) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS; TICO EU, Ref. A3FBSEU500) y un 1% de penicilina/estreptomicina (Life Technologies). Para las células inhibidas para ELOVL6 o ELOVL1, este medio se suplementó con el inhibidor químico ELOVL6-IN-2 10 nM (MedChemExpress, Ref. HY-12146) o ELOVL1-IN-2 21 μM (MedChemExpress, Ref. HY-145270) respectivamente, durante 48 horas. Para los experimentos con el sistema CRISPRi inducible, las células se suplementaron con doxiciclina 1 $\mu\text{g/ml}$ durante 72 horas. Todas las líneas celulares fueron cedidas amablemente por el Dr. Francisco X Real (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO).

8. Vectores retrovirales y lentivirales, y producción vírica

El silenciamiento de *c-MYC* se realizó utilizando el plásmido pRS-shMYC y se comparó con un vector vacío (pRS, shControl). La sobre expresión de *c-MYC* se realizó con el plásmido pBH2-*c-MYC* y se comparó con un vector vacío (pBH2). Los plásmidos pBH2, pBH2-*c-MYC* y los shARNs fueron proporcionados por el Dr. Bruno Amati (Istituto Europeo di Oncologia, IEO, Milán, Italia). Para la **producción retroviral**, se produjeron retrovirus infecciosos en células Hek293T mediante transfección con cloruro cálcico de la construcción retroviral junto con el plásmido de empaquetamiento pCL-Ampho.

Para la interferencia de ARNm se utilizaron shARNs (MISSION®, Sigma-Aldrich). Se utilizaron dos shARNs dirigidos contra ELOVL6 (shELOVL6 #1 -clon TRCN0000163912, secuencia CCAGATCACTCAGATGCTGAT- y shELOVL6 #2 -clon TRCN0000161318, secuencia GTTCAACGAGAATGAAGCCAT-) y se compararon con un shARN control no dirigido (pLKO-shControl). Se emplearon otros dos shARNs dirigidos contra ELOVL1 (shELOVL1 #1 -clon TRCN0000149553, secuencia GATAAACTCTTCCGTGCATGT- y shELOVL1 #2 -clon TRCN0000275950, secuencia CACCTGTGACCAAGGCTTATG-) y se compararon con un shARN control no dirigido (pLKO-shControl). Los shARNs fueron proporcionados amablemente por el Dr. Francisco X Real (CNIO). Para la **producción lentiviral**, se produjeron lentivirus infecciosos en células Hek293T mediante transfección con cloruro cálcico de la construcción lentiviral junto con los plásmidos de empaquetamiento psPAX2 y pCMV-VSV-G.

Los medios se recogieron dos veces (48 horas y 72 horas tras la transfección). Los sobrenadantes virales se filtraron y se aplicaron sobre las células diana en presencia de 5 µg/ml de polibreno. Las células se utilizaron tras 72 horas de selección con puromicina o una semana de selección con higromicina. Las dosis de antibiótico empleadas aparecen reflejadas en la siguiente tabla:

		T3M4	Patu 8988T	Panc1
Antibióticos	Puromicina	2 µg/ml	3 µg/ml	1,5 µg/ml
	Higromicina	300 µg/ml	-	200 µg/ml

Tabla 1. Dosis de antibiótico empleadas para la selección celular tras la infección.

Para generar un *knockout* (KO) del gen ELOVL6, se diseñaron dos ARN guía CRISPR/Cas9 (sgARNs) dirigidos al primer y segundo exón del gen. Los sgARNs se diseñaron utilizando la herramienta de diseño CRISPR de Benchling (www.benchling.com) siguiendo protocolos establecidos (Martinez-Lage et al., 2020). Las secuencias de los sgARNs fueron sgELOVL6 #1: ACGAGAATGAAGCCATCCAA y sgELOVL6 #2: AACCTACCTGAAGACTGCAA. Se sintetizaron sondas de ADN personalizadas para estos sgARNs con SIGMA. Los sgARNs fueron recocidos y posteriormente ligados en el plásmido lentiCRISPRv2 digerido por BsmBI (Addgene, #52961). La integridad y exactitud de las secuencias de sgARN clonadas se confirmaron mediante secuenciación Sanger. Se utilizaron vectores virales LentiCRISPRv2 que contenían los sgARNs para ELOVL6 o un sgARN control (sgAAVS1:

CCTCTAAGGTTTGCTTACGA). Los clones celulares con KO completo de la expresión de ELOVL6 se seleccionaron para los experimentos posteriores.

Para los experimentos de *knock-down* (KD) de ELOVL6, se empleó una estrategia de inhibición CRISPR (CRISPRi), utilizando un vector lentiviral e inducible, pLVXTet en dCas9-KRAB, desarrollado previamente en el laboratorio. La línea celular T3M4 se transdujo primero con vectores lentivirales recombinantes generados a partir de este plásmido a una multiplicidad de infección (MOI) de 2. Los clones celulares sin expresión residual detectable se seleccionaron para su uso posterior en este estudio. Los sgARNs se diseñaron para dirigirse a secuencias al final de la región promotora o dentro de las bases iniciales del sitio de inicio transcripcional, siguiendo las directrices establecidas (Radzishenskaya et al., 2016). De acuerdo con estos criterios, se generaron cinco sgARNs distintos: sgELOVL6 #3: GACGACCGCTGGAGACCGAG, sgELOVL6 #4: CAGCCCTGGATGTAGCTGAG, sgELOVL6 #5: GCGTCCGCATCCACCGTAGG, sgELOVL6 #6: AGGGTGATGGACAAACGTGC y sgELOVL6 #8: CAGCCTCTCAGCTACATCCA. Estos sgARNs se clonaron en el vector lentiGuide-hygro-eGFP (Addgene, #99375) utilizando la metodología descrita anteriormente, y se testaron para su selección.

9. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El RNA total se aisló a partir de células en cultivo utilizando el kit NucleoSpin RNA para la purificación del RNA (MACHEREY-NAGEL, Ref. 22740955.250) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se trataron con DNasa I antes de la transcripción inversa. El cDNA se generó a partir de 1 µg de RNA utilizando hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa (TaqMan Reverse Transcription Reagents; Thermo Fisher Scientific™, Ref. N8080234). La amplificación y el análisis de la qPCR se realizaron con el sistema de PCR en tiempo real 7500HT (ABiosystems) utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Ref. A6002). Los niveles de RNA se normalizaron con respecto a la expresión de *HPRT* mediante el método ddCt. Las secuencias de los cebadores (*primers*) figuran en la siguiente tabla:

HPRT humano	<i>Forward</i>	GGCGTCGTGATTAGTGATGAT
	<i>Reverse</i>	CCATGAGGAATAAACACCCTTT
c-MYC humano	<i>Forward</i>	TGGAAAACCAGCCTCCCG
	<i>Reverse</i>	TTCTCCTCCTCGTCGCAGTA
ELOVL1 humano	<i>Forward</i>	CAAGTTCACAACAGCCTCCA
	<i>Reverse</i>	ACTTCTCTCTGGCCCTGCTC
ELOVL2 humano	<i>Forward</i>	ACATGATTTCCCTGATTGCTC
	<i>Reverse</i>	TTCTGGTGGTCCTTCAGGTG
ELOVL3 humano	<i>Forward</i>	ATGTAGTTCTGCCCCACAGC
	<i>Reverse</i>	AAGGACATGAGGCCCTTTTT
ELOVL4 humano	<i>Forward</i>	GGCCCATGGATTCAGAAATA
	<i>Reverse</i>	GGAAGGGGCAGTCAGTGTA
ELOVL5 humano	<i>Forward</i>	CCCTGATTGCTCTCTTCACA
	<i>Reverse</i>	GGGTGAAAAGCTGTTGGTGT
ELOVL6 humano	<i>Forward</i>	GCCGACCACCGAATATAAAG
	<i>Reverse</i>	CGAGAATGAAGCCATCCAAT
ELOVL7 humano	<i>Forward</i>	GGCCAGCCTACCAGAAGTATT
	<i>Reverse</i>	TTGCAATCCTCCATGAAAAA

Tabla 2. Secuencias de los *primers* empleados en RT-qPCR.

10. Western blot

Se aisló la proteína total de las células cultivadas mediante lisis celular y sonicación. Se cargaron cantidades iguales de proteína en geles de poliacrilamida y se realizaron SDS-PAGEs. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF, se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5% en TTBS y se incubaron con los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Reactividad	Fuente	Clon	Referencia	Dilución
Anti-c-Myc [Y69]	Humano, Ratón, Rata	Conejo	Monoclonal	Abcam, Ref. ab32072	1:1000
Anti-ELOVL6	Humano, Ratón, Rata	Conejo	Policlonal	Sigma-Aldrich, Ref. PRS4571	1:1000
Anti-vinculin	Humano, Ratón, Rata, Rana, Perro, Oveja, Pollo, Pavo	Ratón	Monoclonal	Sigma-Aldrich, Ref. V9264	1:1000
HRP Anti-beta actin [AC-15]	Humano, Ratón, Rata, Hamster, Conejo, Oveja, Vaca, Perro, Mono verde africano, Pollo, Cobaya, Gato, Cerdo, Carpa	Ratón	Monoclonal	Abcam, Ref. ab49900	1:25000
Anti-rabbit/HRP	Conejo	Cabra	Policlonal	Dako, Ref. P0448	1:5000
Anti-mouse/HRP	Ratón	Cabra	Policlonal	Dako, Ref. P0447	1:5000

Tabla 3. Anticuerpos empleados en *western blot*.

Se tomaron imágenes de las membranas utilizando Clarity Western ECL Substrate (BIO-RAD, Ref. 1705061) y una cámara ImageQuant LAS 4000 CCD.

11. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Se fijaron 10^8 células (T3M4) con formaldehído al 1% durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fijación se detuvo añadiendo glicina (125 mM) con una incubación adicional de 5 minutos. Las células se recogieron por raspado (*scraping*), se sedimentaron y se lisaron en hielo durante 10 minutos en 5 ml de tampón con 50 mM de HEPES (pH 7,5), 140 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 0,5% de NP-40, 0,25% de Triton X-100 y 10% de glicerol. Tras la centrifugación, los núcleos sedimentados se resuspendieron en 5 ml de tampón con 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl, 0,5 mM EGTA y 1 mM EDTA, y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los núcleos sedimentados se resuspendieron en 1 ml de tampón con 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8), 5 mM EDTA (pH 8), 0,5% de SDS e inhibidores de proteasas (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.). Se sonicó durante 3 minutos en un sonicador Covaris,

obteniendo fragmentos de DNA de 200-500 pb. Se pre-lavaron 2 mg de proteína y se incubaron durante la noche con un anticuerpo contra c-MYC (Cell Signaling, Ref. 13987). Las muestras se incubaron con microesferas o *beads* (Cell Signaling, Ref. 9007) durante 2 horas a 4°C, y después se lavaron con los siguientes tampones:

- Tampón Tritón: 100 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 8) y 5% de Tritón X-100.
- Tampón de lavado de micelas mixtas: 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8), 5 mM EDTA (pH 8), 5% de sacarosa, 1% de Tritón X-100 y 0,2% de SDS.
- Tampón 500: 0,1% de desoxicolato sódico, 1 mM EDTA (pH 8), 50 mM HEPES (pH 7,5), 1% de Triton X-100 y 500 mM NaCl.
- Tampón LiCl: 0,5% de desoxicolato sódico, 1 mM EDTA (pH 8), 250 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8) y 0,5% de NP-40.
- Tris-EDTA (TE).

El DNA se eluyó en un tampón con un 1% de SDS y un 1% de bicarbonato sódico. El RNA y la proteína se digirieron con proteinasa K y los enlaces (*crosslinks*) se revirtieron incubándolos toda la noche a 65°C. El DNA se purificó y la abundancia del DNA diana se analizó mediante RT-qPCR con parejas de *primers* diseñados para obtener productos de 50-200 pb. Dichos *primers* se reflejan en la siguiente tabla:

ACHR	<i>Forward</i>	CCTTCATTGGGATCACCACG
	<i>Reverse</i>	AGGAGATGAGTACCAGCAGGTTG
MRTO4	<i>Forward</i>	GACCACAGAGCTGGGATAGC
	<i>Reverse</i>	CACTGCAGCCTGCCTCTC
ELOVL6 promotor #1	<i>Forward</i>	AGAAAGGAAGTGGCCTGGAG
	<i>Reverse</i>	CAAGAGAGCTGGCAGGTTTT
ELOVL6 promotor #2	<i>Forward</i>	GAAGGTGGTTGGAAGAGTGG
	<i>Reverse</i>	TGCAAGCTGAACTTCATTCA
ELOVL6 promotor #3	<i>Forward</i>	CGTTTGTCCATCACCTTTT
	<i>Reverse</i>	CCACTCTTCCAACCACCTTC

Tabla 4. Secuencias de los *primers* empleados en CHIP.

12. Ensayos de proliferación y colonias

Para determinar la **proliferación**, se sembraron $2,5 \times 10^3$ células por pocillo en placas de 96 pocillos. Después de 1, 2, 3, 4, 7 (únicamente en células tratadas con el inhibidor) y 8 días, las células se lavaron con PBS 1X, se fijaron con glutaraldehído al 0,5% durante media hora y se incubaron con cristal violeta al 0,5% en metanol al 25% durante otra media hora. El cristal violeta se eluyó con ácido acético al 10% y se determinó la densidad óptica a 590 nm empleando el lector de placas EnSpire® Multimode Plate Reader.

Para evaluar la **formación de colonias**, se sembraron 800 células en placas de 6 pocillos y, al cabo de 14 días, las células se procesaron como se ha descrito anteriormente, fijándolas en este caso con metanol enfriado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

13. Ensayos de ciclo celular

Para los perfilados del ciclo celular, las células se fijaron con etanol al 70% enfriado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora, se trataron con Triton X-100 al 0,25% durante 15 minutos y se tiñeron a temperatura ambiente durante 30 minutos con $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ de yoduro de propidio (Life Technologies, Ref. P3566) con $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ de RNasa A. Las células se procesaron mediante citometría de flujo empleando el citómetro FACSCalibur Becton Dickinson. Los resultados se analizaron con FlowJo v10.

14. Ensayos de apoptosis

Para la determinación de la apoptosis, las células se resuspendieron en *binding buffer* (10 mM HEPES/NaOH , pH 7,4; 140 mM NaCl ; $2,5\text{ mM CaCl}_2$). Cada muestra se trata durante 15 minutos con $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ de anexina V conjugada con FITC (Biotium, Ref. 29001) y, posteriormente, durante 30 minutos con $2,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ de yoduro de propidio (Life Technologies, Ref. P3566). Las células se procesaron mediante citometría de flujo empleando el citómetro FACSCalibur Becton Dickinson. Los resultados se analizaron con FlowJo v10.

15. Análisis de señalización celular

La señalización celular fue determinada mediante un array de para la determinación paralela de los niveles relativos de fosforilación de las proteínas quinasas humanas, siguiendo las instrucciones del fabricante (Biotechne, Ref. ARY003C). Las membranas del array se revelaron empleando una cámara ImageQuant LAS 4000 CCD.

16. Ensayos de migración

Para los ensayos de migración en **transwell** se sembraron en cada cámara superior 2×10^5 células en DMEM suplementado con FBS al 0,1% (medio pobre en nutrientes). Dichas cámaras se colocaron en pocillos con DMEM suplementado con FBS al 10% (medio rico en nutrientes). Al día siguiente, se retiraron las células de la cámara superior. Las cámaras se fijaron con glutaraldehído al 0,5%, se lavaron dos veces con PBS 1X y se incubaron con cristal violeta al 0,5% en metanol al 25%. Cada cámara se fotografió bajo el microscopio óptico y se analizó con ImageJ/Fiji.

Para los ensayos de **cicatrización de herida (wound healing)**, las células se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10% hasta alcanzar la confluencia. Se realizó una herida sobre la superficie del pocillo utilizando una punta para rasgar la monocapa celular longitudinalmente. Además, se sustituyó el medio por DMEM con FBS al 0,1% y se monitorizó la cicatrización de la herida durante 4, 6 y 24 horas. La cicatrización de la herida se cuantificó utilizando el software ImageJ/Fiji.

17. Análisis del perfil lipídico

Extracción de lípidos: una cantidad de células que contenía 10 μg de DNA se homogeneizó en 700 μl de agua con un sonicador manual y se mezcló con 800 μl de HCl(1M):CH₃OH 1:8 (v/v), 900 μl de CHCl₃, 200 $\mu\text{g/ml}$ del antioxidante 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT; Sigma-Aldrich, Ref. 8.22021) y 3 μl de UltimateSPLASH™ ONE *internal standard mix* (Avanti Polar Lipids, Ref. 330820). Tras agitar con el vórtex y centrifugar, se recogió la fracción orgánica inferior y se evaporó utilizando un Savant SpeedVac SPD111V (Thermo Fisher Scientific™) a temperatura ambiente, y el precipitado lipídico restante se almacenó a - 20°C bajo argón.

Espectrometría de masas: justo antes del análisis por espectrometría de masas, los precipitados de lípidos se reconstituyeron en etanol al 100%. Las especies lipídicas se analizaron mediante cromatografía líquida-ionización por electrospray-espectrometría de masas en tándem (LC-ESI/MS/MS) en un sistema Nexera X2 UHPLC (Shimadzu) acoplado a un espectrómetro de masas híbrido de triple cuadrupolo / trampa iónica lineal (sistema 6500+ QTRAP; AB SCIEX). La separación cromatográfica se realizó en una columna de amida XBridge (150 mm × 4,6 mm, tamaño de partícula de 3,5 µm; Waters) mantenida a 35°C utilizando la fase móvil A [acetato de amonio 1 mM en agua:acetonitrilo 5:95 (v/v)] y la fase móvil B [acetato de amonio 1 mM en agua:acetonitrilo 50:50 (v/v)] en el siguiente gradiente a un caudal de 0,7 ml/min que se aumentó a 1,5 ml/min a partir de los 13 minutos:

- | | |
|------------------------------|-------------------------------|
| 1) 0-6 min: 0% B → 6% B. | 4) 11-13 min: 98% B → 100% B. |
| 2) 6-10 min: 6% B → 25% B. | 5) 13-19 min: 100% B. |
| 3) 10-11 min: 25% B → 98% B. | 6) 19-24 min: 0% B. |

Las especies lipídicas se midieron de la siguiente forma:

Especie lipídica	Medición
SM (esfingomielinas, <i>sphingomyelins</i>) CE (ésteres de colesterol, <i>cholesterol esters</i>) CER (ceramidas, <i>ceramides</i>) DCER (dihidroceramidas, <i>dihydroceramides</i>) HexCER (hexosilceramidas, <i>hexosylceramides</i>) LCER (lactosilceramidas, <i>lactosylceramides</i>)	En modo de ion positivo con un ion producto de 184,1, 369,4, 264,4, 266,4, 264,4 y 264,4 respectivamente
TAG (triacilglicéridos, <i>triacylglycerides</i>) DAG (diacilglicéridos, <i>diacylglycerides</i>) MAG (monoacilglicéridos, <i>monoacylglycerides</i>)	En modo de iones positivos con una pérdida neutra para uno de los residuos de acilos grasos
PC (fosfatidilcolina, <i>phosphatidylcholine</i>) LPC (lisofosfatidilcolina, <i>lysophosphatidylcholine</i>) PE (fosfatidiletanolamina, <i>phosphatidylethanolamine</i>) LPE (lisofosfatidiletanolamina, <i>lysophosphatidylethanolamine</i>) PG (fosfatidilglicerol, <i>phosphatidylglycerol</i>) PI (fosfatidilinositol, <i>phosphatidylinositol</i>) PS (fosfatidilserina, <i>phosphatidylserine</i>)	En modo de iones negativos mediante iones de fragmentos de acil graso

Tabla 5. Medición de las especies lipídicas por espectrometría de masas.

La cuantificación de lípidos se realizó mediante la monitorización programada de reacciones múltiples (MRM), basándose las transiciones en las pérdidas neutras o en los iones producto típicos, tal como se ha descrito anteriormente.

Parámetro	Instrumento
Gas de cortina	35 psi
Gas de colisión	8 a.u. (medio)
Voltaje del IonSpray	5500 V y -4.500 V
Temperatura	550°C
Gas fuente de iones 1	50 psi
Gas fuente de iones 2	60 psi
Potencial de desclusterización	60 V y -80 V
Potencial de entrada	10 V y -10 V
Potencial de salida de la celda de colisión	15 V y -15 V

Tabla 6. Parámetros del instrumento para LC-ESI/MS/MS.

Para el análisis lipídico se tuvieron en cuenta los siguientes residuos de acil graso: 14:0, 14:1, 16:0, 16:1, 16:2, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0, 20:1, 20:2, 20:3, 20:4, 20:5, 22:0, 22:1, 22:2, 22:4, 22:5 y 22:6. Para los triacilglicéridos, en su lugar, se consideraron los siguientes residuos de acil graso: 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:3, 20:4, 20:5, 22:2, 22:3, 22:4, 22:5, 22:6.

La distinción entre lípidos P- y O- éter se basa en la suposición biológica de que las cadenas de acilo unidas al éter son predominantemente saturadas y que las insaturaciones sólo están presentes en las cadenas de acilo unidas al éster.

Análisis de datos: la integración de picos se realizó con el software MultiQuant™ versión 3.0.3. Las señales de las especies lipídicas se corrigieron en función de las contribuciones isotópicas (calculadas con Python Molmass 2019.1.1) y se cuantificaron en base a las señales de los estándares internos y a las directrices de la Iniciativa de Estándares Lipídicos (*Lipidomics Standards Initiative*, LSI) (cuantificación de tipo nivel 2 según la definición de la LSI). Los p-valores de las pruebas T no pareadas y los p-valores corregidos por FDR (mediante el procedimiento Benjamini/Hochberg) se calcularon en Python StatsModels versión 0.10.1.

18. Análisis del metabolismo de ácidos grasos

Los medios marcados isotópicamente se prepararon a partir de DMEM sin glucosa, glutamina ni piruvato sódico (US-Biological, Ref. D9802-01). Se añadieron U-¹³C-glucosa (Cambridge Isotope Laboratories, Ref. CLM-1396) y el resto de las componentes a la concentración normal encontrada en los medios DMEM. El medio se suplementó con un 10% de suero fetal bovino y un 1% de penicilina/estreptomicina.

Se sembraron 5×10^5 células T3M4 en placas de 6 pocillos en DMEM. Tras 24 horas, el medio se cambió a DMEM con U-¹³C-glucosa. Las células se incubaron con U-¹³C-glucosa durante 96 horas y el medio se renovó cada 24 horas. Al final de la incubación, se retiraron los medios, las células se lavaron una vez con PBS 1X frío, se rasparon con 500 μ l de PBS 1X frío, se transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5 ml y se almacenaron a -80 °C (Alcoriza-Balaguer et al., 2023).

La saponificación de ácidos grasos (*fatty acids*, FAs) y el análisis por LC-MS se realizaron como se ha descrito previamente (Alcoriza-Balaguer et al., 2023).

Extracción de lípidos: para analizar los FAs totales, se transfirieron 450 μ l de suspensión celular a un vial de vidrio y se añadieron 1000 μ l de una solución 9:1 de CH₃OH:KOH (3M en H₂O) que contenía PC(16:0/16:0)D62 a 3 ppm. La saponificación se realizó durante 1 h a 80 °C en un baño de agua. Tras la saponificación, las muestras se enfriaron en hielo y se acidificaron añadiendo 100 μ l de ácido fórmico. Los FAs se extrajeron con 2 ml de heptano:isooctano (1:1) (2x), se secaron en un flujo de nitrógeno, se resuspendieron en 200 μ l de fase móvil A que contenía ácido mirístico D27 a 1 ppm y se transfirieron a un vial de vidrio de HPLC.

Espectrometría de masas: los FAs se analizaron en un espectrómetro de masas cuadrupolar-orbitrap (Q Exactive, Thermo-Fisher Scientific) acoplado a cromatografía de fase inversa mediante ionización por electrospray. La separación por cromatografía líquida se realizó en una columna Cortecs C18 (2,1 mm \times 150 mm, tamaño de partícula de 1,6 μ m; Waters). El disolvente A fue acetato de amonio 2,5 mM en 60:40 agua:metanol (v/v). El disolvente B fue acetato de amonio 2,5 mM en acetonitrilo:isopropanol 95:5 (v/v). El caudal fue de 300 μ l/min, la temperatura de la columna de 45 °C, la temperatura del automuestreador de 5 °C y el volumen de inyección de 5 μ l. El gradiente de cromatografía líquida fue:

- | | |
|--------------------|-------------------|
| 1) 0 min: 45% B. | 4) 23 min: 99% B. |
| 2) 0.5 min: 45% B. | 5) 34 min, 99% B. |
| 3) 19 min: 55% B. | |

Entre inyecciones, la columna se lavó durante 2 minutos con 50:50 acetonitrilo:isopropanol (v/v) antes de equilibrarse a las condiciones iniciales. El espectrómetro de masas funcionó en el modo de iones negativos para explorar de 100 m/z a 450 m/z, a un poder de resolución de 140000. Los datos se adquirieron en el modo centroide.

Análisis de datos: el preprocesamiento de datos se realizó utilizando LipidMS3.0 (Alcoriza-Balaguer et al., 2022). El análisis del metabolismo de los FAs se realizó utilizando FAMetA (Alcoriza-Balaguer et al., 2023).

19. Ensayo de calceína-AM

Se sembraron 5×10^3 células en placas negras de 96 pocillos. Tras 24 horas, se añadió Calceína-AM (acetoximetilada) a una concentración final de 5 μM y se determinó su captación utilizando el kit Calceína-AM de Invitrogen™, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life Technologies, Ref. C1430). La fluorescencia se determinó a una densidad óptica de 494/520 nm utilizando un lector luminométrico (EnSpire® Multimode Plate Reader). También tratamos las células tripsinizadas con Calceína-AM y utilizamos un microscopio de fluorescencia THUNDER DMi8 Leica para tomar imágenes. La señal del canal verde se cuantificó utilizando el software ImageJ/Fiji.

20. Ensayo de sinergia a fármacos

La IC50 para el paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina (Abraxane®; Bristol Myers Squibb, Ref. 660458) se determinó en cada línea celular mediante curvas fármaco-respuesta. Se sembraron 5×10^3 células en placas de 96 pocillos y se trataron con diferentes diluciones de Abraxane® al día siguiente. 72 horas tras el tratamiento, se determinó la viabilidad celular mediante el kit ATPlite 1step Luminescence Assay System (PekinElmer, Ref. 6016731) en un lector luminométrico (EnSpire® Multimode Plate Reader).

21. Ensayo de Flutax-2

La entrada de Flutax-2 (Tocris Bioscience, Ref. 6254) se midió según las instrucciones del fabricante. La dosis utilizada fue de 2 μM en HBSS durante 5 minutos. La fluorescencia se determinó a una densidad óptica de 496/526 nm en un lector luminómetro (EnSpire® Multimode Plate Reader).

22. Ensayos de pinocitosis

La entrada de dextrano-rodamina B se midió según las instrucciones del fabricante. Se utilizó Dextrano-Rodamina B de 10.000 Da (Invitrogen™, Ref. D1824) para cuantificar la micropinocitosis y Dextrano-Rodamina B de 70.000 Da (Invitrogen™, Ref. D1841) para determinar la macropinocitosis. La dosis utilizada para cada molécula fue de 0,2 mg/ml en DMEM sin FBS. Después de 30 minutos, se determinó la fluorescencia a una densidad óptica de 570/590 nm en un lector luminómetro (EnSpire® Multimode Plate Reader).

23. Inmunofluorescencia

Seguimos el protocolo establecido por *Le et al.* ([Le & Machesky, 2022](#)). El día anterior, se sembraron 5×10^4 células en un cubreobjetos estéril redondo colocado sobre un pocillo de la placa de 24 pocillos. El día del experimento, se colocaron las células sobre hielo para detener la endocitosis y sincronizar las células para mejorar la entrada de dextrano. Tras 30 minutos de tratamiento con el dextrano correspondiente (Invitrogen™, Ref. D1824 y D1841) a 0,2 mg/ml en DMEM sin FBS, se lavaron los cubreobjetos tres veces con PBS 1X frío para eliminar el dextrano y detener la endocitosis. Se fijaron las células 15 minutos con PFA al 4% y se tiñeron con DAPI 1:5000 durante 15 minutos. Se montaron los cubreobjetos en portaobjetos y se utilizó un microscopio de fluorescencia Leica THUNDER DMI8 para tomar las imágenes. Dichas fotografías se procesaron y se cuantificó la señal del canal rojo utilizando el software ImageJ/Fiji.

24. Microscopía electrónica

Las células se embebieron en TAE con agarosa-D1 al 1% y se fijaron cortes finos de los bloques celulares en glutaraldehído al 2,5%, se lavaron en tampón cacodilato 0,1 M y se fijaron en tetróxido de osmio acuoso al 1%. A continuación, se deshidrataron y se incrustaron en resina epoxi. Se realizaron secciones semifinas de 1 μm de grosor y se tiñeron con azul de toluidina, evaluándose mediante microscopía óptica para seleccionar las zonas más celulares. Se cortaron secciones finas de estas zonas, se colocaron en rejillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo. Se evaluaron empleando un microscopio electrónico de transmisión (JEM 1011; JEOL Ltd, Japón).

25. Experimentos de medida de la tensión de la membrana plasmática

Teñimos células tripsinizadas con Calceína-AM (5 μM) siguiendo las instrucciones del fabricante (Life Technologies, Ref. C1430) y utilizamos un microscopio de fluorescencia de superresolución para tomar imágenes de los campos citométricos (THUNDER DMI8 Leica, con un objetivo de inmersión 63x/1.40; HC PL APO; longitud de onda de emisión 525 nm). Las imágenes se adquirieron con una cámara Leica KS-14401089 (16 bits, 2048x2048) con una resolución de 0,24 μm en el plano xy. Se registró un total de 150 campos citométricos por muestra, con una media de 20 células por campo fotografiado. La tensión efectiva de la membrana se estimó a partir del factor de estructura estática de los contornos celulares en el plano ecuatorial, interpretado en términos de la membrana Helfrich Hamiltonian (Helfrich, 1973; Law et al., 2023; Rodríguez-García et al., 2015).

El procesamiento de imágenes, la detección de contornos celulares y el análisis de datos se llevaron a cabo utilizando el *software* Mathematica 13.3 (Wolfram Research, Inc., Mathematica, Version 13.3, Champaign, IL (2023)). En resumen, se realizó una reducción de ruido mediante un filtrado gaussiano de 2 píxeles de radio, siendo posteriormente binarizado mediante un umbral global determinado por el método de maximización de la varianza basado en el *clustering* de Otsu. Los componentes morfológicos se filtraron selectivamente basándose en umbrales tanto para el radio celular (mayor de 7,5 μm según el tamaño medio), como para una circularidad ($c > 0,9$).

Se restringió el análisis de imágenes a las células suspendidas que presentaban alteraciones morfológicas mínimas. Se realizó un refinamiento adicional de los contornos para mitigar los efectos de la pixelación en la descripción de las fluctuaciones del modo normal. Para ello, los contornos brutos se transformaron en coordenadas polares, se interpolaron utilizando una función BSpline de grado 12 y, finalmente, se remuestrearon de 0 a 2π , a 720 intervalos fijos. Por último, cada contorno se transformó al espacio complejo de Fourier mediante la Transformada Rápida de Fourier (*Fast Fourier Transform*, FFT).

Para el análisis físico, se asumió que el cultivo celular es biológicamente homogéneo y representa un proceso ergódico, de tal forma que la media temporal de las fluctuaciones de la membrana celular (factor estático) es equivalente a la media estadística del conjunto celular que muestra variabilidad morfológica en un momento dado. Esto permite una estimación eficaz de la rigidez media de la membrana del conjunto celular. Debido al mayor tamaño aparente de los componentes detectados, nos centramos en los modos Helfrich de la mayor longitud de onda. Por lo tanto, domina la tensión de membrana, tratando un estimador de la rigidez celular como:

$$\sigma_{eff}(n_q) \sim k_B T / (2\pi n_q \langle |h_q|^2 \rangle_i)$$

26. Experimentos de indentación por pinzas ópticas (OTs)

Las células prístinas resuspendidas en tampón DMEM se incubaron subconfluentes durante 1,5 horas en un cubreobjetos de vidrio para microscopio de 0,17 mm de grosor (alícuota de 45 μ l de cultivo con 10^5 células/ml). Se añadieron microesferas o *beads* de poliestireno con un tamaño medio de partícula de 5,7 μ m (Sigma-Aldrich) a una concentración final del 0,01% (p/v).

La plataforma de pinzas ópticas (Impetux Optics S.L., España; *optical tweezers*, OTs) está equipada con un dispositivo de medición directa de la fuerza, capaz de detectar el cambio de momento óptico de las trampas ópticas (SensoCell). El dispositivo de OTs está montado en un microscopio invertido (Eclipse Ti, Nikon, Japón), utilizando un objetivo de inmersión en agua (Plan Apo VC 60XA/1.20 WI, Nikon) empleado para enfocar la trampa óptica láser sobre la muestra. La muestra se colocó en una cámara de vidrio hecha a medida y cerrada por un portaobjetos de microscopio. Esta cámara se

montó en el microscopio y las mediciones se realizaron a 25 °C. Las imágenes de campo claro de la muestra se capturaron con una cámara CMOS (ORCA-spark, Hamamatsu, Japón). Las trampas ópticas se operaron con el *software* LightAce desarrollado con LabWiev (con licencia por Impetux Optics S.L.).

Las células se adhirieron a la superficie inferior de la cámara de vidrio por interacciones inespecíficas. Sólo se seleccionaron las células adheridas sin alteraciones morfológicas para realizar la rutina de indentación. Para constituir un yunque de indentación, se colocaron una *bead* de indentación (activa) y tres *beads* de soporte (pasivas) en cuadrantes opuestos junto a la membrana plasmática en posiciones axiales aproximadamente 2 μm sobre la superficie de vidrio. El diámetro exacto de la *bead* de indentación utilizada para el sondeo se midió mediante análisis de imagen utilizando el programa ImageJ. El proceso de indentación consistió en empujar lateralmente la célula, generando una oscilación de la *bead* indentadora. Los parámetros fijos de la oscilación son la forma (onda cuadrada), la frecuencia (0,5 Hz, la cual es suficiente para permitir una relajación completa entre ciclos consecutivos) y el intervalo o desplazamiento (*offset*, del 100%). La amplitud se varió en el régimen lineal, y la rutina se ajustó para barrer el rango de 0,6-1,6 μm con niveles de 0,05 o 0,10 μm . Los datos se adquirieron durante 45 segundos para cada nivel de amplitud.

Para cada experimento de indentación, se calculó la constante de elasticidad de la trampa utilizando una rutina de escaneo de partículas incluida en el *software* LightAce. Se escribió un *script* de Matlab (MathWorks, EE.UU.) para analizar los datos de indentación de los archivos obtenidos por la rutina de indentación LabView hecha a medida. Cada serie de fuerza-tiempo se ajusta a un esquema de deslizamiento-relajación para cada ciclo de indentación.

Los parámetros de elasticidad y permeabilidad se calcularon a partir de análisis reológicos convencionales. El parámetro de elasticidad corresponde a la rigidez cortical (medida como *Young modulus*, E), y el parámetro de permeabilidad corresponde a la difusividad del citoplasma (medida como coeficiente de difusión, D).

27. Ensayo tumorigénico por xenoinjerto *in vivo*

Se crecieron células T3M4 silenciadas para ELOVL6 (shELOVL6 #1 y shELOVL6 #2) y sus homólogas sin interferir (shControl) en ratones hembra “desnudos” (*nude mice*) de 6 a 8 semanas de edad (Rj:ATHYM-Foxn1^{nu/nu}, Janvier Laboratories). Se implantaron subcutáneamente 5×10^5 células (100 μ l: 50% PBS 1X, 50% matrigel) en el flanco del animal y se monitorizó el crecimiento tumoral midiendo con un calibre electrónico cada 3-4 días. El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula longitud x anchura x anchura. Se administró paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina (Abraxane[®]; Bristol Myers Squibb, Ref. 660458) por vía intraperitoneal a una dosis de 40 mg/kg dos veces por semana en las fechas indicadas.

En los experimentos *in vivo* con el inhibidor ELOVL6-IN-2, se implantaron células T3M4 no tratadas en ratones desnudos siguiendo el mismo protocolo. El inhibidor se administró por sonda gástrica a una dosis de 10 mg/kg en las fechas indicadas en combinación con la quimioterapia. El volumen tumoral se evaluó cada 3-4 días.

En los experimentos con el sistema CRISPRi inducible, las células T3M4 portadoras del constructo se implantaron en ratones desnudos como se ha mencionado. El sistema se activó utilizando dieta con doxiciclina en tratamientos de una semana y con descansos semanales entre ellos.

Para todos los experimentos *in vivo*, los ratones se alojaron de acuerdo con las directrices institucionales y todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices institucionales para el bienestar de los animales de experimentación aprobadas por el Comité de Ética del Hospital 12 de Octubre (CEI 20/377) y la Comunidad de Madrid (PROEX 312.8/21), y de acuerdo con las directrices para la Conducta Ética en el Cuidado y Uso de Animales según lo establecido en los Principios Rectores Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales (*International Guiding Principles for Biomedical Research involving Animals*), desarrollados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (*Council for International Organizations of Medical Sciences*, CIOMS).

28. Medición de la acumulación tumoral de Abraxane

La cuantificación de Abraxane en muestras tumorales se realizó utilizando una versión modificada de un protocolo descrito previamente (Gardner et al., 2008). Las muestras tumorales congeladas (5-100 mg) se colocaron en tubos de 2 ml que contenían *beads* cerámicas CK14 (Precellys Lysing kit y Soft tissue homogenizing CK14, Bertin Technologies, Ref. P000933-LYSK0-A). Por cada 100 mg de tejido, se añadió 1 ml de PBS. A continuación, los tumores se homogeneizaron a 4 °C en un sistema Precellys Evolution (2 x 30 s a 6000 rpm, 30 s de reposo) equipado con un refrigerador Criolys (Bertin Technologies).

Los homogeneizados tumorales se transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5 ml y se extrajeron con 4 volúmenes de acetonitrilo (20 µl de muestra + 80 µl de acetonitrilo). Las muestras se centrifugaron dos veces a 13000 g durante 15 min a 4 °C, y los sobrenadantes limpios se transfirieron a placas de 96 pocillos para su análisis basado en LC-MS/MS.

Se realizó una curva de calibración estándar de Abraxane en el intervalo de 20.000 ng/ml a 39 ng/ml mediante diluciones seriadas 1:2 en PBS. A continuación, se extrajo el Abraxane utilizando 4 volúmenes de acetonitrilo (40 µl de estándar + 160 µl de acetonitrilo). Las muestras se centrifugaron dos veces a 13000 g durante 15 min a 4 °C, y los sobrenadantes limpios se transfirieron a placas de 96 pocillos para su análisis basado en LC-MS/MS.

La separación por cromatografía líquida de alta resolución (ultra performance liquid chromatography, UPLC) se realizó en un sistema Acquity UPLC (Waters, Reino Unido) equipado con una columna Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm, 2,1 × 100 mm; Waters). Las temperaturas de la columna y del automuestreador se fijaron en 40 °C y 4 °C, respectivamente. El volumen de inyección de la muestra fue de 4 µl. Los eluyentes consistieron en formiato de amonio 10 mM (pH 4,0) (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B). El caudal se fijó en 0,4 ml/min. Se realizó un gradiente de elución de 5 minutos de la siguiente manera: la composición inicial del eluyente se fijó en un 75% de A y un 25% de B, que se cambió linealmente a un 25% de A y un 75% de B en 2,5 min; a continuación, la proporción de B se incrementó hasta el 100% en el siguiente 1 min. Por último, se recuperaron las condiciones iniciales y se mantuvieron durante 1 min para acondicionar la columna.

El análisis de MS se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de masas Waters Xevo TQ-S (Waters) equipado con una fuente ESI en iones positivos en modo de monitorización de reacción múltiple (MRM). Se utilizó una tensión capilar de 3 kV, una temperatura de la fuente de 120 °C y una temperatura de desolvatación de 500 °C. Los flujos de gas de desolvatación y de cono se fijaron en 800 l/h y 150 l/h, respectivamente, y el gas de colisión fue de 0,25 ml/min. El voltaje del cono se fijó en 30 V y se detectaron las siguientes transiciones: 854>569,3 (energía de colisión 10 eV, empleada para la cuantificación), 854>509,3 (energía de colisión 20 eV, empleada para la confirmación). El software operativo de la estación de datos utilizado fue MassLynx 4.1 (Waters).

28. Análisis estadístico

Todos los datos cuantitativos se presentan como media \pm SD (desviación típica, *standard deviation*) de 3 o más réplicas biológicas diferentes (n). Cada réplica biológica consiste en tres réplicas técnicas. La comparación de los datos que no seguían una distribución normal se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney. La comparación de los datos que seguían una distribución normal se realizó mediante la prueba ANOVA ordinaria de una vía (*ordinary one-way ANOVA test*) o la prueba T de Student (*Student's T test*). Para analizar los experimentos de progresión en el tiempo se realizó una prueba ANOVA de dos vías (*two-way ANOVA test*). Los experimentos de supervivencia se analizaron mediante la prueba Log-rank (Mantel-Cox). Se consideró significancia estadística para * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$. Se utilizó el programa informático Prism 8.0.

RESULTADOS

"Es preciso sacudir energicamente el bosque de las neuronas cerebrales adormecidas; es menester hacerlas vibrar con la emoción de lo nuevo e infundirles nobles y elevadas inquietudes"

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)



1. c-Myc regula directamente la expresión de diferentes elongasas

En un modelo de ratón de cáncer de páncreas dependiente de c-Myc (ratones *Ela1-Myc*), dilucidamos el papel fundamental de c-Myc en el mantenimiento del fenotipo acinar y en el transcurso de la transformación tumoral (Sánchez-Arévalo Lobo et al., 2017). Este modelo transgénico, en el que *c-Myc* está bajo el control del promotor de la elastasa (*Ela1*), permite la sobre expresión de *c-Myc* en el compartimento acinar (Figura 1a). Aprovechando los datos de RNA-seq de páncreas pertenecientes a ratones *Ela1-Myc* de 8 semanas de edad, llevamos a cabo un análisis transcriptómico exhaustivo de firmas de genes mediante GSEA (análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes), revelando el enriquecimiento significativo de vías relacionadas con la proliferación y la señalización oncogénica, como dianas de E2F, ciclo celular, replicación del DNA y dianas de Myc, en consonancia con nuestras expectativas (Figura 1b). Los análisis GSEA confirmaron además el enriquecimiento de las rutas "dianas de Myc" y "ciclo celular" (Figuras 1c y 1d).

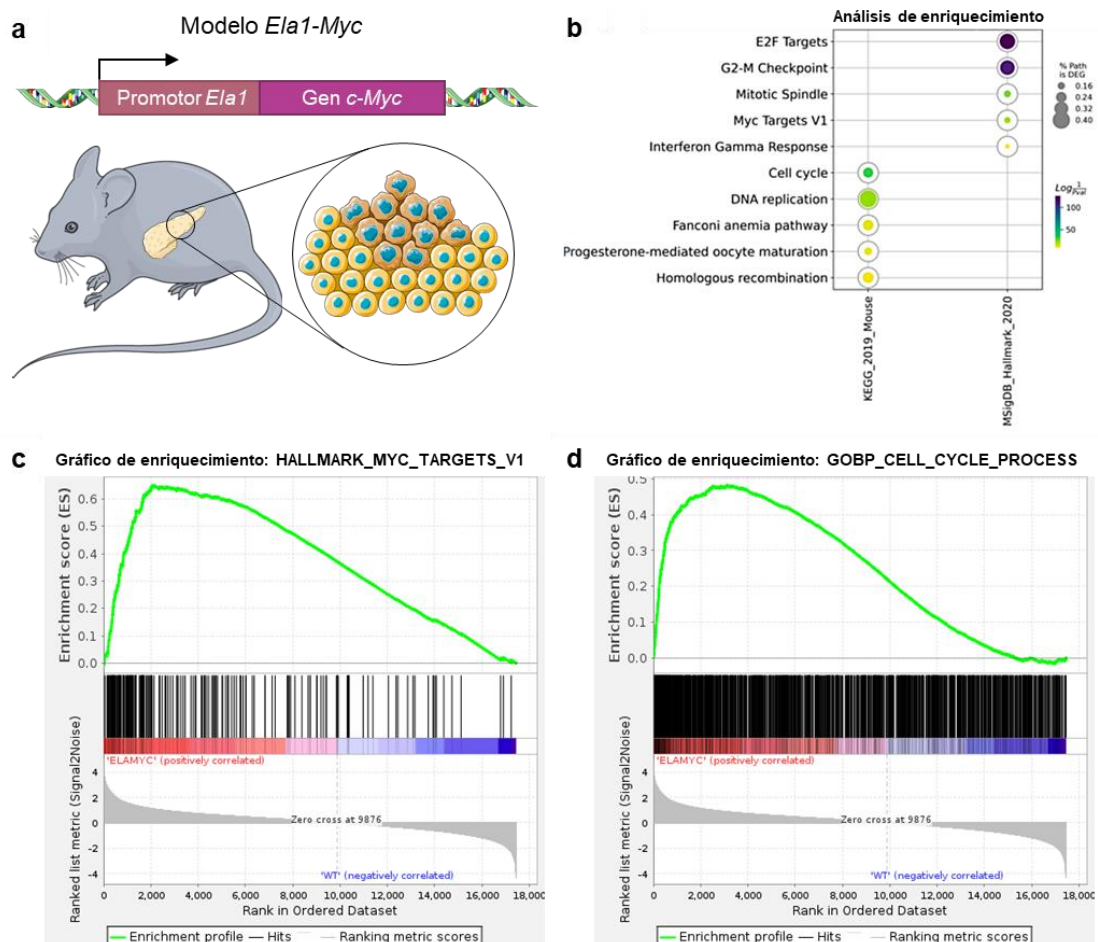


Figura 1. Análisis transcriptómico del modelo murino *Ela1-Myc*. **a** Esquema del modelo murino transgénico *Ela1-Myc*, en el que c-Myc está bajo el control del promotor de la elastasa (*Ela1*) y se sobre expresa en el compartimento acinar. **b** Análisis de enriquecimiento funcional de los genes sobre expresados usando las firmas MisigDB Hallmark 2020 y KEGG 2019; datos de RNA-seq. **c** GSEA mostrando un enriquecimiento en la firma “dianas de Myc”. **d** GSEA mostrando un enriquecimiento en la firma “ciclo celular”. NES *normalized enrichment score*; FDR *false-discovery rate*.

Para investigar el impacto de c-Myc en el metabolismo lipídico, realizamos un análisis de los genes diana de c-Myc identificados por *Gouw et al.* (*Gouw et al., 2019*). En particular, los ratones *Ela1-Myc* mostraron sobre expresión de *Fasn*, *Scd1*, *Acly*, *Acaca* y varias *Elovl*s en comparación con sus homólogos *wild-type* (**Figuras 2a y 2b**).

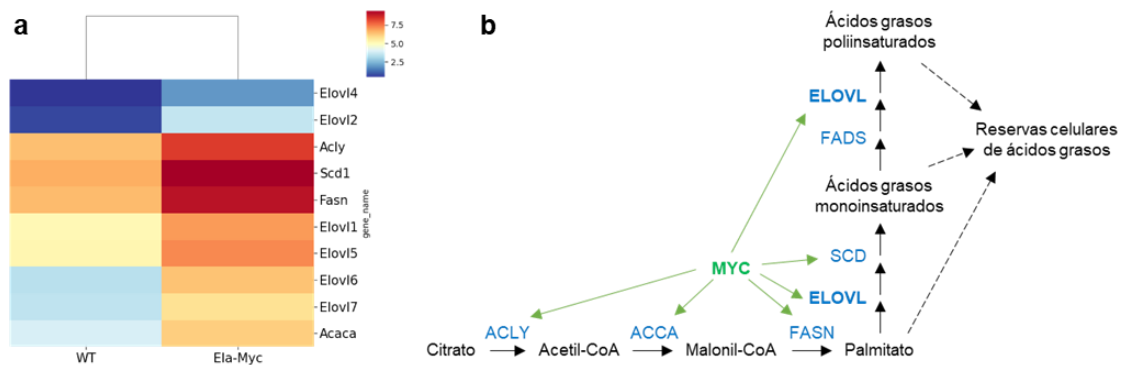


Figura 2. Los genes de síntesis de ácidos grasos están sobre expresados en el adenocarcinoma ductal pancreático. **a** *Heatmap* mostrando los genes de síntesis de ácidos grasos sobre expresados en el modelo murino *Ela1-Myc*; datos de RNA-seq; la barra de escala muestra la media (por gen para cada condición) de los datos de recuento previamente escalados. **b** Esquema de los genes involucrados en la ruta de síntesis de ácidos grasos regulados por MYC, basado en los datos de RNA-seq mostrados en (**2a**).

Además, nuestro análisis de los datos ChIP-seq del modelo *Ela1-Myc* demostró la ocupación de c-Myc en los promotores de *Elovl1* y *Elovl6* (**Figura 3a**). Del mismo modo, confirmamos la regulación directa de las *Elovl*s por c-Myc utilizando datos de ChIP-seq disponibles del modelo de ratón KPC (*Pdx1-Cre; Kras^{+LSL-G12D}; Trp53^{+LSL-R172H}*) (**Figura 3b**), en el que se expresan *Kras* oncogénico y *p53* mutante en células progenitoras pancreáticas (*Walz et al., 2014*) (**Figura 3c**). Además, utilizando los picos situados en el sitio de inicio de la transcripción (*transcriptional start site*, TSS) de este modelo de ratón KPC, realizamos un análisis de enriquecimiento funcional e identificamos procesos de ontología génica relacionados con el metabolismo lipídico y el metabolismo de ácidos grasos de cadena larga, entre otros (**Figura 3d**).

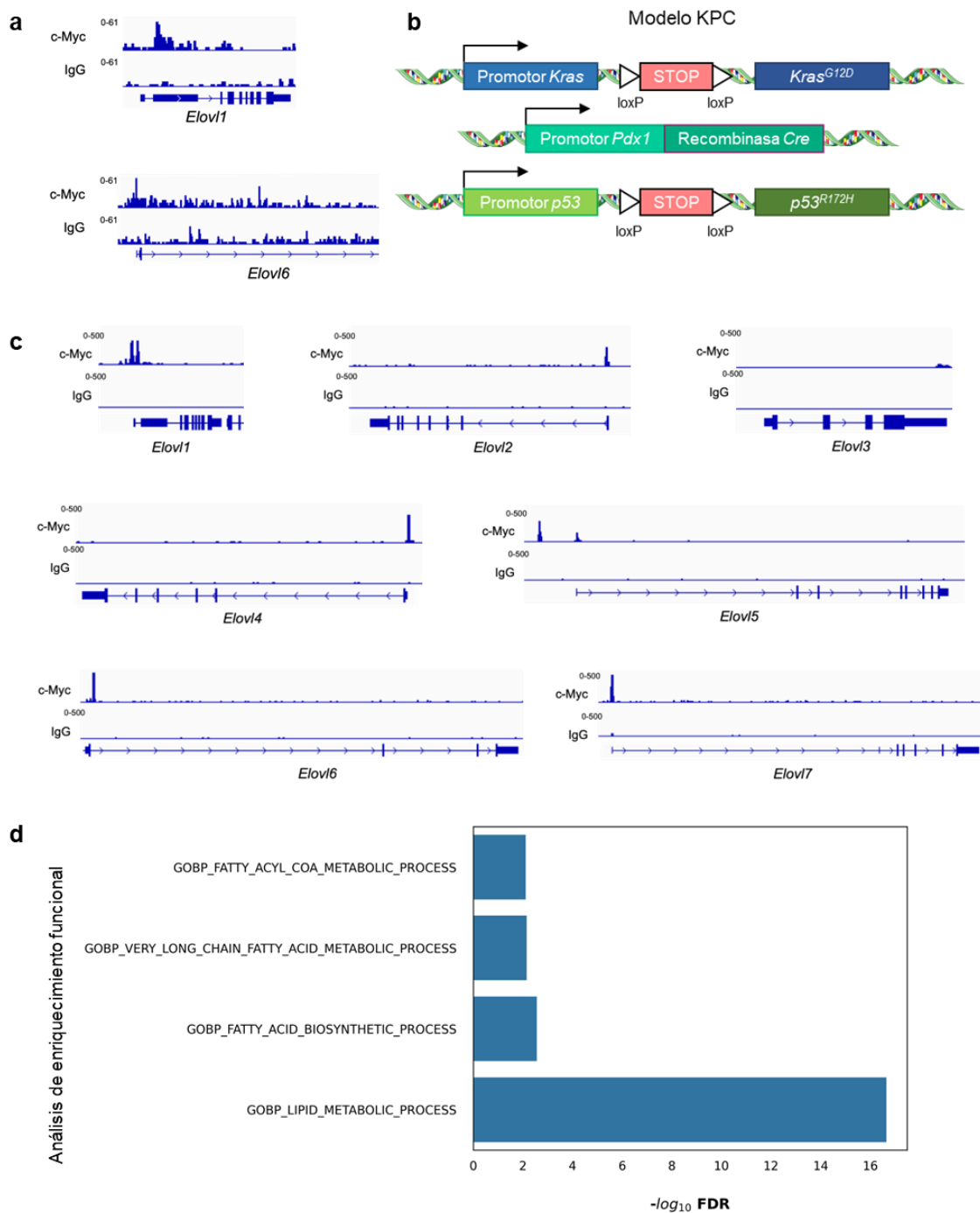


Figura 3. Análisis de ChIP-seq de c-Myc en los promotores de las *Elovs*. **a** Análisis de ChIP-seq mostrando la unión de c-Myc a los promotores de *Elov1* y *Elov6* en el modelo murino *Ela1-Myc*; visualización IGV de los genes de las *Elovs*. **b** Esquema del modelo murino KPC. **c** Análisis de ChIP-seq mostrando la unión de c-Myc a los promotores de las diferentes *Elovs* en el modelo murino KPC; visualización IGV de los genes de las *Elovs*. **d** Análisis de enriquecimiento funcional de los genes adscritos a los picos en (3c).

Adicionalmente, validamos esta regulación en un modelo independiente, empleando datos de RNA-seq y ChIP-seq de fibroblastos embrionarios de ratón (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) infectados con el sistema inducible *c-Myc-ER* (Sabò et al., 2014) (Figura 4a), revelando la sobre expresión de todas las elongasas tras la inducción de *c-Myc*, uniéndose éste a los promotores de diferentes *Elovl*s (Figura 4b, 4c y 4d).

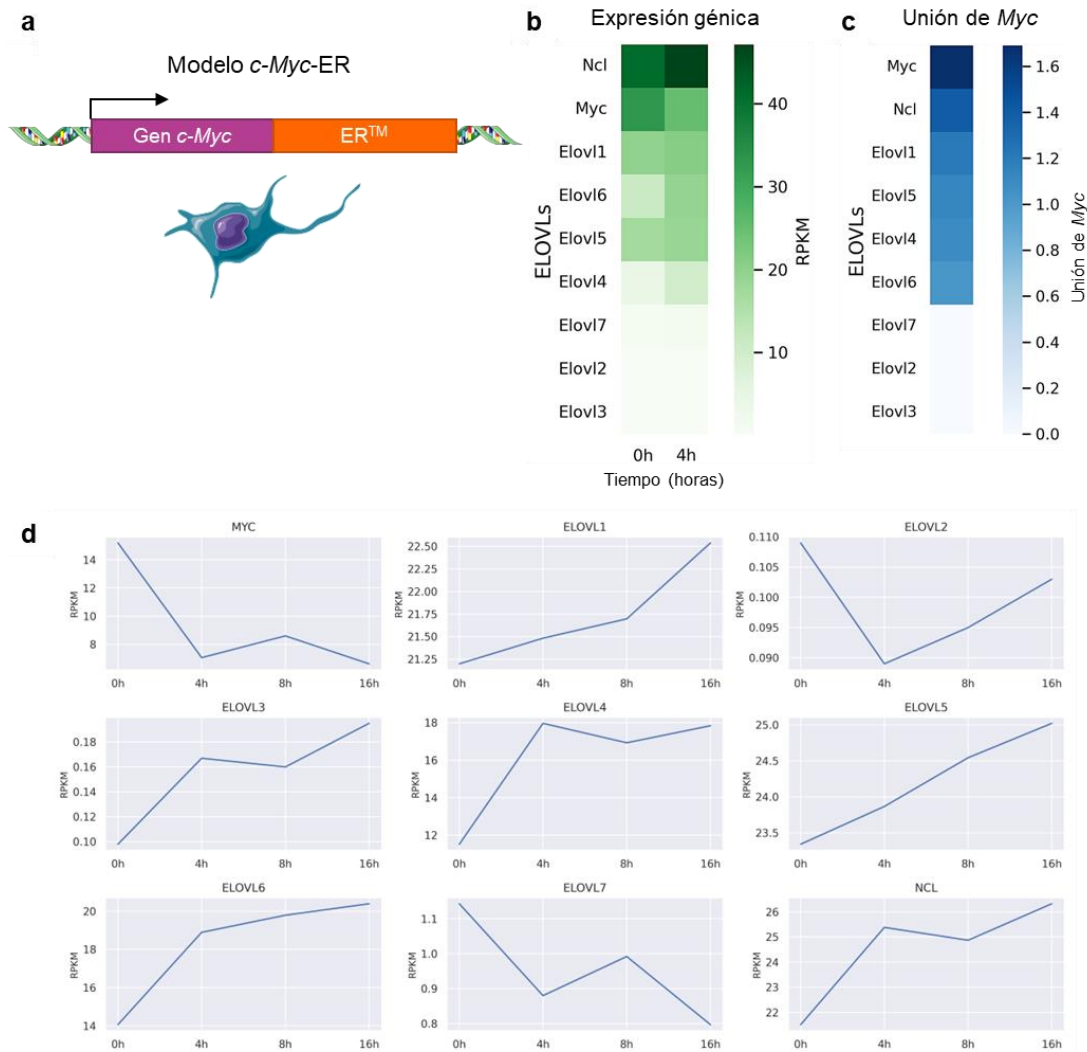


Figura 4. Expresión de las ELOVLs tras la inducción por MYC-ER. **a** Esquema del modelo murino *c-Myc-ER*; los fibroblastos murinos 3T9 transducidos con el sistema inducible *c-Myc-ER* se trataron con 4-OHT durante 2, 4, 8 y 16 horas. **b** *Heatmap* representando la expresión de las *Elovl*s, *Myc* y *nucleolina* (se muestran los valores de RPKMs) en los diferentes tiempos. **c** *Heatmap* representando la unión de *Myc* a los promotores de las *Elovl*s, *Myc* y *nucleolina* en el estadio tumoral; los valores corresponden al $\text{Log}_2(\text{ChIP-Input})$. **d** Análisis por RNA-seq (RPKM) de la expresión de las *Elovl*s, *Myc* y *nucleolina* a los diferentes puntos temporales de tratamiento.

En conjunto, estos resultados apoyan por primera vez la regulación directa de las diferentes elongasas por el oncogén *c-Myc* de una manera dependiente del contexto.

2. Las *ELOVLs* están sobre expresadas durante la progresión tumoral

Para estudiar el papel de las *Elovl*s durante la metaplasia acino-ductal (*acino-ductal metaplasia*, ADM) y la transformación tumoral, se analizaron datos de scRNA-seq del modelo murino PRT (*Ptf1a-Cre-ER*; *Kras*^{+/*LSL-G12D*}; *Rosa26*^{*LSL-tdTomato*}) realizado por *Schlesinger et al.* (*Schlesinger et al.*, 2020) (**Figura 5a**). La presencia del *reporter LSL-tdTomato* permitió rastrear el linaje de las células acinares, revelando células acinares metaplásicas, que expresaban *Krt19* (marcador tumoral) pero ya no *Cpa1* (marcador acinar) a puntos temporales tardíos (**Figura 5b**).

El análisis de este *dataset* reveló la sobre expresión de *Elovl1*, *Elovl5*, *Elovl6* y *Elovl7*, y esta firma estaba enriquecida en las células tumorales (**Figuras 5c, 5d, 5e y 5f**). Estos hallazgos apoyan firmemente la implicación de las *Elovl*s en la progresión tumoral de células acinares a completamente metaplásicas. Los patrones de expresión de *Elovl1* y *Elovl5* se caracterizaban por una distribución difusa en varios tipos celulares, lo que sugiere su presencia generalizada. En cambio, *Elovl6* y *Elovl7* mostraron una expresión más distintiva y específica, localizada en el compartimento tumoral. Esta observación pone de relieve las funciones diferenciales de estas enzimas en diversos tipos celulares y subraya la potencial importancia de *Elovl6* y *Elovl7* en el contexto del microambiente tumoral (**Figura 5f**).

Para validar estos resultados, decidimos explorar el *dataset* disponible del modelo transgénico de ratón *E μ -Myc* (**Figura 6a**), en el cual *c-Myc* se encuentra bajo el control del promotor de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*immunoglobulin heavy locus*, IgH) y permite estudiar la progresión de la enfermedad desde estadios pretumorales a tumorales (*Sabò et al.*, 2014). Investigamos la distribución genómica de *Myc* y la expresión de las *Elovl*s durante la linfomagénesis de linfocitos B *in vivo*. Analizamos el perfil transcriptómico acoplado a ChIP-seq en linfocitos B de hermanos de camada jóvenes no transgénicos (control, C) y transgénicos *E μ -Myc* (pretumoral, P), y en linfomas surgidos en animales adultos *E μ -Myc* (tumor, T). En consonancia con el aumento progresivo del ARNm de *Myc*, se observó el aumento de *Elovl1*, *Elovl5* y *Elovl6* (**Figura 6b**). Además, se analizó la distribución genómica de *c-Myc*, encontrándose en los promotores de *Elovl1*, *Elovl4*, *Elovl5*, *Elovl6* y *Elovl7* (**Figura 6c**).

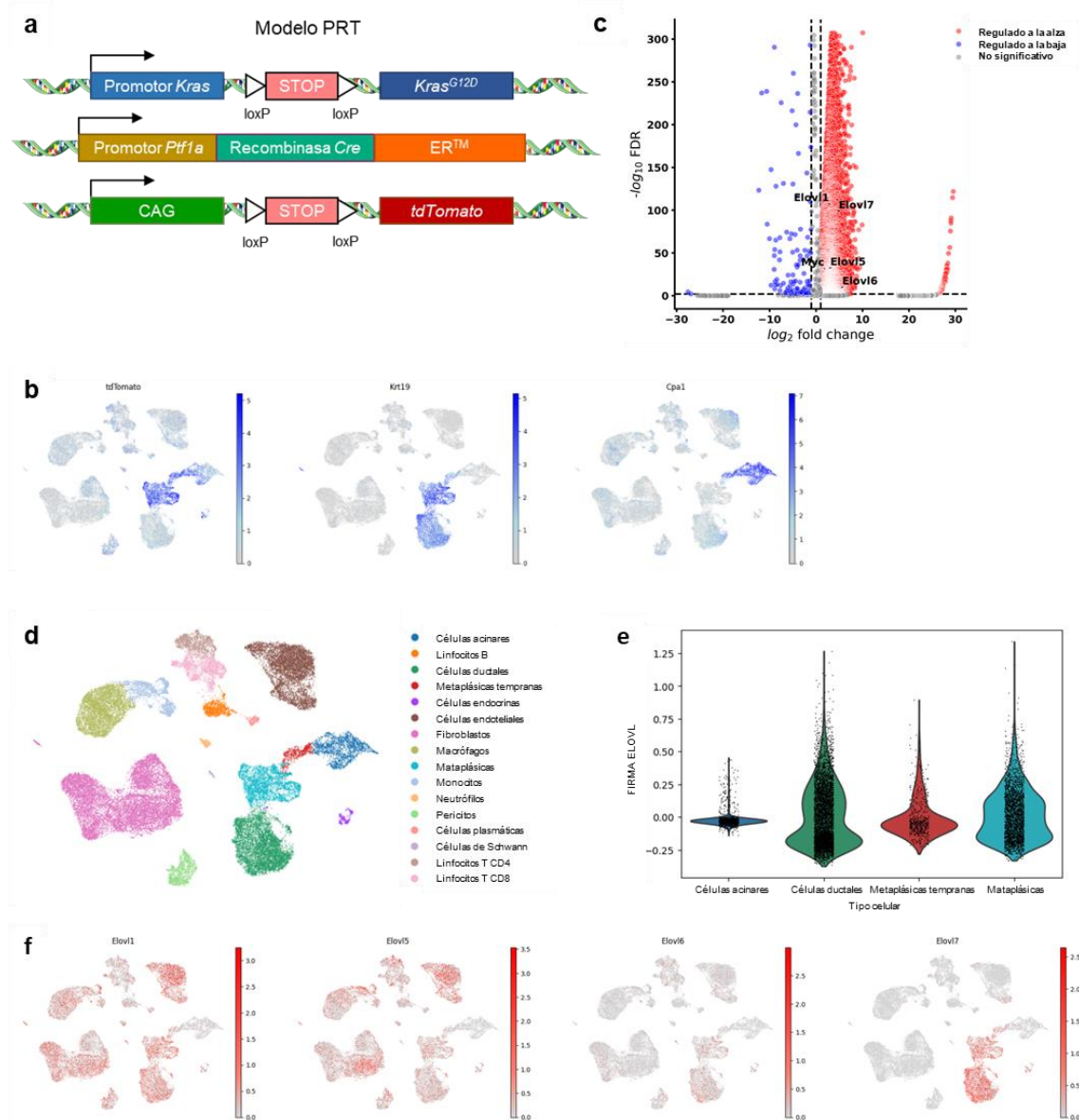


Figura 5. Análisis de scRNA-seq de adenocarcinoma ductal pancreático murino. a Esquema del modelo murino PRT. **b** UMAPs que representan la expresión por célula de *tdTomato*, *Krt19* y *Cpa1* en células ductales, acinares metaplásicas tempranas y metaplásicas tardías; la topología del UMAP y los tipos celulares coinciden con los mostrados en (5d); las barras de escala muestran los recuentos normalizados (10^4 recuentos por célula) y transformados logarítmicamente. **c** *Volcano plot* que muestra los DEGs entre células metaplásicas y acinares en el modelo de ratón PRT. **d** UMAP de datos de scRNA-seq del modelo PRT de ADP, que revela la composición de tipos celulares presente en el *dataset*. **e** *Violin plot* que representa la expresión general de las *Elovl*s en células de ADP; la firma de las *Elovl*s está compuesta por *Elov1*, *Elov5*, *Elov6* y *Elov7* murinas; la puntuación representa la expresión media de este conjunto de genes en células ductales, acinares metaplásicas tempranas y metaplásicas tardías usando como referencia todo el genoma. **f** UMAPs que representan la expresión por célula de *Elov1*, *Elov5*, *Elov6* y *Elov7*; la topología del UMAP y los tipos de células

coinciden con los mostrados en (5d); el nivel de expresión alto se marca en rojo, y el nivel de expresión bajo en gris; las barras de escala muestran los recuentos normalizados (10^4 recuentos por célula) y transformados logarítmicamente.

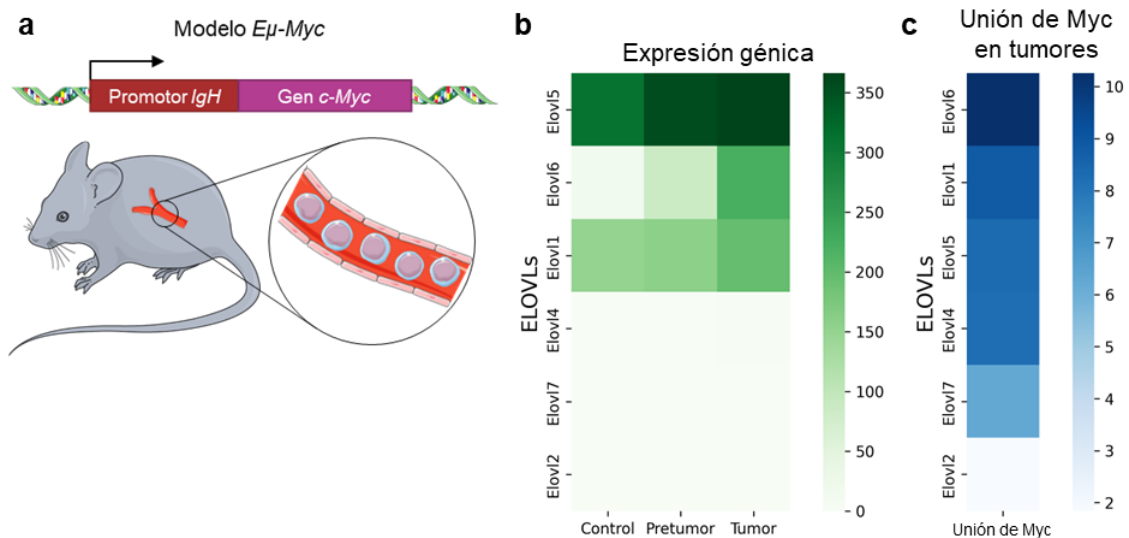


Figura 6. Distribución genómica de Myc y expresión de las *Elovls* durante la linfomagénesis de linfocitos B *in vivo*. **a** Esquema del modelo murino transgénico $E\mu$ -Myc, en el que c -Myc está bajo el control del promotor de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. **b** Se recogieron linfocitos B de ratones $E\mu$ -Myc en diferentes estadios (Control, Pre-tumoral y Tumoral); el *heatmap* representa la expresión de las *Elovls*, *Myc* y *nucleolina* (RPKMs) en los estadios Control, Pre-tumoral y Tumoral. **c** El *heatmap* representa la unión de Myc a los promotores de las *Elovls*, *Myc* y *nucleolina* en el estadio tumoral; los valores corresponden a $\text{Log}_2(\text{ChIP-Input})$.

Por lo tanto, podemos concluir que c -Myc induce la expresión de varias *Elovls*, siendo reclutado directamente a sus promotores, y que esta inducción se acentúa durante la transformación celular y la progresión tumoral.

3. ELOVL6 es la única elongasa restringida al compartimento tumoral en el ADP humano

Decidimos investigar la expresión de las *ELOVLs* en la cohorte de ADP de la base de datos TCGA (*The Cancer Genome Atlas Program*) utilizando el navegador GEPIA (*Gene Expression Profiling Interactive Analysis*). En particular, *ELOVL1*, *ELOVL5* y *ELOVL6* mostraron una sobre expresión significativa en el adenocarcinoma ductal pancreático

Las ELOVLs como diana terapéutica en el ADP

(*pancreatic adenocarcinoma*, PAAD, T) en comparación con el tejido normal (N), siendo *ELOVL6* la más sobre expresada (**Figura 7a, 7b y 7c**). Este patrón persistió en varios estadios tumorales (**Figura 7d**), haciendo del ADP uno de los pocos tumores en los que *ELOVL6* está sobre expresado (**Figura 7e**).

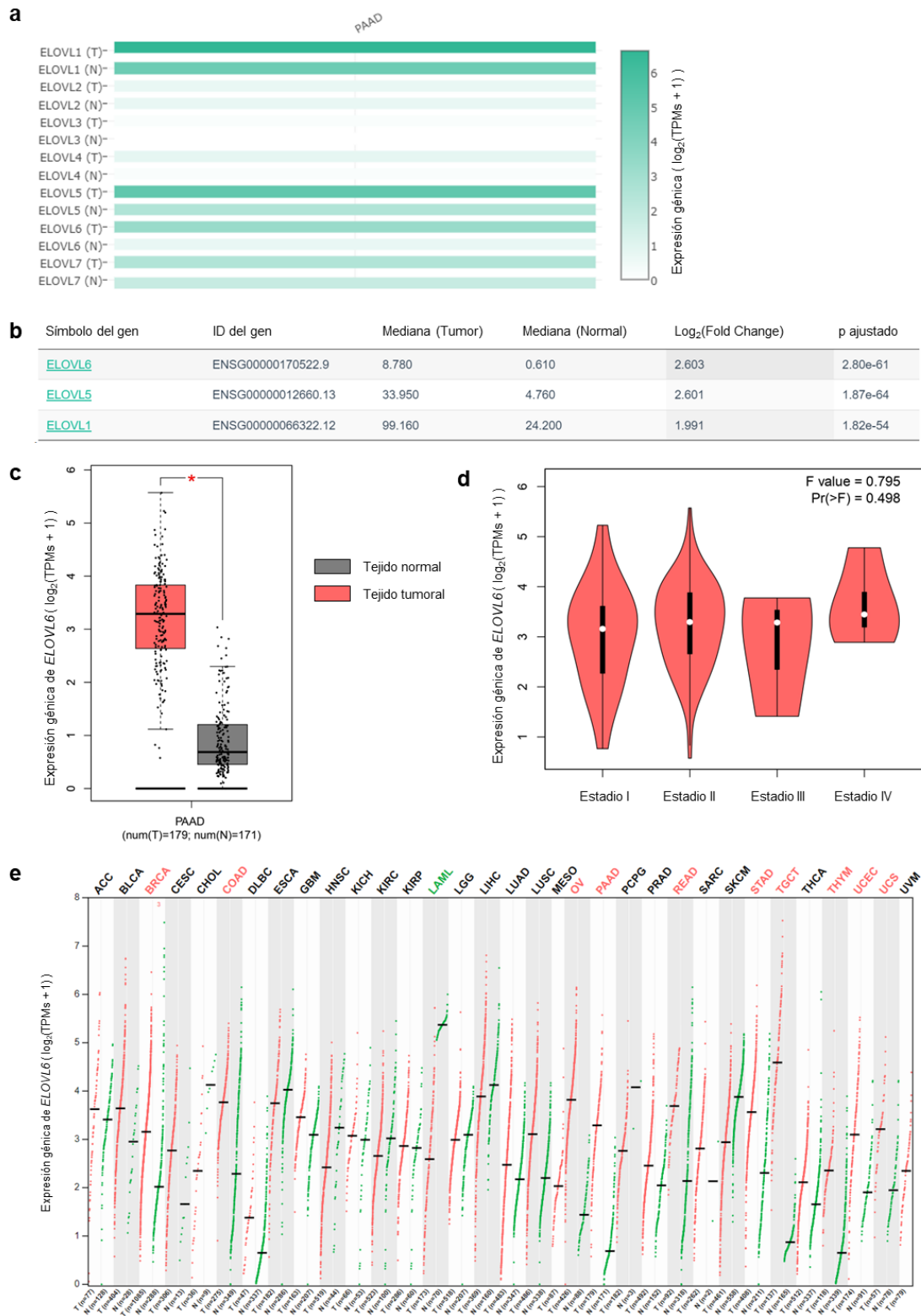


Figura 7. Análisis de expresión y alteraciones de las *ELOVLs* en el ADP. **a** Expresión génica de las *ELOVLs* en tejido pancreático normal (N) y tumoral (T; ADP); base de datos TCGA; navegador GEPIA; TPMs: transcritos por millón. **b** *ELOVLs* con expresión diferencial significativa entre tejido pancreático normal y tumoral (ADP); base de datos TCGA; navegador GEPIA; la mediana de expresión se muestra en transcritos por millón. **c** Expresión génica de *ELOVL6* en tejido normal (N) y tumoral (T; ADP); base de datos TCGA; navegador GEPIA; TPMs: transcritos por millón; eje logarítmico. **d** Expresión génica de *ELOVL6* en diferentes estadios de progresión del ADP; base de datos TCGA; navegador GEPIA; TPMs: transcritos por millón; eje logarítmico. **e** Expresión génica de *ELOVL6* en tejido normal (N) y tumoral (T); base de datos TCGA; navegador GEPIA; ACC: carcinoma adrenocortical; BLCA: carcinoma urotelial de vejiga; BRCA: carcinoma invasivo de mama; CESC: carcinoma cervical de células escamosas y adenocarcinoma endocervical; CHOL: colangiocarcinoma; COAD: adenocarcinoma de colon; DLBC: linfoma difuso de células B grandes; ESCA: carcinoma esofágico; GBM: glioblastoma multiforme; HNSC: carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; KICH: cromóforo renal; KIRC: carcinoma renal de células claras; KIRP: carcinoma renal de células papilares; LAML: leucemia mieloide aguda; LGG: glioma cerebral de bajo grado; LIHC: carcinoma hepatocelular; LUAD: adenocarcinoma de pulmón; LUSC: carcinoma de pulmón de células escamosas; MESO: mesotelioma; OV: cistoadenocarcinoma seroso de ovario; PAAD: adenocarcinoma pancreático; PCPG: feocromocitoma y paraganglioma; PRAD: adenocarcinoma de próstata; READ: adenocarcinoma rectal; SARC: sarcoma; SKCM: melanoma cutáneo; STAD: adenocarcinoma de estómago; TGCT: tumores testiculares de células germinales; THCA: carcinoma de tiroides; THYM: timoma; UCEC: carcinoma endometrial del cuerpo uterino; UCS: carcinosarcoma uterino; UVM: melanoma uveal; TPMs: transcritos por millón; eje logarítmico. * $p \leq 0,05$; (b, c) Prueba ANOVA ordinaria de una vía.

Dados estos hallazgos, se validaron nuestros resultados utilizando una cohorte distinta compuesta por 24 muestras tumorales de ADP y 11 páncreas control sin ningún tratamiento (Peng et al., 2019) (Figura 8a), la cual fue analizada mediante scRNA-seq. Nuestras observaciones confirmaron la sobre expresión de *ELOVL1*, *ELOVL5*, *ELOVL6* y *ELOVL7* (Figura 8b), corroborando así los resultados obtenidos en la cohorte TCGA. Es importante destacar que esta firma se encontró sobre expresada en las células tumorales en comparación con las células acinares y ductales (Figura 8c y 8d). Utilizando UMAP, se observó que *ELOVL6* era la única enzima restringida al compartimento tumoral (Figura 8e).

Gracias a estos resultados podemos concluir que en el ADP humano existe una sobre expresión significativa de *ELOVL1*, *ELOVL5*, y notablemente, *ELOVL6*, con una

localización específica en el compartimento tumoral, enfatizando su relevancia potencial en el ADP.

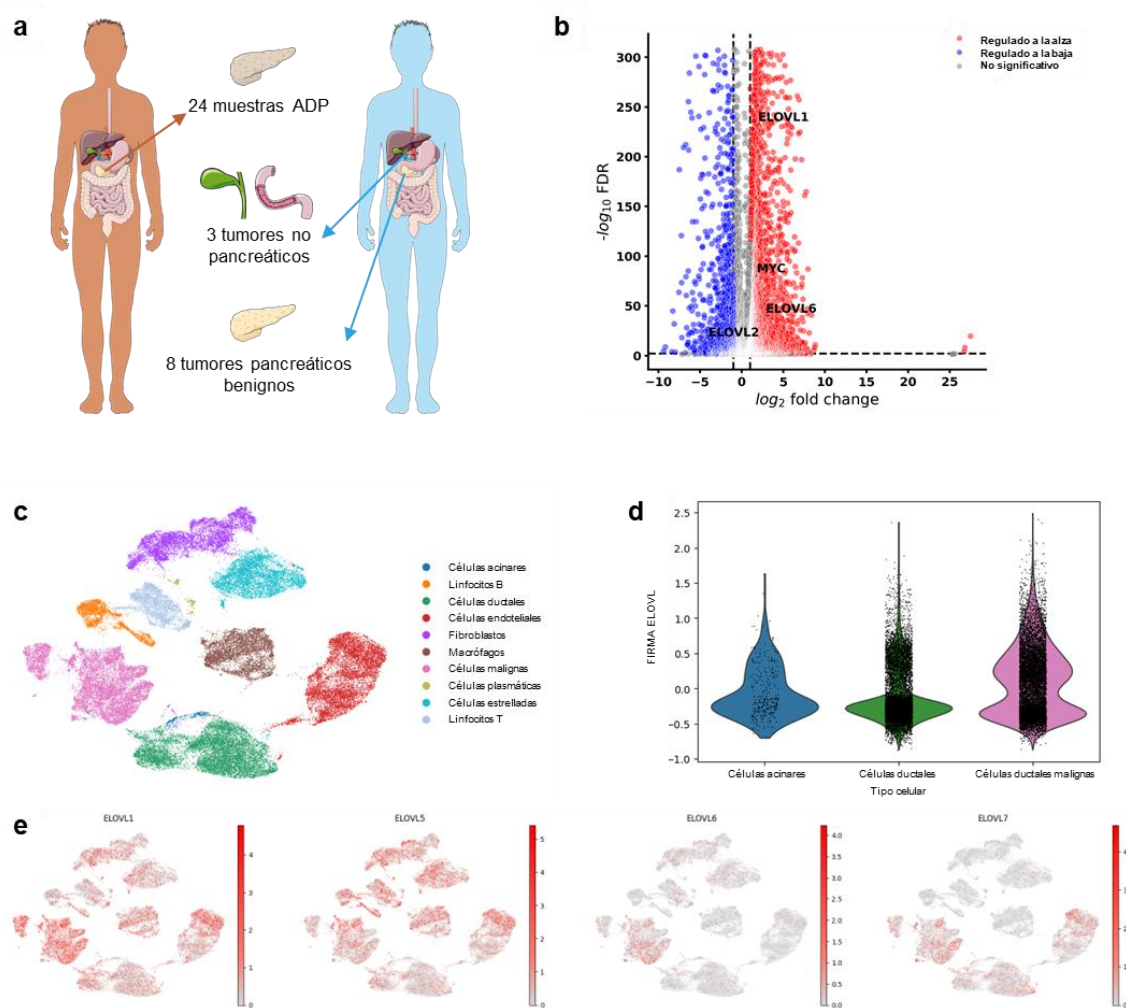


Figura 8. Análisis de scRNA-seq de adenocarcinoma ductal pancreático humano. a Esquema de la obtención de muestras humanas. **b** *Volcano plot* que muestra los DEGs entre células ductales malignas y células ductales del modelo representado en (8a). **c** UMAP de datos de scRNA-seq del modelo representado en (8a), que revela la composición de tipos celulares presente en el *dataset*. **d** *Violin plot* que representa la expresión general de las *ELOVLs* en células de ADP; la firma de las *ELOVLs* está compuesta por *ELOVL1*, *ELOVL5*, *ELOVL6* y *ELOVL7* humanas; la puntuación representa la expresión media de este conjunto de genes en células ductales, acinares, tempranas y tardías usando como referencia todo el genoma. **e** UMAPs que representan la expresión por célula de *ELOVL1*, *ELOVL5*, *ELOVL6* y *ELOVL7*; la topología del UMAP y los tipos de células coinciden con los mostrados en (8c); el nivel de expresión alto se marca en rojo, y el nivel de expresión bajo en gris; las barras de escala muestran los recuentos normalizados (10^4 recuentos por célula) y transformados logarítmicamente.

4. c-MYC regula directamente la expresión de *ELOVL6* en líneas celulares de ADP

Basándonos en el patrón de expresión específico de *ELOVL6*, decidimos describir su papel en el adenocarcinoma ductal de páncreas. Por lo tanto, se realizó RT-qPCR y western blot en un panel de cinco líneas celulares diferentes de ADP (**Figuras 9a y 9b**) y seleccionamos tres de ellas, basándonos en sus niveles de expresión de *c-MYC*. De este modo, se observó que T3M4 expresaba altos niveles de *c-MYC*, Patu 8988T exhibía niveles intermedios y Panc1 mostraba niveles bajos de este oncogén (**Figuras 9c y 9d**). Curiosamente, al analizar los niveles de expresión de *ELOVL6* en estas líneas celulares, observamos un patrón paralelo a la expresión de *c-MYC* (**Figuras 9e y 9f**).

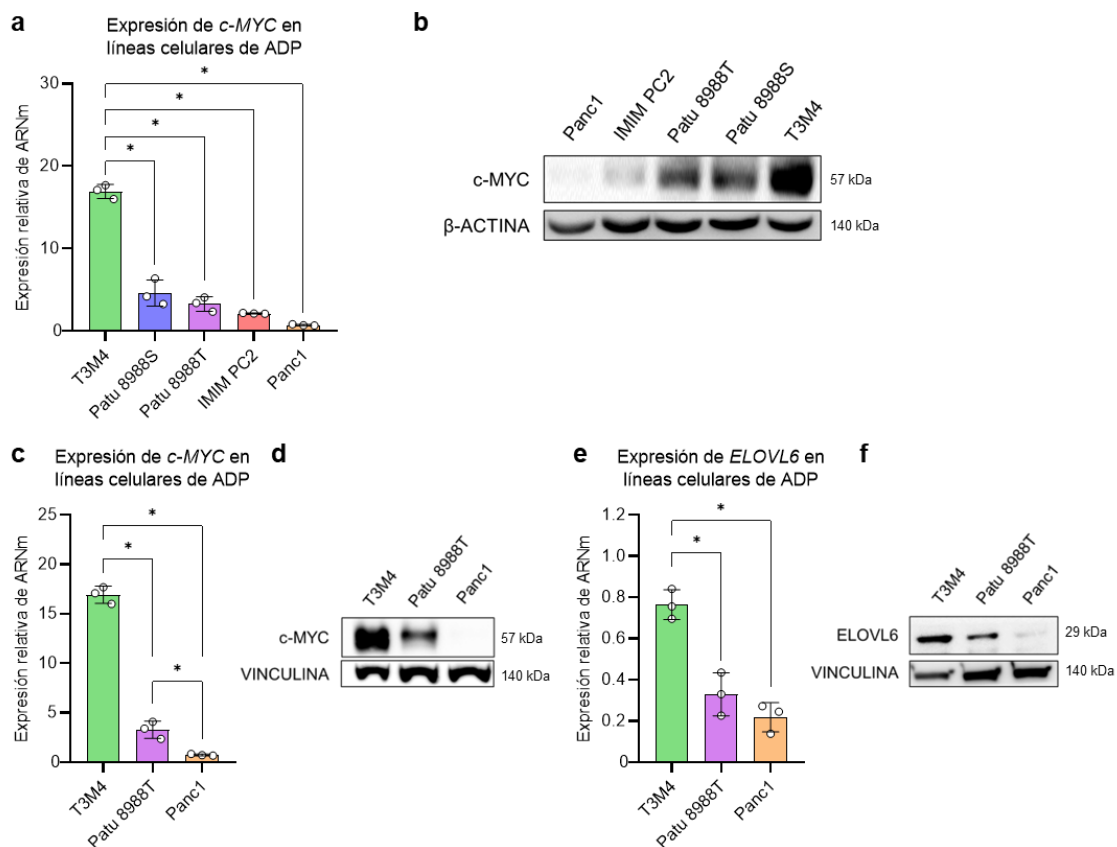


Figura 9. Expresión de *c-MYC* y *ELOVL6* en líneas celulares de ADP. **a** Expresión de ARNm de *c-MYC* en líneas celulares de ADP; la expresión génica se normaliza respecto a *HPRT*; $n = 3$ por línea celular. **b** Western blot de *c-MYC* en líneas celulares de ADP. **c** Expresión de ARNm de *c-MYC* en líneas celulares de ADP; la expresión génica se normaliza respecto a *HPRT*; $n = 3$ por línea celular. **d** Western blot de *c-MYC* en líneas celulares de ADP. **e** Expresión de ARNm de *ELOVL6* en líneas celulares de ADP; la expresión génica se normaliza respecto a *HPRT*; $n = 3$ por línea celular. **f** Western blot de *ELOVL6* en líneas celulares de ADP. Todos los datos se presentan como media \pm SD; * $p \leq 0,05$; (a, c, e) Prueba U de Mann-Whitney.

Para evaluar la correlación entre ambos genes, optamos por silenciar *c-MYC* en T3M4 (la línea de ADP que expresa los niveles más altos de *c-MYC*) utilizando un shARN (shMYC). Observamos que una reducción en los niveles de *c-MYC* estaba asociada con un silenciamiento en la expresión de todos los miembros de la familia *ELOVL* (**Figura 10a**), resultando en una subsiguiente disminución de los niveles de la proteína ELOVL6 (**Figura 10b**). Por el contrario, al aumentar los niveles de *c-MYC* en Panc1 (la línea de ADP que expresa los niveles más bajos de *c-MYC*), observamos una sobre expresión de todas las *ELOVLs* (**Figura 10c**), lo que resultaba en una elevación posterior de los niveles proteicos de ELOVL6 (**Figura 10d**).

Finalmente, se exploró el reclutamiento de *c-MYC* al promotor de *ELOVL6* mediante inmunoprecipitación de cromatina y RT-qPCR (ChIP-qPCR), confirmándose la unión de *c-MYC* a esta región específica (**Figuras 10e y 10f**).

En conjunto, estos resultados revelan una sólida correlación entre *c-MYC* y las *ELOVLs*, haciendo especial hincapié en la expresión de *ELOVL6* en los tumores de ADP. Además, nuestros resultados demuestran de forma concluyente la influencia reguladora directa de *c-MYC* sobre ELOVL6.

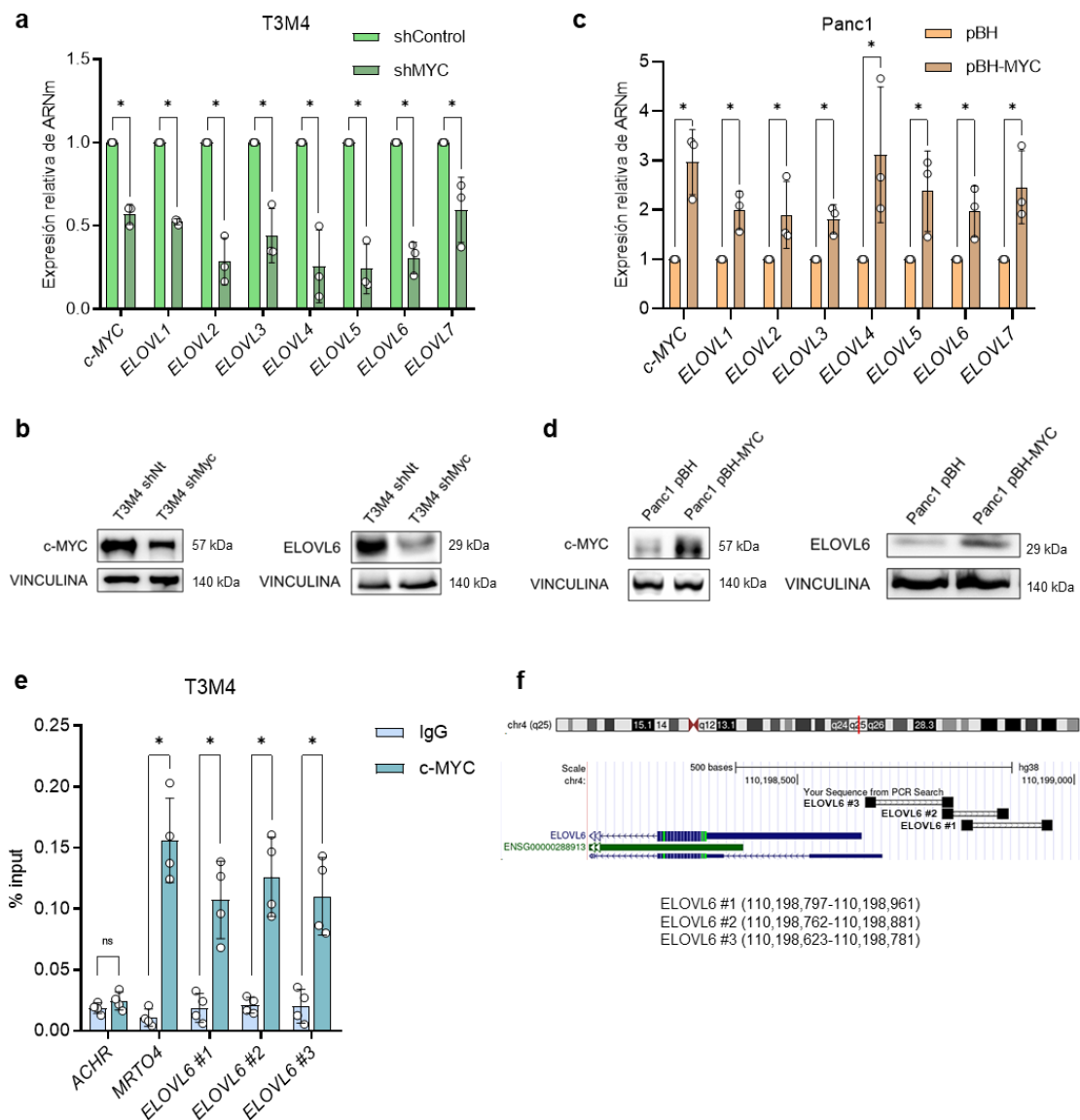


Figura 10. c-MYC regula directamente la expresión de *ELOVL6* en líneas celulares de ADP.
a Expresión de ARNm de *c-MYC* y las *ELOVLs* en T3M4 (shControl y shMYC); la expresión génica se normaliza respecto a *HPRT* y shControl; n = 3 por genotipo. **b** Western blot de *c-MYC* y *ELOVL6* en T3M4 (shControl y shMYC). **c** Expresión de ARNm de *c-MYC* y las *ELOVLs* en Panc1 (pBH y pBH-MYC); la expresión génica se normaliza respecto a *HPRT* y pBH; n = 3 por genotipo. **d** Western blot de *c-MYC* y *ELOVL6* en Panc1 (pBH y pBH-MYC). **e** Inmunoprecipitación de cromatina de *c-MYC* en el promotor de *ELOVL6*; n = 4. **f** Esquema de hibridación de *primers* en el promotor de *ELOVL6*. Todos los datos se presentan como media \pm SD; ns: no estadísticamente significativo, * $p \leq 0,05$; (a, c, e) Prueba U de Mann-Whitney.

5. La interferencia de ELOVL6 disminuye la proliferación celular y la migración *in vitro*

Para establecer el papel esencial de ELOVL6 en la proliferación celular en los tumores humanos de ADP, se interfirió ELOVL6 utilizando dos enfoques diferentes en las líneas celulares T3M4 y Patu 8988T (las cuales presentaban niveles altos e intermedios de expresión de esta elongasa). En primer lugar, se silenciaron los niveles de *ELOVL6* utilizando dos shARNs distintos, denominados shELOVL6 #1 y shELOVL6 #2 (**Figura 11a**), lo que conllevó una disminución simultánea de los niveles de la proteína ELOVL6 (**Figura 11b**). Además, empleamos el inhibidor químico ELOVL6-IN-2.

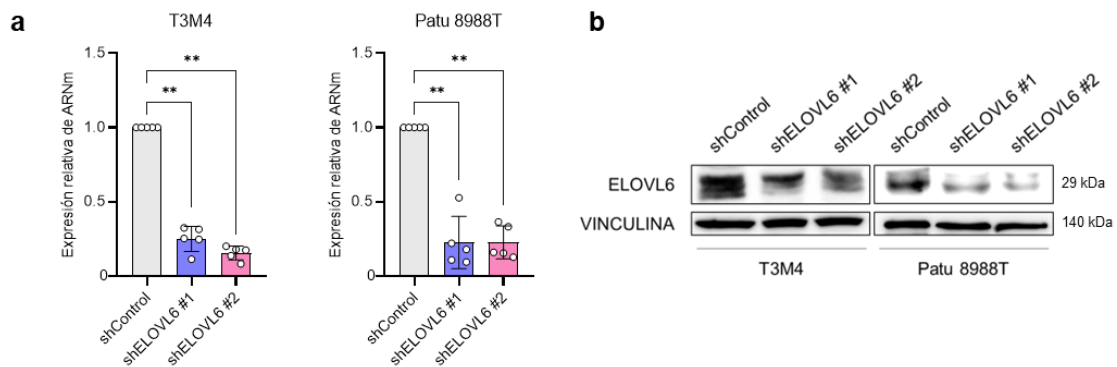


Figura 11. Silenciamiento de *ELOVL6* mediante shARNs. **a** Expresión de ARNm que muestra el silenciamiento de *ELOVL6* en líneas celulares de ADP; la expresión génica se normaliza respecto a *HPRT* y shControl; n = 5 por genotipo y línea celular. **b** Western blot que muestra el silenciamiento de *ELOVL6* en líneas celulares de ADP. Todos los datos se presentan como media \pm SD; **p \leq 0,01; (a) Prueba U de Mann-Whitney.

Es importante destacar que se realizaron análisis del efecto compensatorio del silenciamiento de *ELOVL6* sobre el resto de las elongasas de la familia (**Figura 12a**). Se corroboró que ELOVL6 es una enzima esencial en la biosíntesis de ácidos grasos, dado que, pese a la disminución de ARNm y proteína de ELOVL6, los niveles de ARNm del resto de ELOVLs se ven aumentados. Al actuar ELOVL6 la primera en la ruta de elongación, el resto de elongasas intentan compensar su pérdida aumentando su expresión.

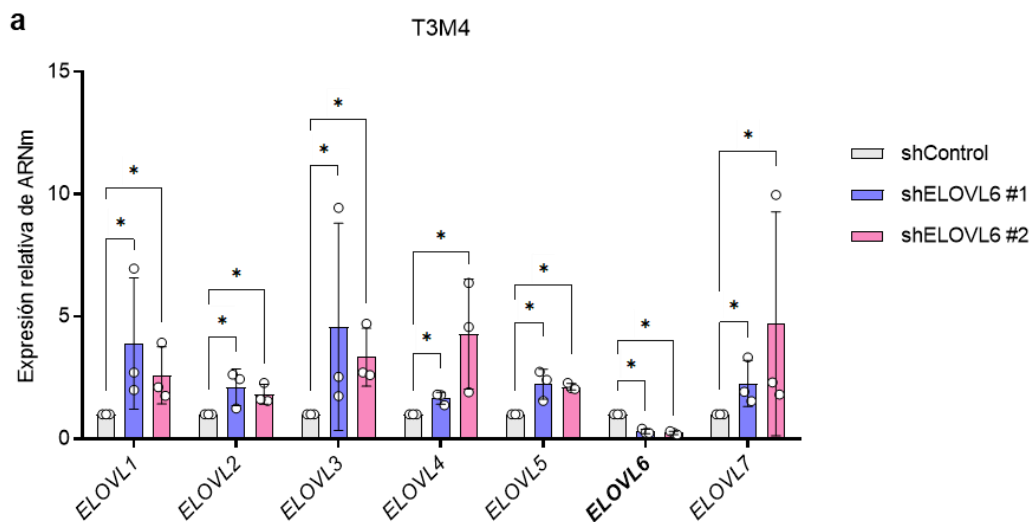


Figura 12. Efecto compensatorio del silenciamiento de *ELOVL6* sobre el resto de elongasas. a Expresión de ARNm que muestra el efecto del silenciamiento de *ELOVL6* sobre las diferentes elongasas en T3M4; la expresión génica se normaliza respecto a *HPRT* y shControl; n = 3. Todos los datos se presentan como media \pm SD; *p \leq 0,05; (a) Prueba U de Mann-Whitney.

El análisis posterior de los ensayos de proliferación celular y de crecimiento de colonias reveló una reducción consistente de la proliferación celular tras la interferencia de *ELOVL6* en todas las líneas celulares analizadas, independientemente del método utilizado (**Figuras 13a y 13b**).

Para determinar los efectos específicos de *ELOVL6*-IN-2 sobre las células de ADP, se diseñó un *knockout* (KO) de *ELOVL6* que dio lugar a la ablación completa de esta elongasa (**Figura 14a**). Como era de esperar, la proliferación y formación de colonias por parte de las células T3M4 *ELOVL6* KO se redujo, y no observamos un efecto aditivo al tratar estas células con *ELOVL6*-IN-2 (**Figura 14b**), confirmando su especificidad.

Esta disminución de la proliferación se correspondía con una notable acumulación de estas células en la fase G1 del ciclo celular, produciéndose un arresto en dicha fase (**Figuras 15a y 15b**). Sin embargo, no se detectaron cambios en el número de células apoptóticas tras el silenciamiento o la inhibición de *ELOVL6* (**Figuras 15c y 15d**).

Las ELOVLs como diana terapéutica en el ADP

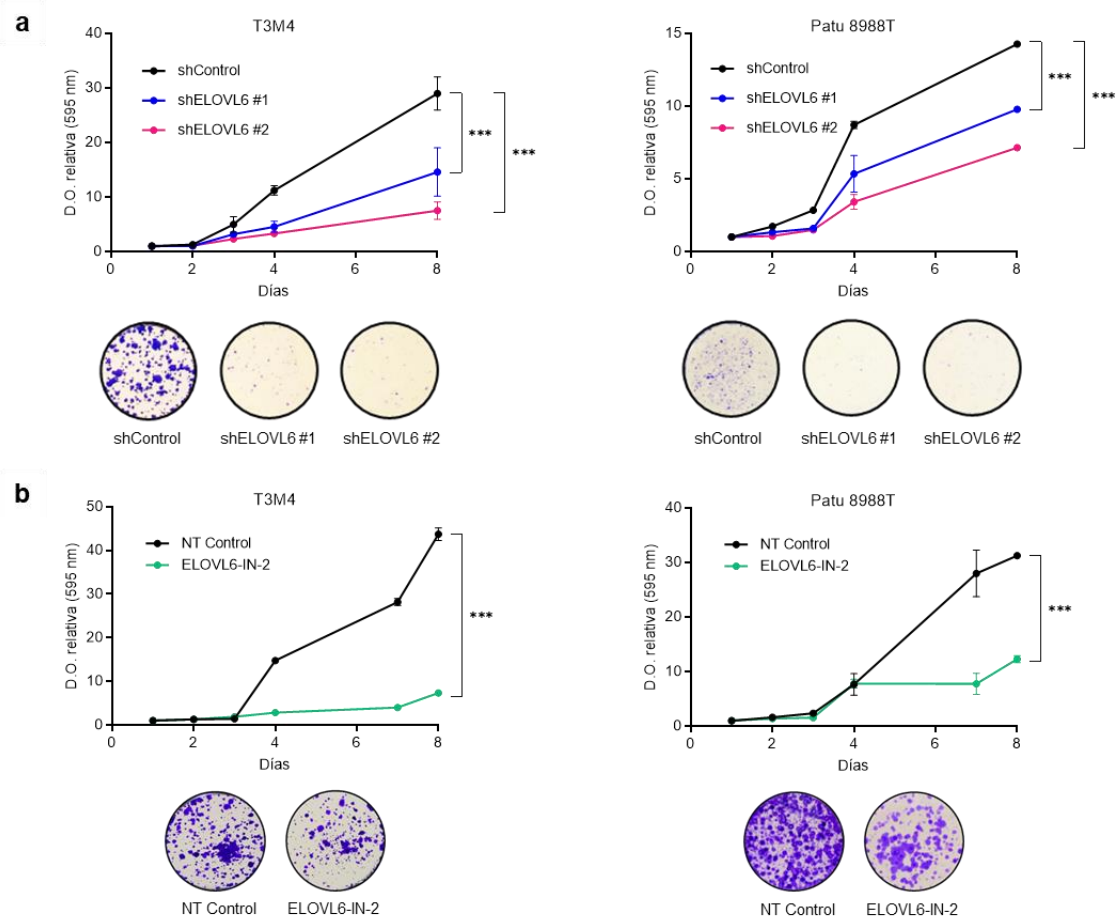


Figura 13. La interferencia de ELOVL6 disminuye la proliferación celular *in vitro*. **a** Ensayos de proliferación y colonias de células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado en líneas celulares de ADP; $n = 3$. **b** Ensayos de proliferación y colonias de células inhibidas para *ELOVL6* en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; $n = 3$. Todos los datos se presentan como media \pm SD; *** $p \leq 0,001$; (a, b) Prueba ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Dunnett (a) o la prueba de Sidak (b).

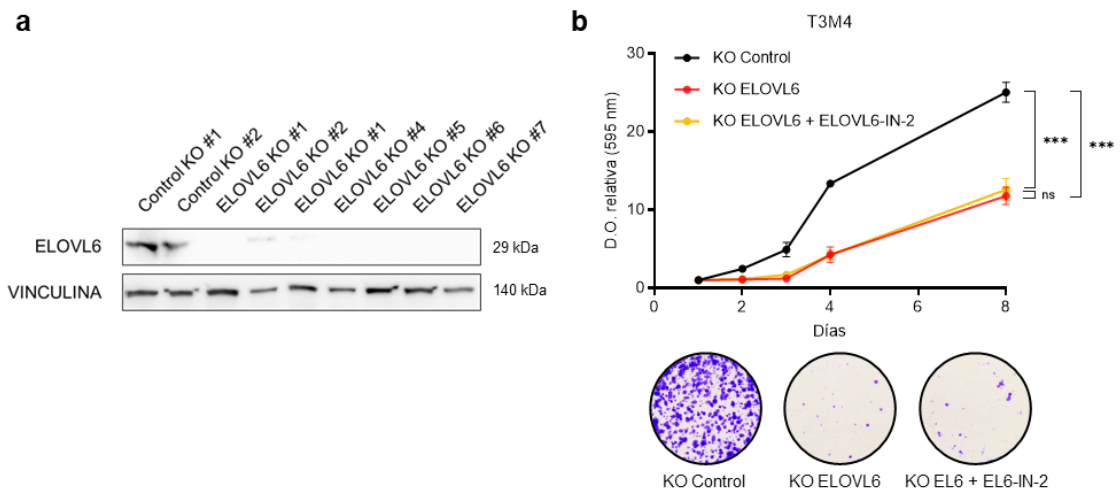


Figura 14. La ablación de ELOVL6 disminuye la proliferación celular *in vitro*. **a** Western blot que muestra el *knockout* de ELOVL6 en T3M4. **b** Ensayos de proliferación y colonias de células *knockout* para ELOVL6 en comparación con el control de CRISPR/Cas9 en T3M4, mostrando la especificidad de ELOVL6-IN-2; n = 3. Todos los datos se presentan como media \pm SD; ns: no estadísticamente significativo, ***p \leq 0,001; (b) Prueba ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Dunnett.

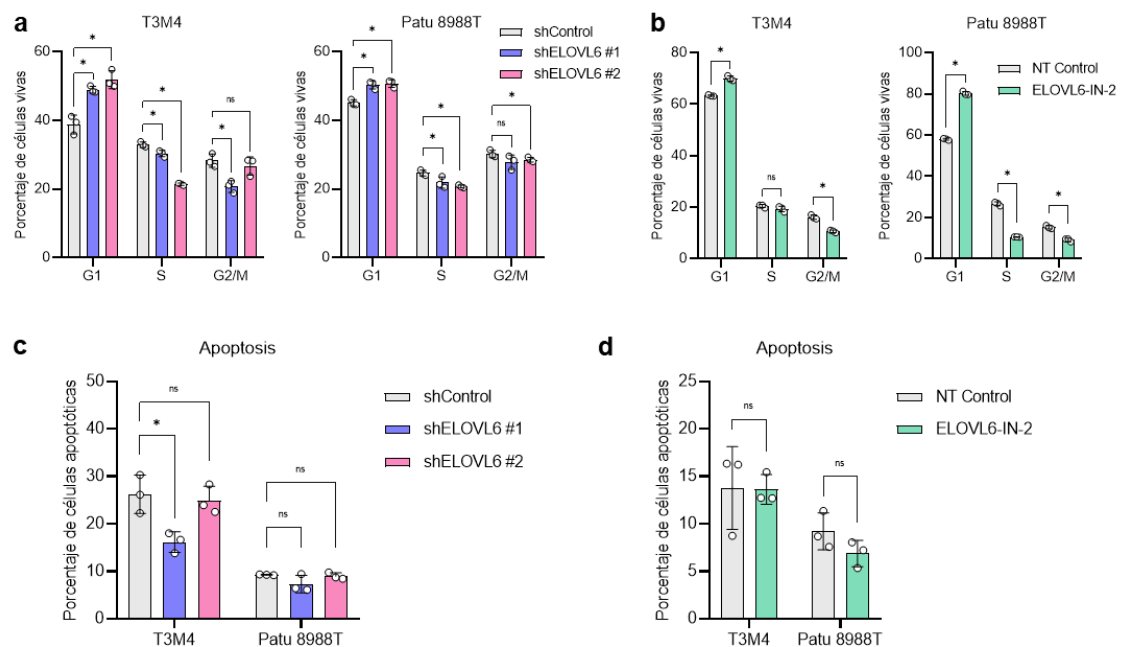


Figura 15. La interferencia de ELOVL6 produce un arresto proliferativo sin reflejar cambios en apoptosis. **a** Ensayo del ciclo celular por FACS de células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado en líneas celulares de ADP; n = 3. **b** Ensayo del ciclo celular por FACS de células inhibidas para ELOVL6 en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; n = 3. **c** Ensayo de apoptosis por FACS de células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado en líneas celulares de ADP; n = 3. **d** Ensayo de apoptosis por FACS de células inhibidas para ELOVL6 en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; n = 3. Todos los datos se presentan como media \pm SD; ns: no estadísticamente significativo, *p \leq 0,05; (a-d) Prueba U de Mann-Whitney.

Estos resultados se confirmaron a nivel transcriptómico. Mediante el análisis por RNA-seq, se exploraron las alteraciones en el transcriptoma resultantes del silenciamiento de *ELOVL6* por shARNs. Este análisis reveló 474 genes expresados diferencialmente (DEGs), ilustrados en el *volcano plot* y el *heatmap* (**Figuras 16a y 16b**), de los cuales 200 DEGs mostraron una bajada de expresión en las muestras silenciadas.

Para dilucidar las implicaciones funcionales de este silenciamiento, se realizó un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (*gene set enrichment analysis*, GSEA). Los resultados indicaron que las células no silenciadas mostraban un mayor enriquecimiento en las rutas "dianas de MYC", "punto de control de G2/M" y "ciclo celular" ("*MYC targets*", "*G2/M checkpoint*" y "*cell cycle*", respectivamente), lo que sugiere que la interferencia conducía al arresto del ciclo celular (**Figuras 16c, 16d y 16e**).

Del mismo modo, se corroboraron estas alteraciones transcriptómicas a través del análisis por RNA-seq de muestras inhibidas para *ELOVL6* mediante el empleo del inhibidor químico *ELOVL6-IN-2*. Este análisis reveló 202 genes expresados diferencialmente (DEGs), ilustrados en el *volcano plot* y el *heatmap* (**Figuras 17a y 17b**), de los cuales 142 DEGs mostraron una bajada de expresión en las muestras inhibidas.

Igualmente, se realizaron los correspondientes GSEAs de estos datos, y los resultados indicaron que, al igual que en la interferencia por shARNs, las células no tratadas mostraban un mayor enriquecimiento en las rutas "dianas de MYC" y "punto de control de G2/M" ("*MYC targets*" y "*G2/M checkpoint*"), corroborando que la inhibición también conducía al arresto del ciclo celular (**Figuras 17c y 17d**).

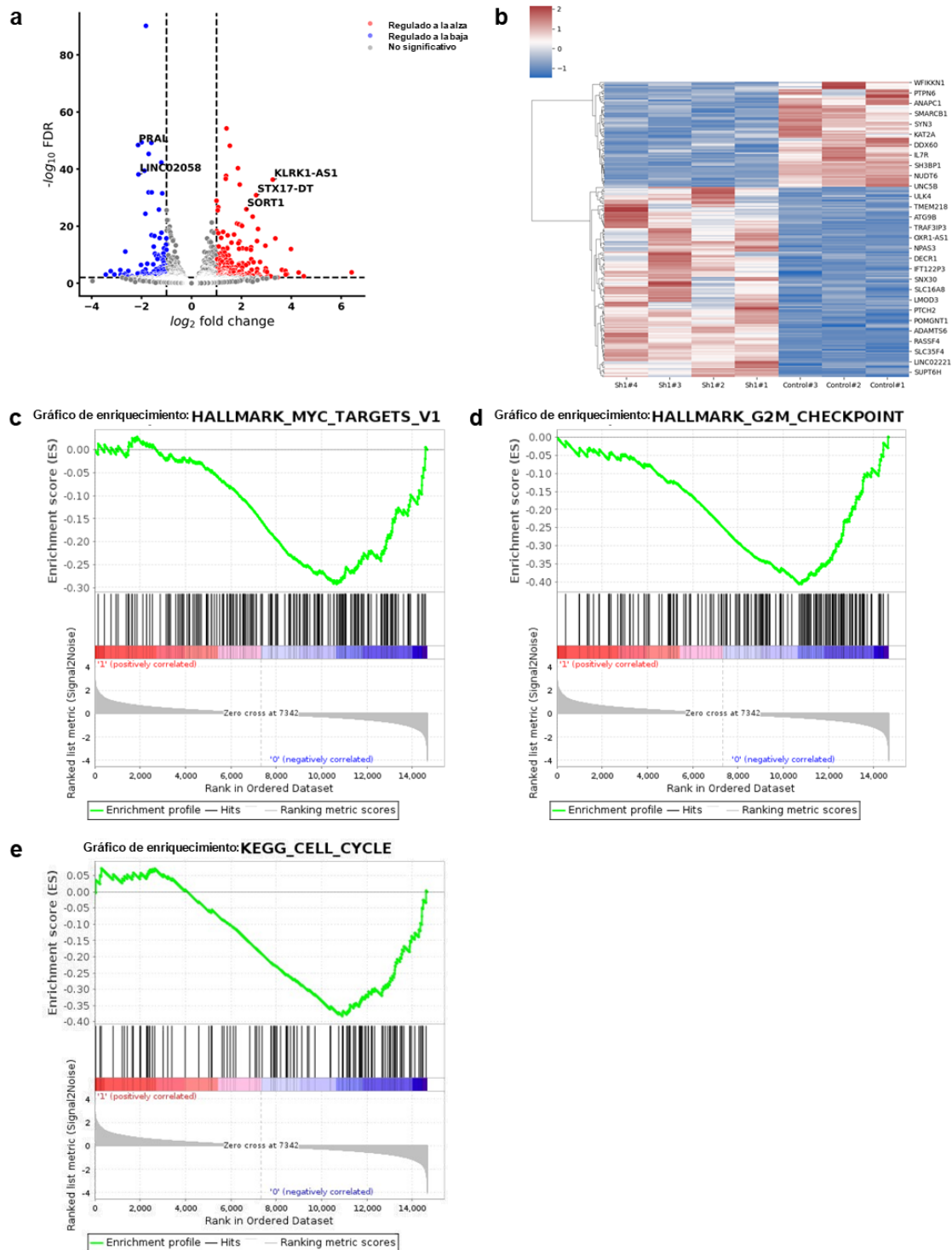


Figura 16. El silenciamiento de *ELOVL6* provoca el arresto del ciclo celular. **a** *Volcano plot* de los DEGs en células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con controles no silenciados en T3M4; cada punto representa un DEG y los puntos coloreados representan DEGs con expresión significativamente aumentada o disminuida; n = 4. **b** *Heatmap* de los DEGs en (16a); la barra de escala muestra los recuentos de genes normalizados por DESeq2 y transformados logarítmicamente. **c** GSEA de las dianas de MYC "*MYC targets hallmarks*". **d** GSEA de los puntos de control de G2/M "*G2/M checkpoint hallmarks*". **e** GSEA del ciclo celular "*cell cycle*".

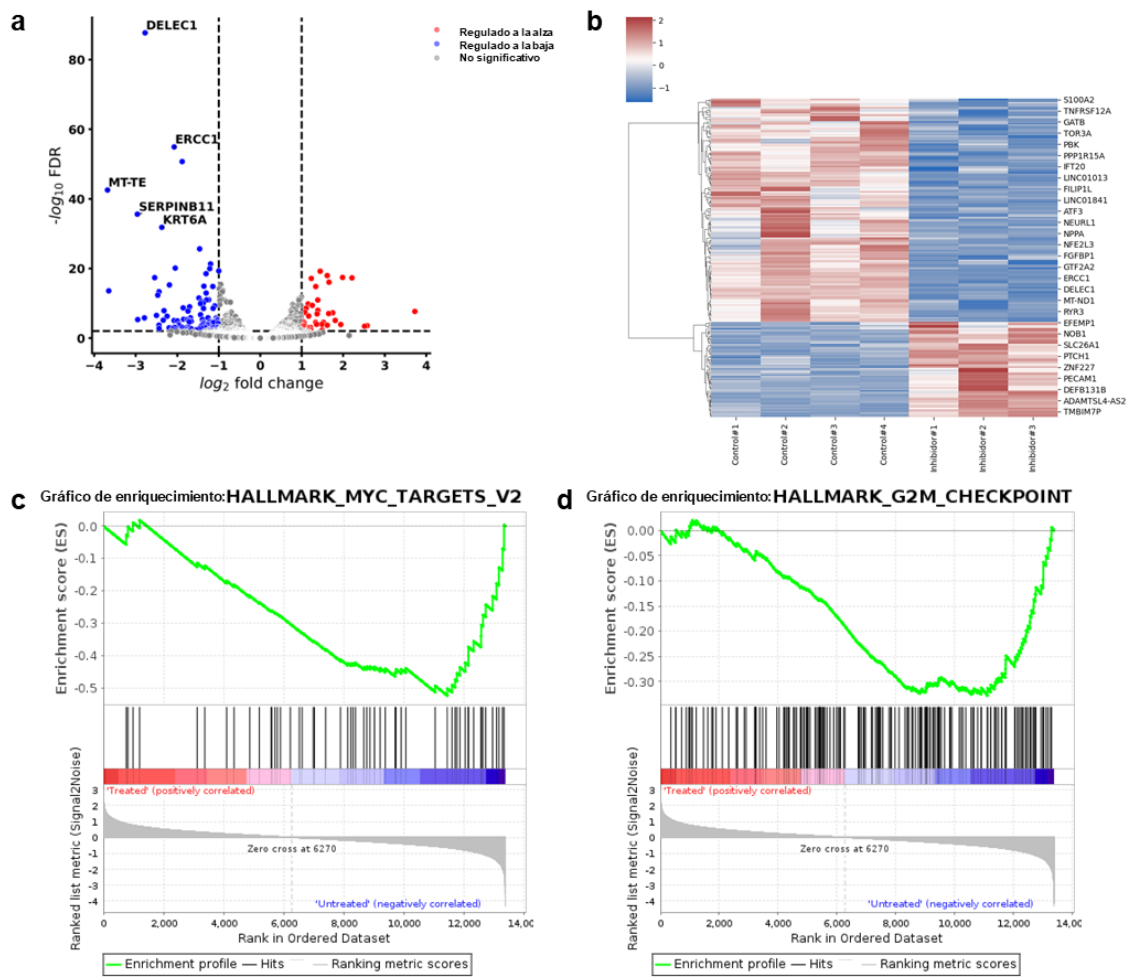


Figura 17. La inhibición de ELOVL6 provoca el arresto del ciclo celular. **a** *Volcano plot* de los DEGs en células inhibidas para ELOVL6 en comparación con controles no tratados en T3M4; cada punto representa un DEG y los puntos coloreados representan DEGs con expresión significativamente aumentada o disminuida; n = 4. **b** *Heatmap* de los DEGs en (17a); la barra de escala muestra los recuentos de genes normalizados por DESeq2 y transformados logarítmicamente. **c** GSEA de las dianas de MYC "*MYC targets hallmarks*". **d** GSEA de los puntos de control de G2/M "*G2/M checkpoint hallmarks*".

Además, se examinaron las firmas asociadas con el metabolismo lipídico y, una vez más, mostraron un enriquecimiento en las células no tratadas, lo que indica una bajada de expresión de los genes de estas rutas debido a la inhibición de ELOVL6 (**Figuras 18a, 18b, 18c, 18d y 18e**).

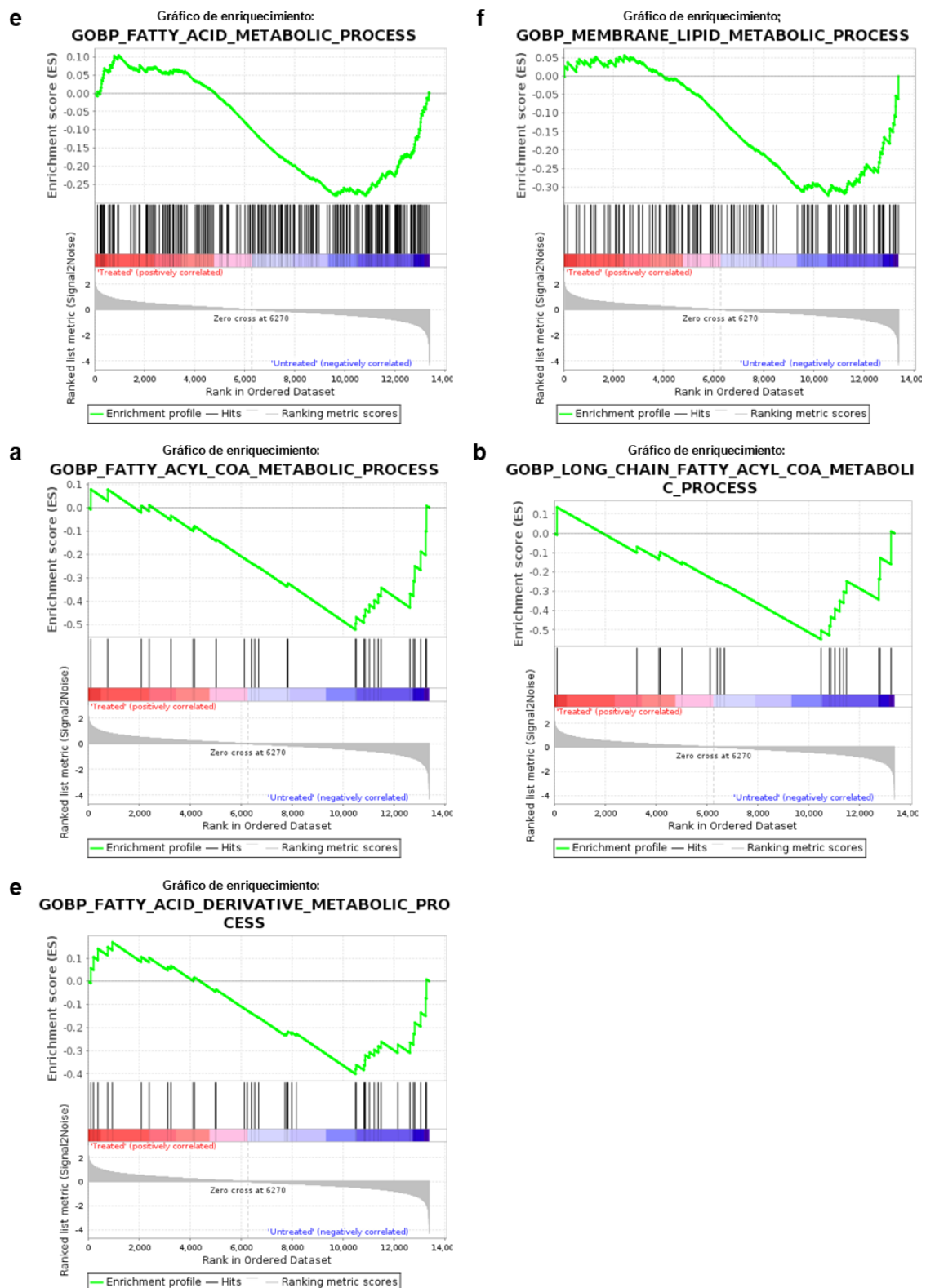


Figura 18. La inhibición de ELOVL6 provoca el silenciamiento del metabolismo lipídico. **a** GSEA del proceso metabólico de los ácidos grasos “*fatty acid metabolic process GOBP*”. **b** GSEA del proceso metabólico de los lípidos de membrana “*membrane lipid metabolic process GOBP*”. **c** GSEA del proceso metabólico de los acilos grasos-CoA “*fatty acyl-CoA metabolic process*”

GOBP". **d** GSEA del proceso metabólico de los acil-CoA de cadena larga "*long-chain fatty acyl-CoA metabolic process GOBP*". **e** GSEA del proceso metabólico de los derivados de ácidos grasos "*fatty acid derivative metabolic process GOBP*".

Con el fin de integrar ambos análisis transcriptómicos, se llevó a cabo el análisis funcional común de los DEGs compartidos por ambos RNA-seqs, resultando en un listado de 21 DEGs solapantes relacionados con las dianas de MYC y los puntos de control de G2/M (**Figuras 19a y 19b**).

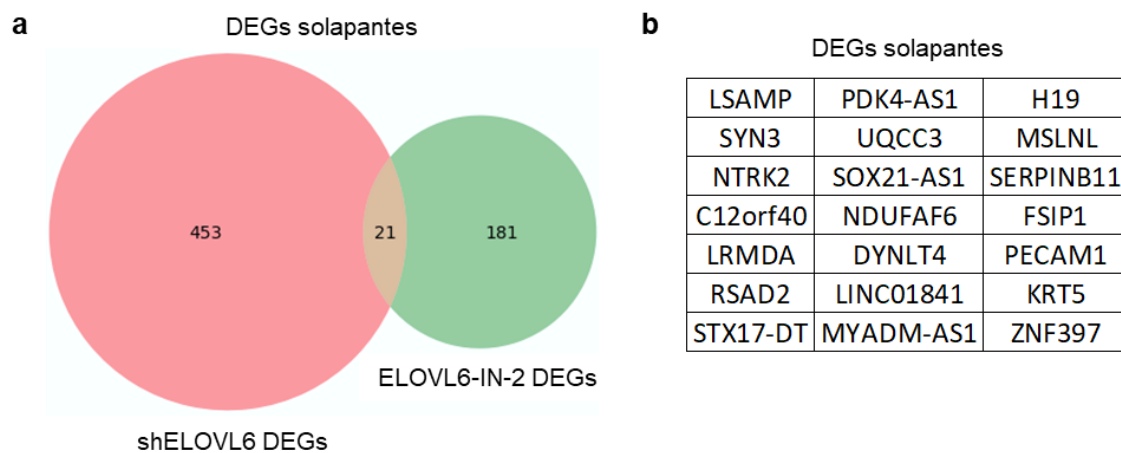


Figura 19. Análisis funcional común de los DEGs compartidos por ambos RNA-seqs. **a** Diagrama de Venn mostrando los genes diferencialmente expresados tras la interferencia de ELOVL6 mediante shARNs o ELOVL6-IN-2, así como los DEGs comunes a ambos RNA-seqs. **b** Lista de genes diferencialmente expresados en ambos RNA-seqs.

Para validar funcionalmente los resultados de RNAseq y determinar qué vías se veían afectadas por la inhibición de ELOVL6, se realizó un array de señalización celular de fosfoquinasas. Se observó una disminución en la activación de vías relacionadas con la proliferación celular como ERK1/2, Src, WNK1, β -Catenina o RSK1/2/3 (**Figuras 20a y 20b**). Para investigar más a fondo las vías afectadas por la inhibición de ELOVL6, realizamos GSEAs centrados en la proliferación celular y las vías de señalización asociadas al receptor del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*, EGFR). Este análisis reveló una regulación a la baja significativa de las firmas asociadas con las vías de señalización relacionadas con EGFR (**Figuras 20c y 20d**), lo que corrobora nuestros hallazgos del array de fosfoquinasas y apoya aún más el papel de ELOVL6 en la modulación de los mecanismos de señalización implicados en la proliferación y el crecimiento celular.

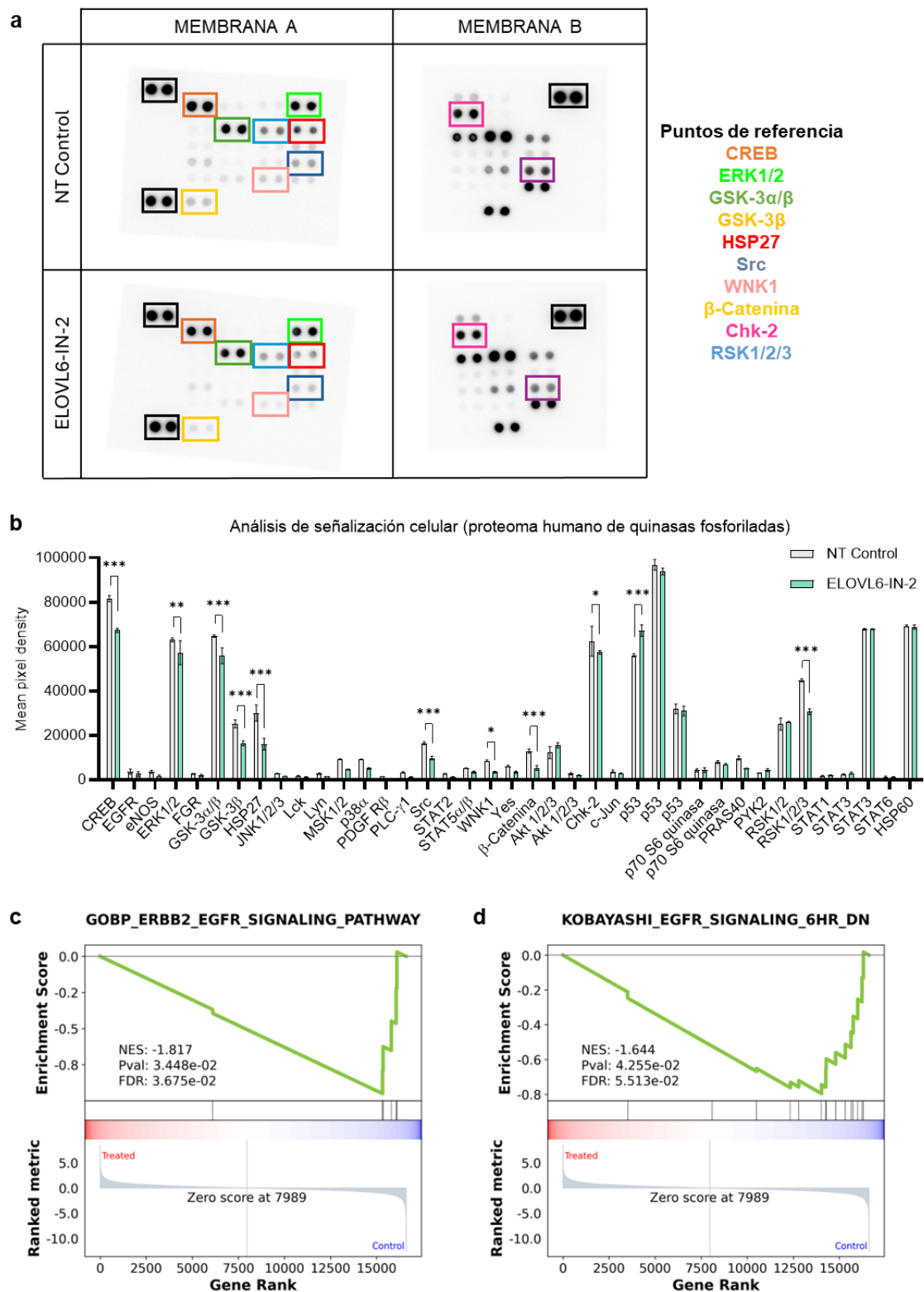


Figura 20. La inhibición de ELOVL6 disminuye la señalización celular. **a** Array de fosfoquinasas del proteoma humano de las células inhibidas para ELOVL6 en comparación con el control no tratado en T3M4; las proteínas resaltadas presentan una diferencia estadísticamente significativa. **b** Disminución de la señalización celular tras la inhibición de ELOVL6. **c** GSEA de

la ruta de señalización ERBB2 EGFR “*GOBP ERBB2 EGFR signaling pathway*”. **d** GSEA de la señalización a 6h DN de EGFR Kobayashi “*Kobayashi EGFR signaling 6hr DN*”. Todos los datos se presentan como media \pm SD; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; (b) Prueba ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Sidak.

Por último, se investigó el impacto de ELOVL6 en la migración celular mediante ensayos de cicatrización de herida (*wound healing*) y *transwell*. El silenciamiento de *ELOVL6* mediante shARNs mostró un impedimento de la migración celular, como lo demuestra el retraso en el cierre de la herida y la reducción de la migración a través del *transwell* (**Figuras 21a y 21b**).

En conjunto, estos resultados refuerzan firmemente el papel fundamental de ELOVL6 en los procesos de proliferación y migración celular, corroborado tanto por el análisis transcriptómico, como por los datos experimentales.

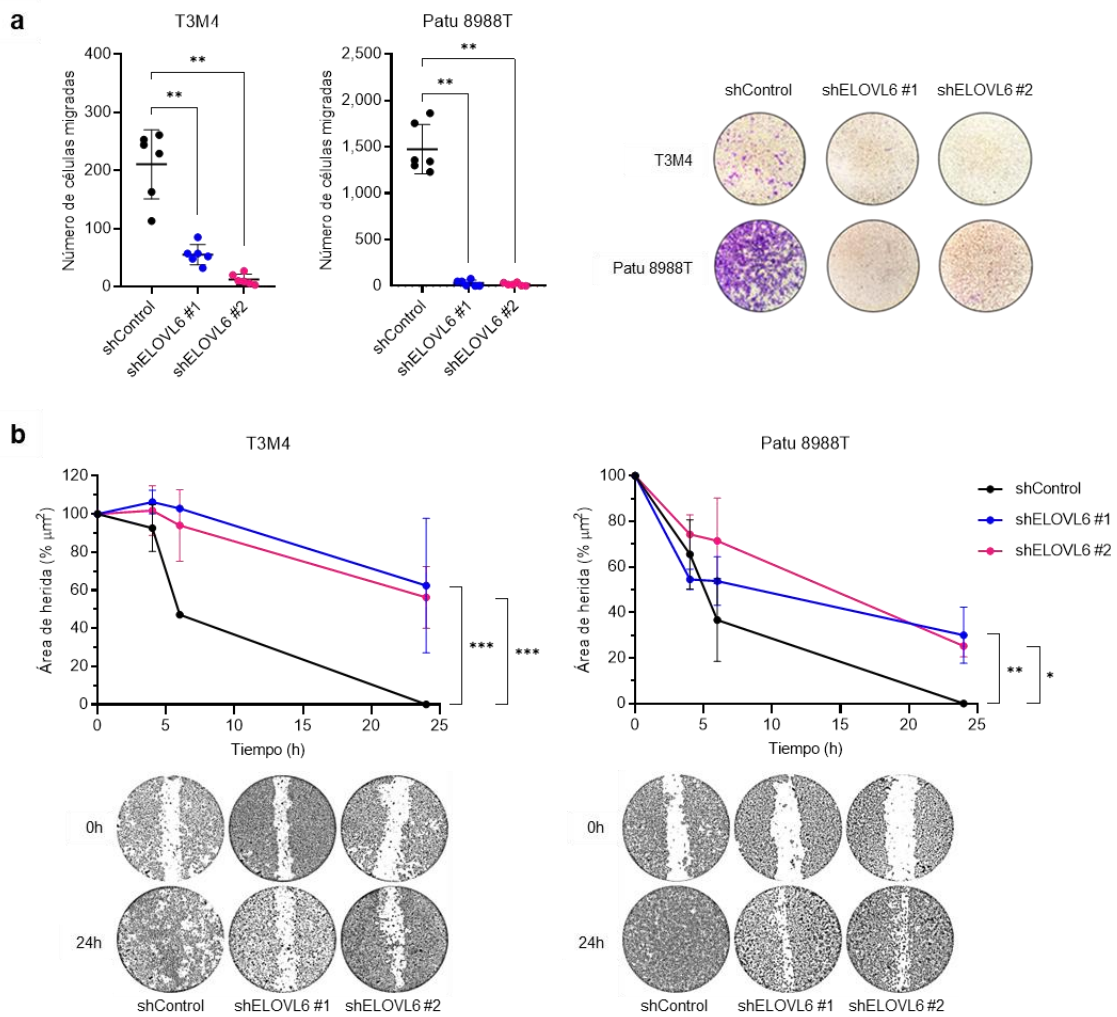


Figura 21. La interferencia de ELOVL6 disminuye la migración celular *in vitro*. **a** Ensayo *transwell* de células silenciadas con ELOVL6 en comparación con el control no dirigido en líneas celulares de ADP; $n = 6$; se muestran imágenes representativas de las superficies *transwell*. **b** Ensayo de cicatrización de herida (*wound healing*) de células silenciadas para ELOVL6 en comparación con el control no silenciado en líneas celulares de ADP; $n = 3$; se muestran imágenes representativas del cierre de heridas. Todos los datos se presentan como media \pm SD; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; (a) Prueba U de Mann-Whitney; (b) Prueba ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Dunnett.

6. La interferencia de ELOVL6 modifica la composición lipídica de la célula

Se hipotetizó que los efectos proliferativos y migratorios observados estaban relacionados con cambios en la composición de las membranas celulares. Para

investigarlo, realizamos un análisis lipidómico centrado en diferentes especies lipídicas mediante espectrometría de masas en células T3M4 inhibidas genética o químicamente para ELOVL6.

Centramos nuestra atención en la fosfatidiletanolamina, un fosfolípido integrante de las membranas biológicas. Sorprendentemente, independientemente de su estado de saturación, delimitado por líneas discontinuas, se observó una acumulación de ácidos grasos más cortos componiendo la fosfatidiletanolamina en las muestras interferidas en comparación con los homólogos control, al mismo tiempo que se apreció una disminución de los ácidos grasos más largos. Este efecto se observó consistentemente con la interferencia de ELOVL6 utilizando tanto shARNs (**Figura 22a**) como el inhibidor químico ELOVL6-IN-2 (**Figura 22b**).

Además, un análisis paralelo de la fosfatidilcolina, otro fosfolípido prevalente en las membranas biológicas, mostró efectos similares (**Figuras 23a y 23b**).

Además, el análisis de la composición total de ácidos grasos, utilizando medio marcado isotópicamente, también confirmó el impacto de la interferencia de ELOVL6, ya sea genética o químicamente, en el metabolismo de los ácidos grasos (**Figuras 24a y 24b**). Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos en el análisis lipidómico.

Para confirmar los resultados observados tras la interferencia de ELOVL6, también se perfiló la composición total de ácidos grasos en T3M4 al reducir su alto nivel de expresión de c-MYC, obteniendo resultados similares al silenciamiento o inhibición de ELOVL6 (**Figuras 25a y 25b**). Del mismo modo, se obtuvieron los resultados opuestos a la interferencia de ELOVL6 y c-MYC cuando se perfiló la composición total de ácidos grasos en Panc1 al aumentar su bajo nivel de expresión de c-MYC (**Figuras 25a y 25b**).

Estos resultados no dejan lugar a dudas de que la interferencia genética o química de ELOVL6 ejerce una profunda influencia en el panorama lipidómico de las células. Esta visión global subraya el papel fundamental de ELOVL6 en el metabolismo lipídico y destaca su importancia en la modulación de la composición de la membrana celular.

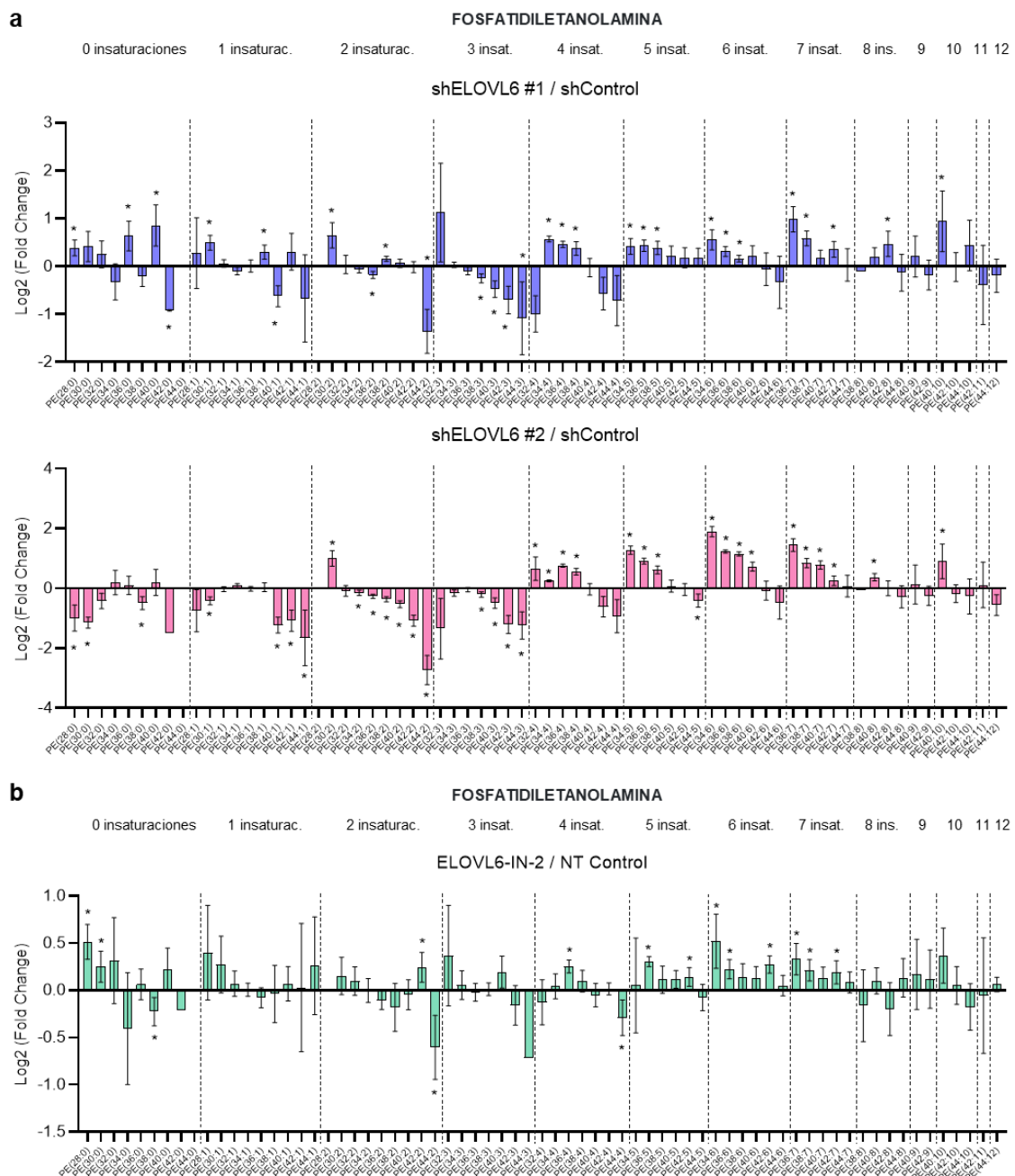


Figura 22. La interferencia de *ELOVL6* modifica la composición lipídica de fosfatidiletanolamina. **a** Análisis lipídico por espectrometría de masas de la fosfatidiletanolamina en células silenciadas para *ELOVL6* comparadas con controles no silenciados en células T3M4; las regiones delimitadas por líneas discontinuas representan ácidos grasos con el mismo estado de saturación y el número de carbonos aumenta a lo largo de cada región; n = 3. **b** Análisis lipídico por espectrometría de masas de la fosfatidiletanolamina en células inhibidas para *ELOVL6* comparadas con controles no tratados en células T3M4; n = 4. Todos los datos se presentan como media \pm SD; * $p \leq 0,05$; (a, b) Prueba T de Student no pareada.

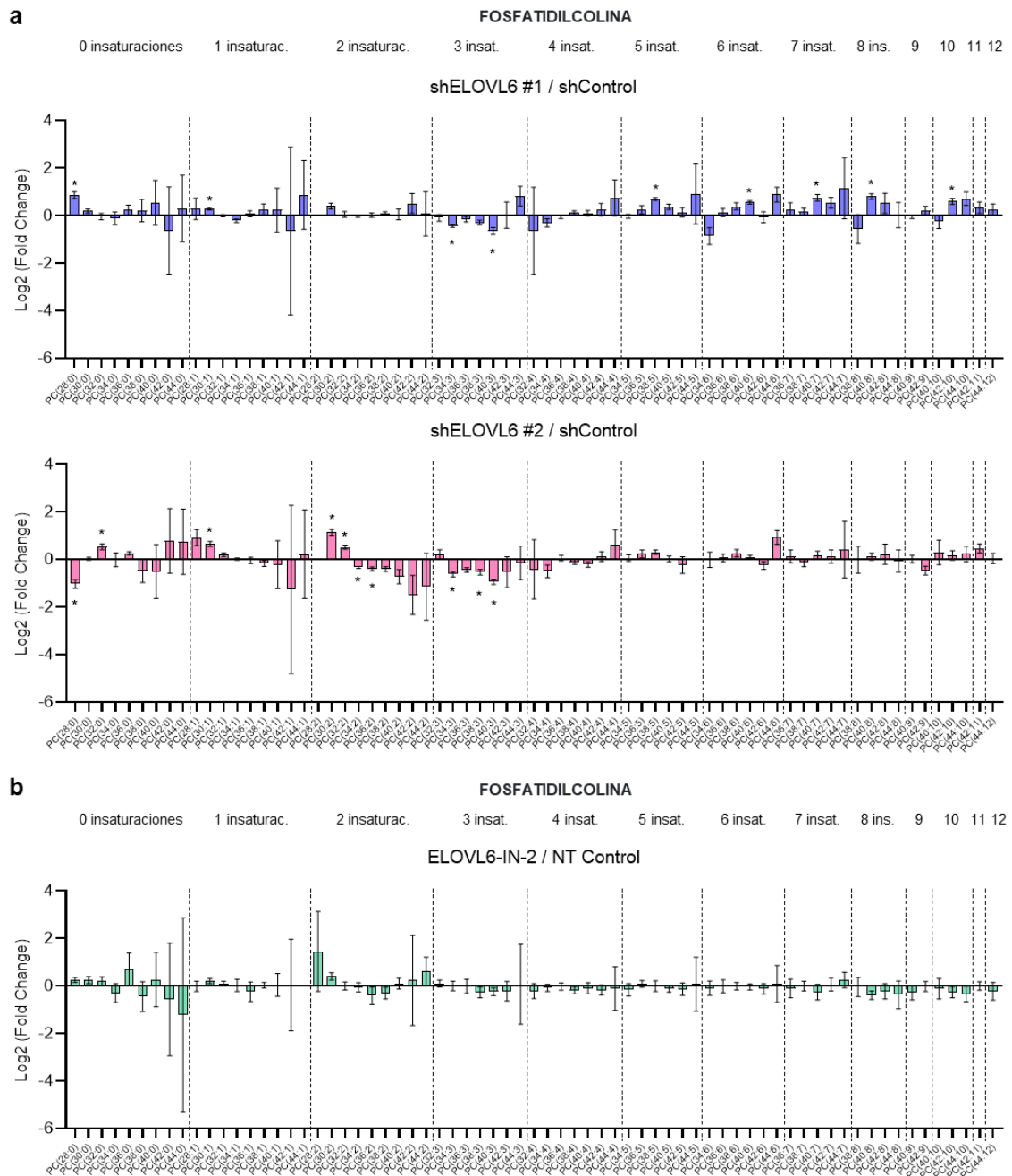


Figura 23. La interferencia de ELOVL6 modifica la composición lipídica de fosfatidilcolina.

a Análisis lipidómico por espectrometría de masas de la fosfatidilcolina en células silenciadas para *ELOVL6* comparadas con controles no silenciados en células T3M4; las regiones delimitadas por líneas discontinuas representan ácidos grasos con el mismo estado de saturación y el número de carbonos aumenta a lo largo de cada región; n = 3. **b** Análisis lipidómico por espectrometría de masas de la fosfatidilcolina en células inhibidas para ELOVL6 comparadas con controles no tratados en células T3M4; n = 4. Todos los datos se presentan como media \pm SD; *p \leq 0,05; (a, b) Prueba T de Student no pareada.

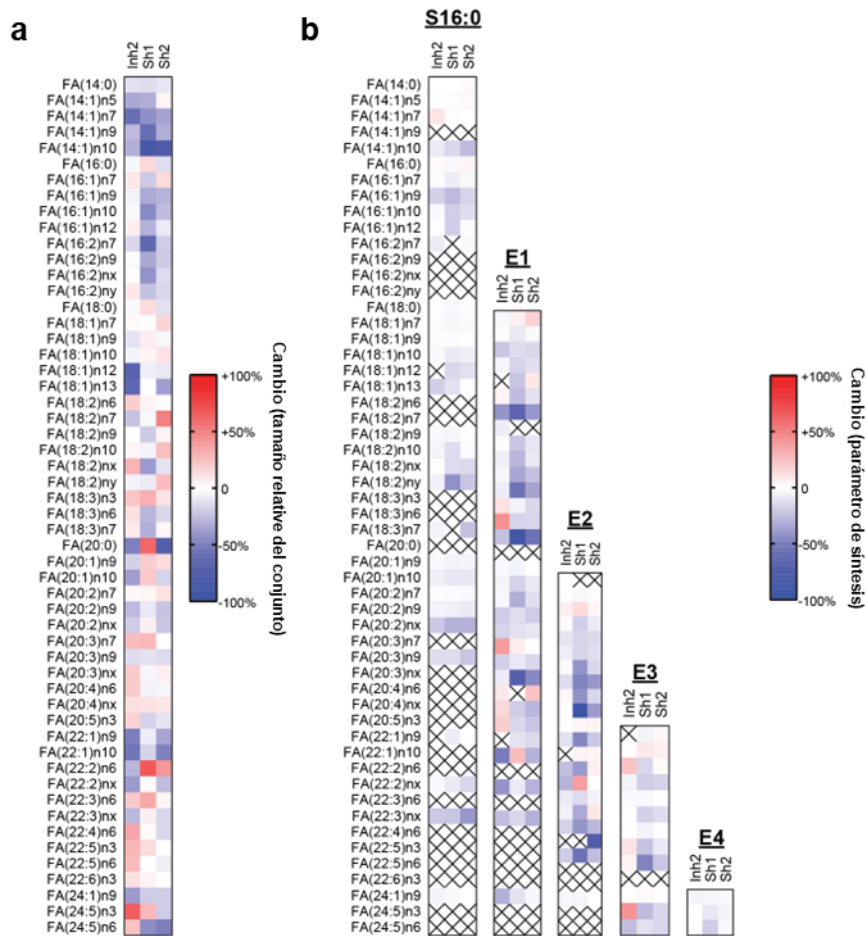


Figura 24. La interferencia de ELOVL6 modifica la composición total de ácidos grasos. a *Heatmap* que muestra, para cada FA detectado, el valor medio del \log_2 fold-change (frente a control no tratado para ELOVL6-IN-2 y frente a control no silenciado para shELOVL6 #1 y shELOVL6 #2) en el tamaño relativo del conjunto. **b** *Heatmap* que muestra el valor medio del \log_2 fold-change (frente a control no tratado para ELOVL6-IN-2 y frente a control no silenciado para shELOVL6 #1 y shELOVL6 #2) para cada FA detectado en los siguientes parámetros: fracción sintetizada endógenamente, S calculado, E1, E2, E3 y E4.

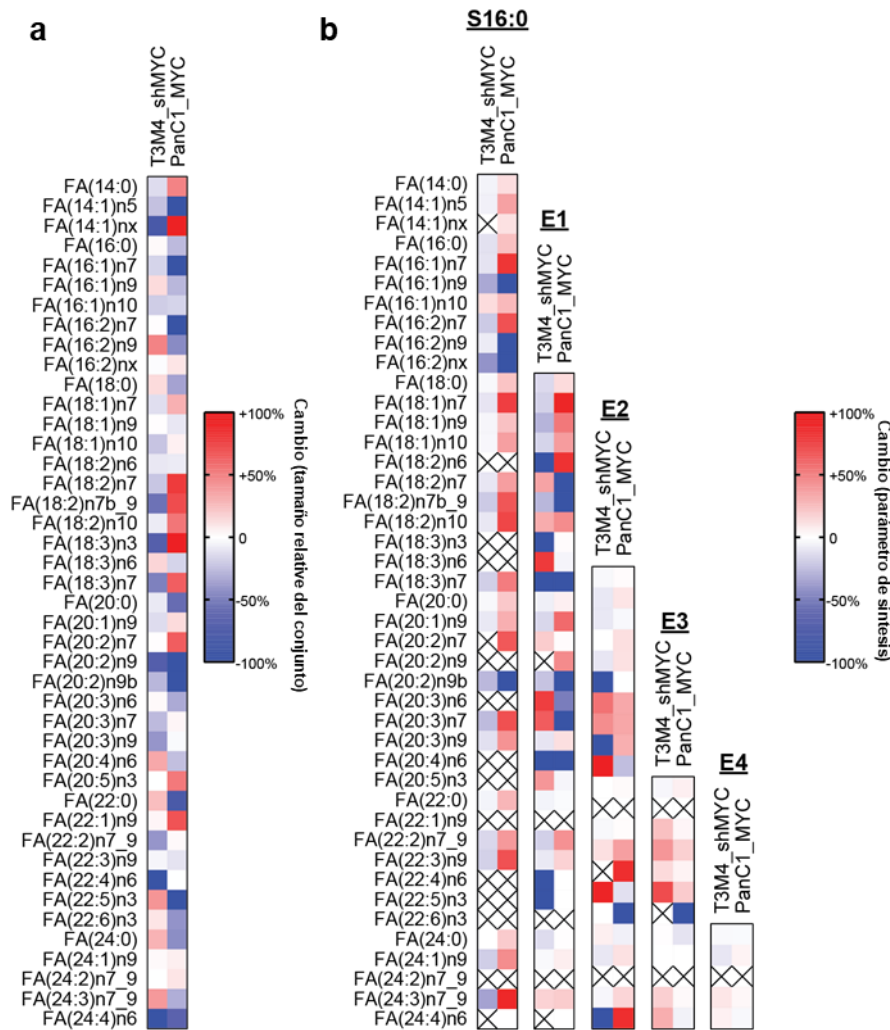


Figura 25. La interferencia de c-MYC modifica la composición total de ácidos grasos. a *Heatmap* que muestra, para cada FA detectado, el valor medio del \log_2 fold-change (frente a control no silenciado para T3M4 shMYC y frente a control no sobre expresado para Panc1 pBP-MYC) en el tamaño relativo del conjunto. **b** *Heatmap* que muestra el valor medio del \log_2 fold-change (frente a control no silenciado para T3M4 shMYC y frente a control no sobre expresado para Panc1 pBP-MYC) para cada FA detectado en los siguientes parámetros: fracción sintetizada endógenamente, S calculado, E1, E2, E3 y E4.

7. La interferencia de ELOVL6 altera las propiedades mecánicas de la membrana y su permeabilidad

Investigamos si la disminución de los ácidos grasos que componen los fosfolípidos detectada provocaba una reducción del grosor de la membrana celular y su resistencia.

Para evaluar el grosor de la membrana, se empleó microscopía electrónica de transmisión (MET) y observamos una notable disminución en dicho espesor cuando se silenciaba *ELOVL6* mediante shARNs en las células T3M4 y Patu 8988T (**Figuras 26a y 26b**).

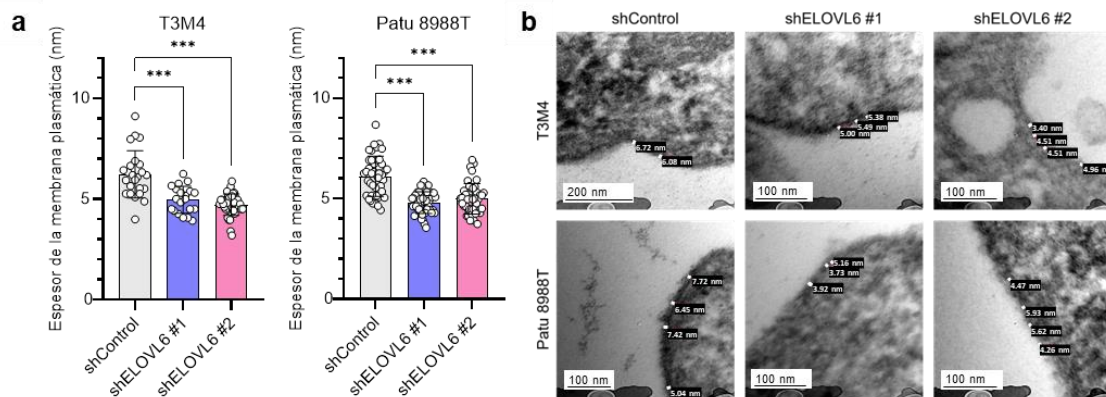


Figura 26. La interferencia de ELOVL6 reduce el grosor de la membrana plasmática. a Medición del grosor de la membrana celular en imágenes de microscopía electrónica de transmisión en células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado; $n = 3$ por condición. **b** Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión de células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado. Todos los datos se presentan como media \pm SD; $***p \leq 0,001$; (a) Prueba ANOVA ordinaria de una vía seguida de la prueba de Dunnett.

Para estimar las propiedades mecánicas de la membrana celular, se empleó espectroscopia de oscilación en experimentos de célula única mediante microscopía de vídeo con lapso de tiempo (*time-lapse*), realizando una descomposición de Fourier de las formas ecuatoriales. Se ilustró el espectro colectivo estático (tipo Helfrich) resultante de las formas deformables de las células, de modo que este espectro representa la dependencia del promedio de las deformaciones cuadradas de la muestra (**Figura 27a**).

Los espectros correspondientes a la interferencia de *ELOVL6*, ya sea genética o química, aparecen por encima de sus respectivos controles, indicando un comportamiento más flexible y una mayor variabilidad en la forma celular (**Figuras 27b, 27c y 27d**). Centrándonos en el tercer modo normal y aplicando a cada célula la relación mencionada anteriormente, podemos extraer un valor efectivo para la tensión de membrana en los grupos experimentales. Del mismo modo, observamos diferencias significativas entre ambas interferencias y sus respectivos controles, demostrando que el silenciamiento o inhibición de *ELOVL6* da lugar a un comportamiento más flexible (**Figura 27e**).

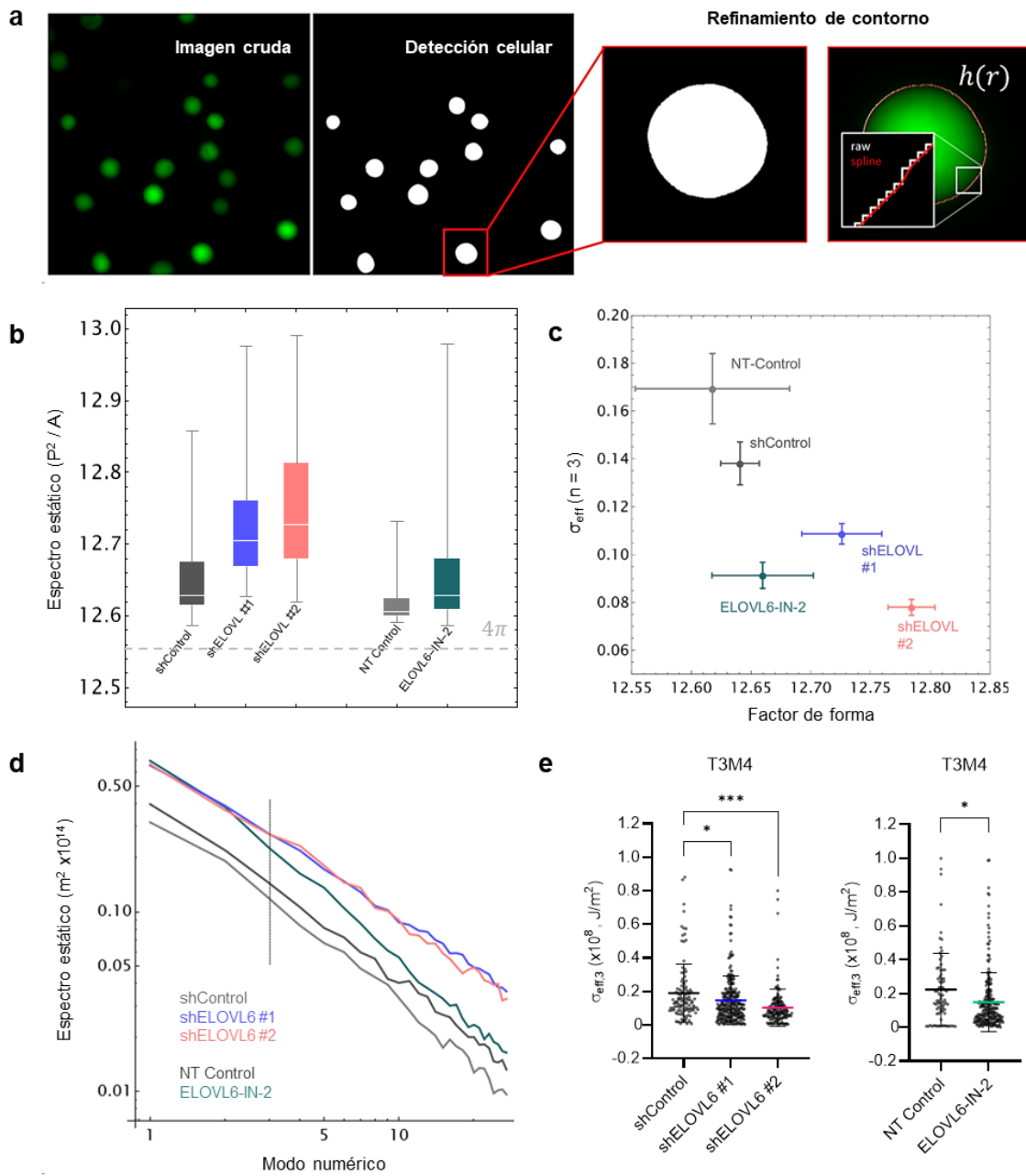


Figura 27. La interferencia de ELOVL6 altera las propiedades mecánicas de la membrana.

a Descripción del razonamiento computacional utilizado para la estimación de la rigidez de la membrana; las imágenes brutas de microscopía de fluorescencia se rectifican para el ruido y finalmente se binarizan; los componentes morfológicos resultantes se seleccionan por su tamaño medio y circularidad, de tal forma que las imágenes analizadas correspondan a una muestra homogénea al 50%; los contornos brutos se refinan utilizando una interpolación BSpline y luego se transforman a coordenadas polares. **b** La variabilidad de la forma de la superficie celular se analiza en términos de exceso de superficie (factor de forma, P^2/A) y auto-deformabilidad de la membrana, y finalmente se interpreta en términos de tensión superficial efectiva mediante la evaluación de la amplitud de Fourier para el vector de onda del tercer modo ecuatorial (k) en el

régimen dominado por la tensión. **c** Valores promediados del factor de forma y la tensión superficial efectiva para los grupos experimentales. **d** Espectros estáticos tipo Helfrich estimados a partir de fluctuaciones espaciales colectivas para diferentes configuraciones experimentales, en función del número de modo del vector de onda en escala log-log. **e** Tensión superficial efectiva para el valor del número de onda en el régimen dominado por la tensión; $n = 3$. Todos los datos se presentan como media \pm SD; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; (e) Prueba T de Student no pareada.

Por último, decidimos investigar la rigidez de la membrana frente al estrés normal y la permeabilidad bajo una deformación cortical inducida mediante técnicas de indentación tras la interferencia de ELOVL6, ya fuera a través de su silenciamiento por shARNs o de su inhibición por ELOVL6-IN-2. Nuestros resultados revelaron una reducción significativa de la rigidez de la membrana tras la interferencia de ELOVL6, lo que demuestra un efecto tangible sobre las propiedades mecánicas de la membrana celular (**Figura 28a**).

Adicionalmente, observamos un aumento simultáneo de la permeabilidad de la membrana, lo que indica un cambio notable en las características funcionales de la misma, aunque el efecto sólo fue evidente con el silenciamiento por shARNs (**Figura 28b**).

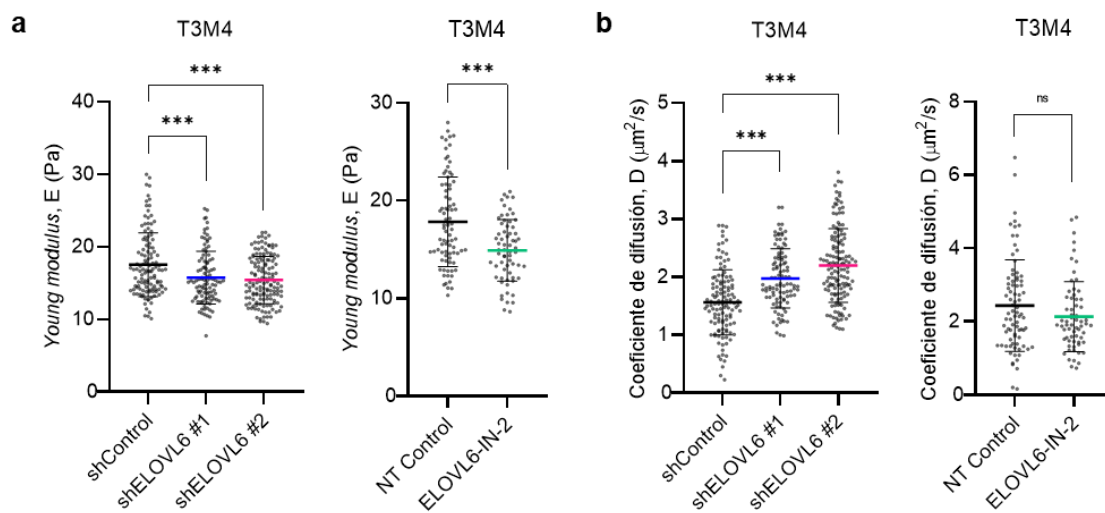


Figura 28. La interferencia de ELOVL6 disminuye la rigidez de la membrana plasmática y aumenta su permeabilidad. **a** Experimentos de indentación que muestran la rigidez de la membrana (E, elasticidad, Pa). **b** Experimentos de indentación que muestran la permeabilidad de la membrana (D, difusividad, $\mu\text{m}^2/\text{s}$). Todos los datos se presentan como media \pm SD; ns: no significativo estadísticamente, *** $p \leq 0,001$; (a, b) Prueba ANOVA ordinaria de una vía seguida de la prueba de Dunnett; (a, b) Prueba T de Student no pareada.

Para investigar más a fondo si todas estas alteraciones en la composición de la membrana y sus propiedades mecánicas se correlacionaban con un aumento de la permeabilidad de la misma, realizamos ensayos de captación de calceína en las líneas celulares T3M4 y Patu 8988T. El éster calceína-acetoximetil (calceína-AM), es un compuesto no fluorescente que penetra en la célula atravesando su membrana de forma pasiva y, una vez dentro, las esterasas lo reducen a calceína, produciendo el compuesto fluorescente calceína (**Figura 29a**).

Los resultados demostraron un drástico aumento en la captación de calceína al interferir ELOVL6 utilizando shARNs (**Figuras 29b y 29c**) y ELOVL6-IN-2 (**Figuras 29d y 29e**). Cabe destacar además que no se observaron cambios en la expulsión de calceína (**Figuras 29f y 29g**), lo que indica que el aumento en la captación de calceína no se atribuye a una menor expulsión del fármaco por las células, sino más bien a una mayor entrada del mismo.

Los mismos resultados se obtuvieron en lo relativo a la captación y expulsión de calceína en el *knockout* de ELOVL6, demostrándose además nuevamente la especificidad del inhibidor ELOVL6-IN-2 (**Figuras 30a y 30b**).

Estos resultados sugieren un papel crucial de ELOVL6 en la regulación de la permeabilidad y las propiedades mecánicas de la membrana, destacando sus implicaciones potenciales en la modulación de procesos celulares asociados tanto a la rigidez como a la permeabilidad.

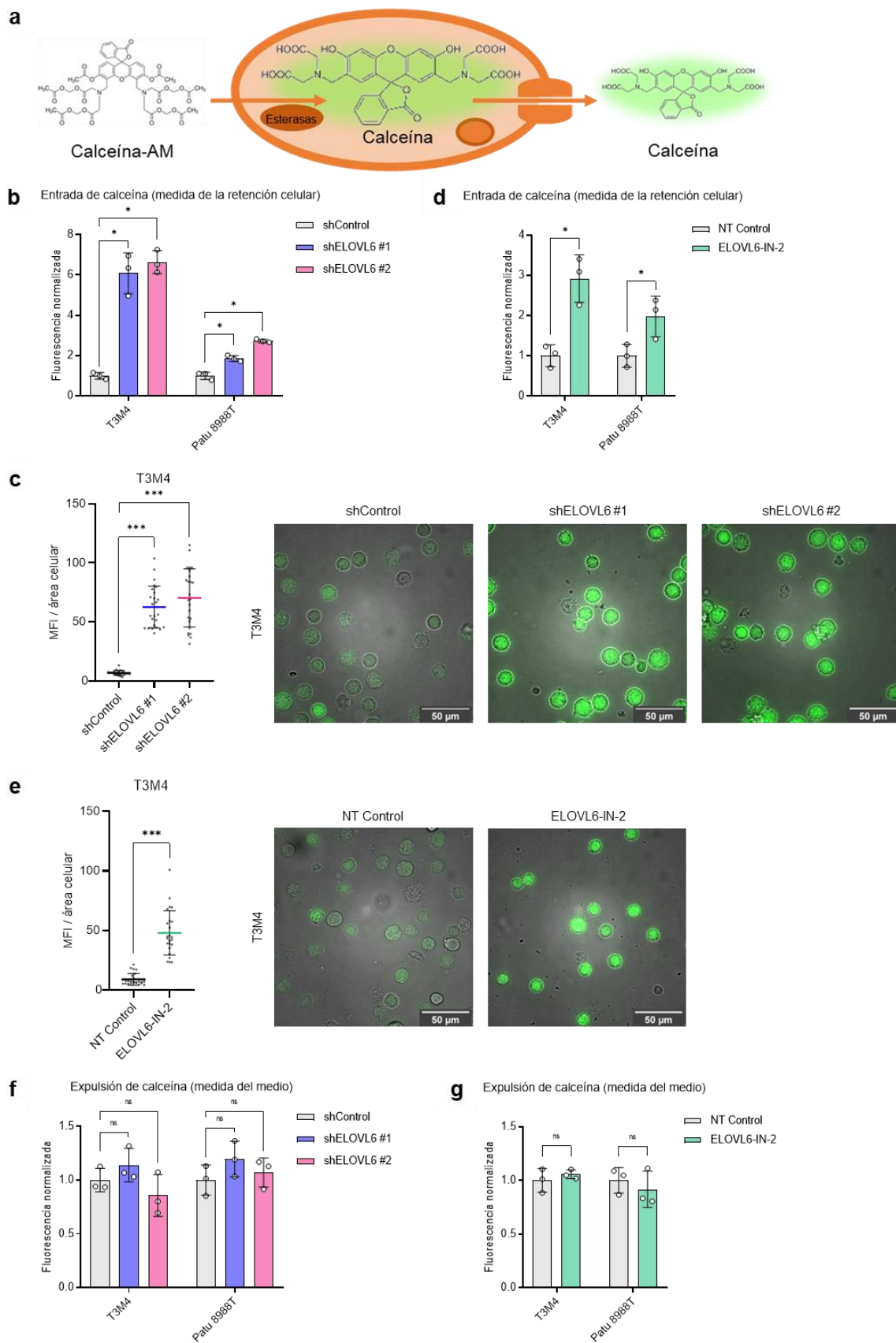


Figura 29. La interferencia de ELOVL6 aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática. **a** Esquema de los mecanismos de entrada y expulsión de calceína. **b** Captación de calceína-AM normalizada y procesamiento a calceína en células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado en líneas celulares de ADP; medición de la retención intracelular; n = 3. **c** Cuantificación e imágenes representativas de la tinción de inmunofluorescencia para la captación de calceína (verde) en células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado en T3M4; n = 3 por condición. **d** Captación de calceína-AM normalizada y procesamiento a calceína en células inhibidas para ELOVL6 en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; medición de la retención intracelular; n = 3. **e** Cuantificación e imágenes representativas de la tinción de inmunofluorescencia para la captación de calceína (verde) en células inhibidas para ELOVL6 en comparación con el control no tratado en T3M4; n = 3 por condición. **f** Expulsión de calceína normalizada en células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado en líneas celulares de ADP; medición de medios; n = 3. **g** Expulsión de calceína normalizada en células inhibidas para ELOVL6 en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; medición de medios; n = 3. Todos los datos se presentan como media \pm SD; ns: no estadísticamente significativo, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$; (c) Prueba ANOVA ordinaria de una vía seguida de la prueba de Dunnett; (e) Prueba T de Student no pareada; (b, d, f, g) Prueba de Mann-Whitney.

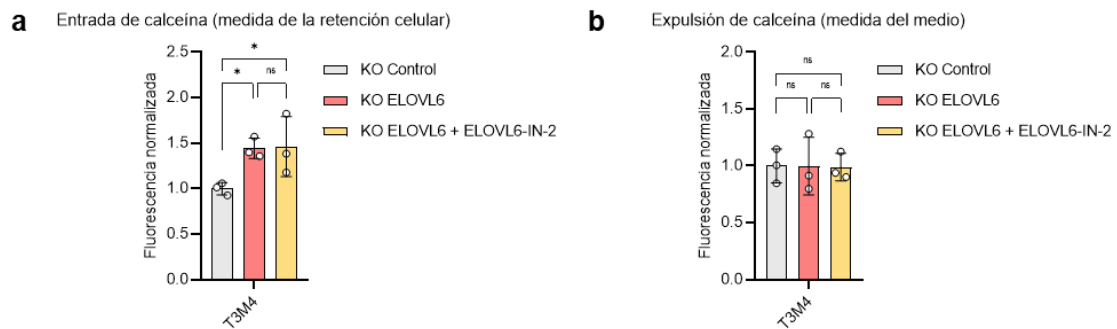


Figura 30. La ablación de ELOVL6 aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática. **a** Captación de calceína-AM normalizada y procesamiento a calceína en células *knockout* para ELOVL6 en comparación con el control de CRISPR/Cas9 en T3M4; medición de la retención intracelular; n = 3. **b** Expulsión de calceína normalizada en células *knockout* para ELOVL6 en comparación con el control de CRISPR/Cas9 en T3M4; medición de medios; n = 3. Todos los datos se presentan como media \pm SD; ns: no estadísticamente significativo, * $p \leq 0,05$; (a, b) Prueba de Mann-Whitney.

8. La interferencia de ELOVL6 favorece la pinocitosis

Uno de los principales fármacos quimioterapéuticos para el adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) es el paclitaxel. Como se ha mencionado anteriormente, en su formulación unido a nanopartículas de albúmina (nab-paclitaxel), comercializado bajo el nombre de Abraxane, el paclitaxel penetra en las células tumorales empleando pinocitosis como mecanismo de entrada. En consecuencia, se examinó tanto la micro como la macropinocitosis en T3M4 y Patu 8988T, utilizando dextrano-rodamina B con pesos moleculares de 10.000 Da y 70.000 Da, respectivamente.

La interferencia de ELOVL6, ya sea a través de shARNs o ELOVL6-IN-2, dio lugar a un aumento de la micropinocitosis, como indica la señal de dextrano-rodamina B 10.000 Da (**Figura 31a**). Este hallazgo fue corroborado por análisis de inmunofluorescencia y su correspondiente cuantificación (**Figuras 31b y 31c**).

Además, la macropinocitosis, medida por la señal de dextrano-rodamina B 70.000 Da, también se vio aumentada (**Figura 32a**), hecho confirmado a su vez mediante inmunofluorescencia y su cuantificación (**Figuras 32b y 32c**).

Por último, la ablación de ELOVL6 tuvo un efecto similar al evaluar tanto la micro como la macropinocitosis, demostrándose además de nuevo que el inhibidor ELOVL6-IN-2 es específico de esta elongasa (**Figuras 33a y 33b**).

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la interferencia de ELOVL6 ejerce un profundo impacto en la elongación de ácidos grasos, lo que en última instancia conduce a un aumento de la permeabilidad de la membrana celular.

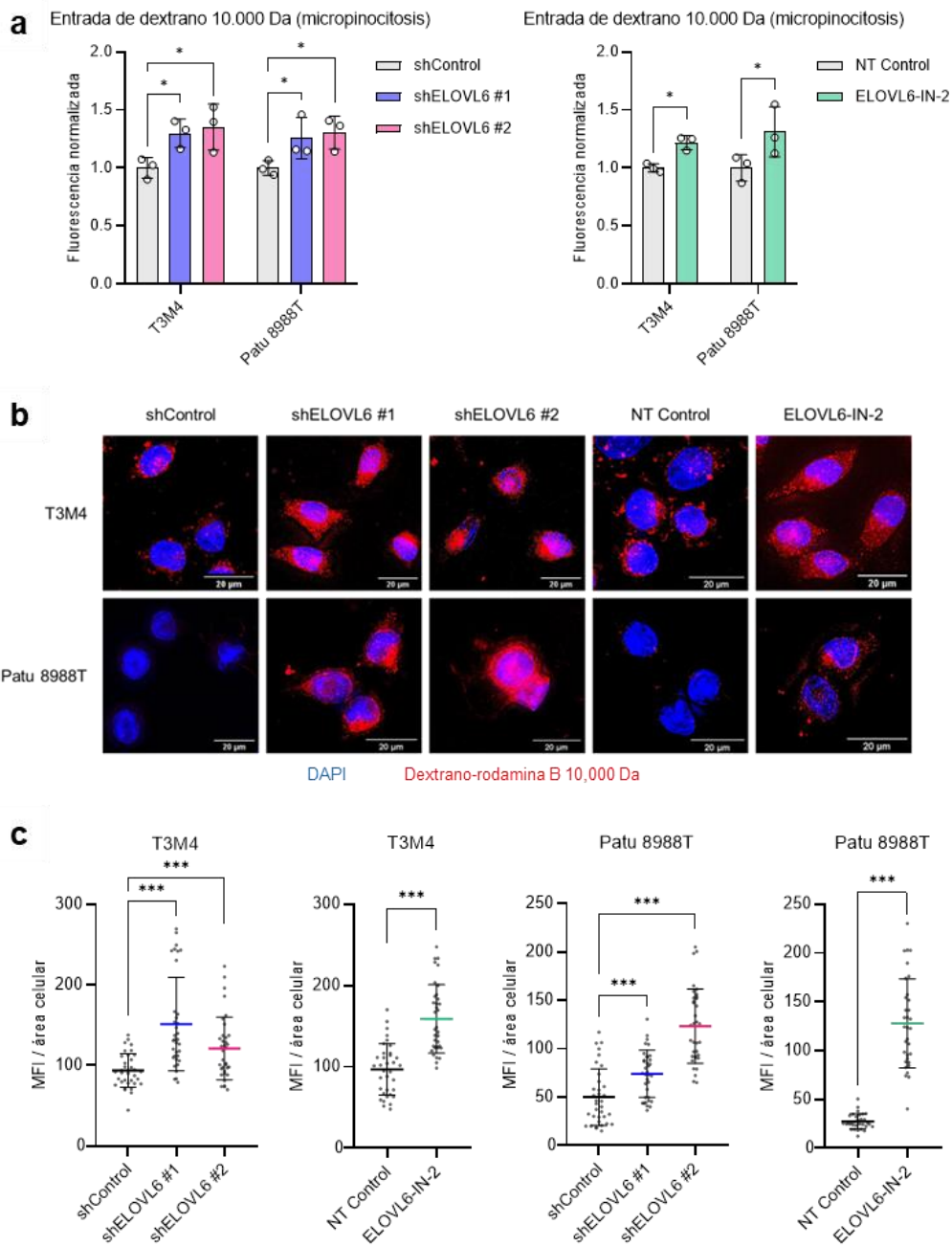


Figura 31. La interferencia de ELOVL6 aumenta la micropinocitosis. **a** Análisis de la micropinocitosis mediante fluorescencia normalizada de dextrano-rodamina B 10.000 Da incorporada por células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado y células inhibidas para *ELOVL6* en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; n = 3 por condición. **b** Imágenes representativas de la tinción de inmunofluorescencia para dextrano-rodamina B 10.000 Da (rojo) y DAPI (azul) en líneas celulares de ADP. **c** Cuantificación de la tinción de inmunofluorescencia de micropinocitosis; n = 5 por condición. Todos los datos se presentan como media \pm SD; * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$; (a) Prueba de Mann-Whitney; (c) Prueba ANOVA ordinaria de una vía seguida de la prueba de Dunnett; (c) Prueba T de Student no pareada.

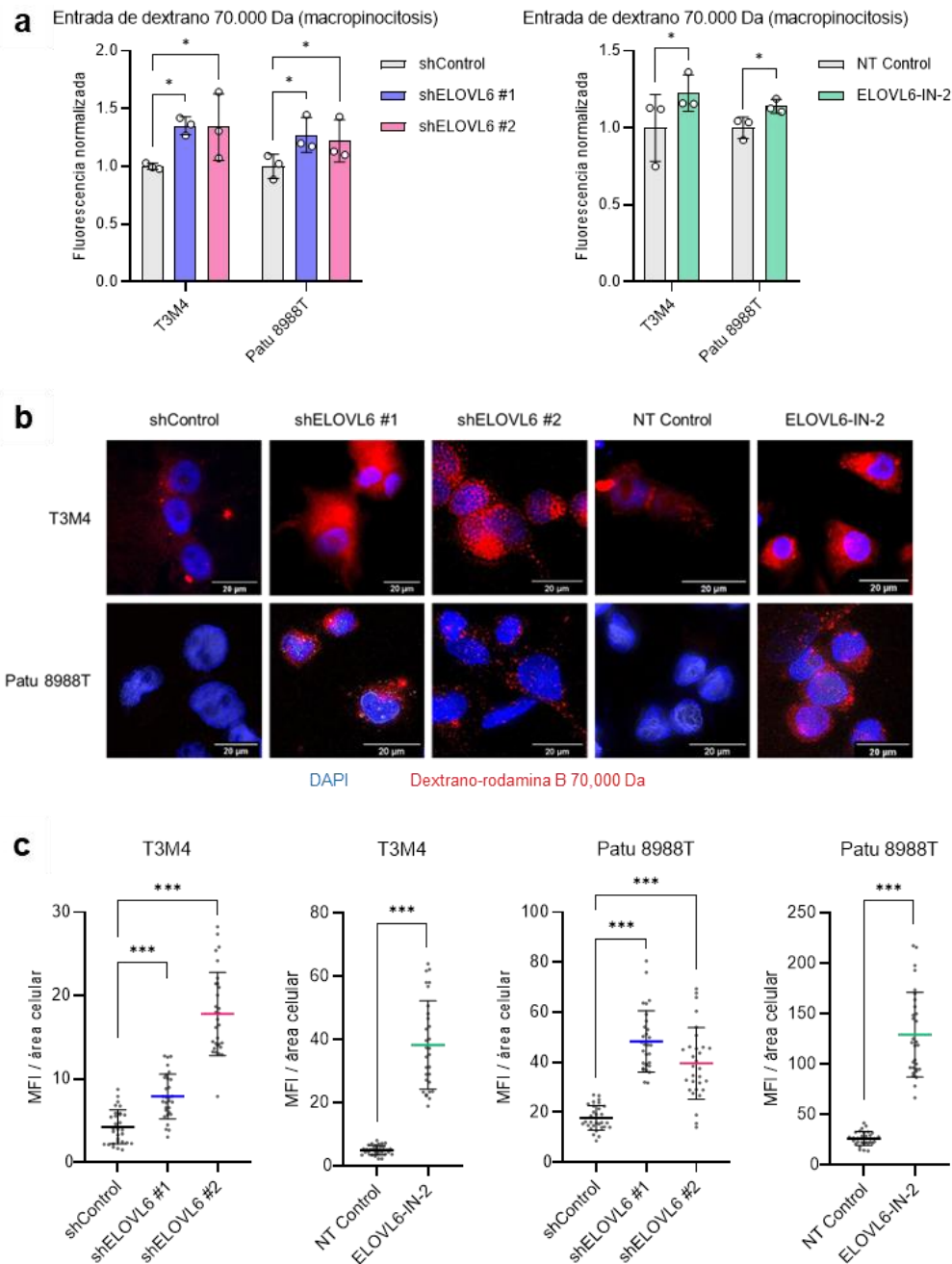


Figura 32. La interferencia de ELOVL6 aumenta la macropinocitosis. **a** Análisis de la macropinocitosis mediante fluorescencia normalizada de dextrano-rodamina B 70.000 Da incorporada por células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado y células inhibidas para *ELOVL6* en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; $n = 3$ por condición. **b** Imágenes representativas de la tinción de inmunofluorescencia para dextrano-rodamina B 70.000 Da (rojo) y DAPI (azul) en líneas celulares de ADP. **c** Cuantificación de la tinción de inmunofluorescencia de macropinocitosis; $n = 5$ por condición. Todos los datos se presentan como media \pm SD; * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$; (a) Prueba de Mann-Whitney; (c) Prueba ANOVA ordinaria de una vía seguida de la prueba de Dunnett; (c) Prueba T de Student no pareada.

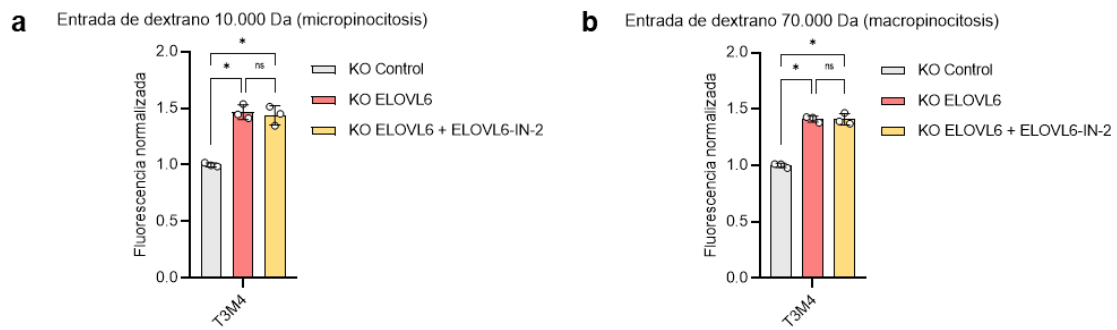


Figura 33. La ablación de ELOVL6 aumenta la pinocitosis. **a** Análisis de la micropinocitosis mediante fluorescencia normalizada de dextrano-rodamina B 10.000 Da incorporada por células *knockout* para ELOVL6 en comparación con el control de CRISPR/Cas9 en T3M4; n = 3 por condición. **a** Análisis de la macropinocitosis mediante fluorescencia normalizada de dextrano-rodamina B 70.000 Da incorporada por células *knockout* para ELOVL6 en comparación con el control de CRISPR/Cas9 en T3M4; n = 3 por condición. Todos los datos se presentan como media \pm SD; ns: no estadísticamente significativo, * $p \leq 0,05$; (a) Prueba de Mann-Whitney.

9. La interferencia de ELOVL6 sensibiliza a la quimioterapia *in vitro*

Para evaluar el impacto del aumento de la permeabilidad y la pinocitosis, y los cambios en las propiedades mecánicas de las membranas observados, en el tratamiento con Abraxane en líneas celulares de ADP, se midió la entrada de Flutax-2. Este compuesto es un derivado del taxol verde y fluorescente que, al igual que el taxol, se une a los microtúbulos de las células, marcándolos fluorescentemente. Al interferir ELOVL6 utilizando tanto shARNs (**Figura 34a**) como ELOVL6-IN-2 (**Figura 34b**), se observó un fuerte marcaje en las células T3M4 y Patu 8988T.

Del mismo modo, la ablación genética por *knockout* de ELOVL6 condujo a los mismos resultados, demostrando una vez más la especificidad de ELOVL6-IN-2 (**Figura 34c**).

Esto sugiere que la interferencia de ELOVL6 mejora la captación de Abraxane en estas líneas celulares de ADP.

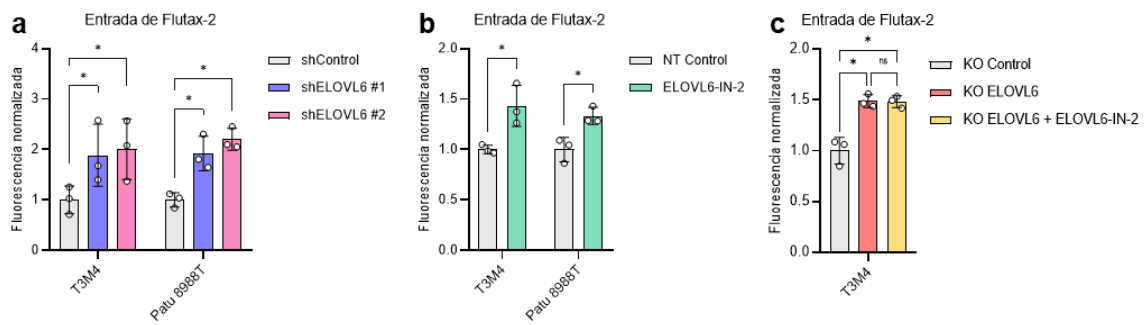


Figura 34. La interferencia de ELOVL6 mejora la captación de quimioterapia *in vitro*. **a** Captación normalizada de Flutax-2 en células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado en líneas celulares de ADP; n = 3. **b** Captación normalizada de Flutax-2 en células inhibidas para *ELOVL6* en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; n = 3. **c** Captación normalizada de Flutax-2 en células *knockout* para *ELOVL6* en comparación con el control de CRISPR/Cas9 en T3M4; n = 3 por condición. Todos los datos se presentan como media \pm SD; * $p \leq 0,05$; (a-c) prueba de Mann-Whitney.

A continuación, para explorar si la interferencia de *ELOVL6* podía sinergizar con el tratamiento con Abraxane, calculamos la IC₅₀ de este fármaco para las líneas celulares T3M4 y Patu 8988T. Posteriormente, se comprobó que, tanto el silenciamiento de *ELOVL6* por shARNs como la inhibición de *ELOVL6* por *ELOVL6*-IN-2, redujeron significativamente las IC₅₀ de Abraxane (**Figuras 35a y 35b**).

En conjunto, estos hallazgos revelan que la interferencia de *ELOVL6* sinergiza con el tratamiento con Abraxane, ofreciendo una nueva perspectiva terapéutica mediante la combinación de quimioterapia con la inhibición de *ELOVL6*. Esta sinergia tiene el potencial de aumentar la eficacia o la utilización de dosis más bajas de Abraxane, minimizando así los efectos secundarios de este tratamiento.

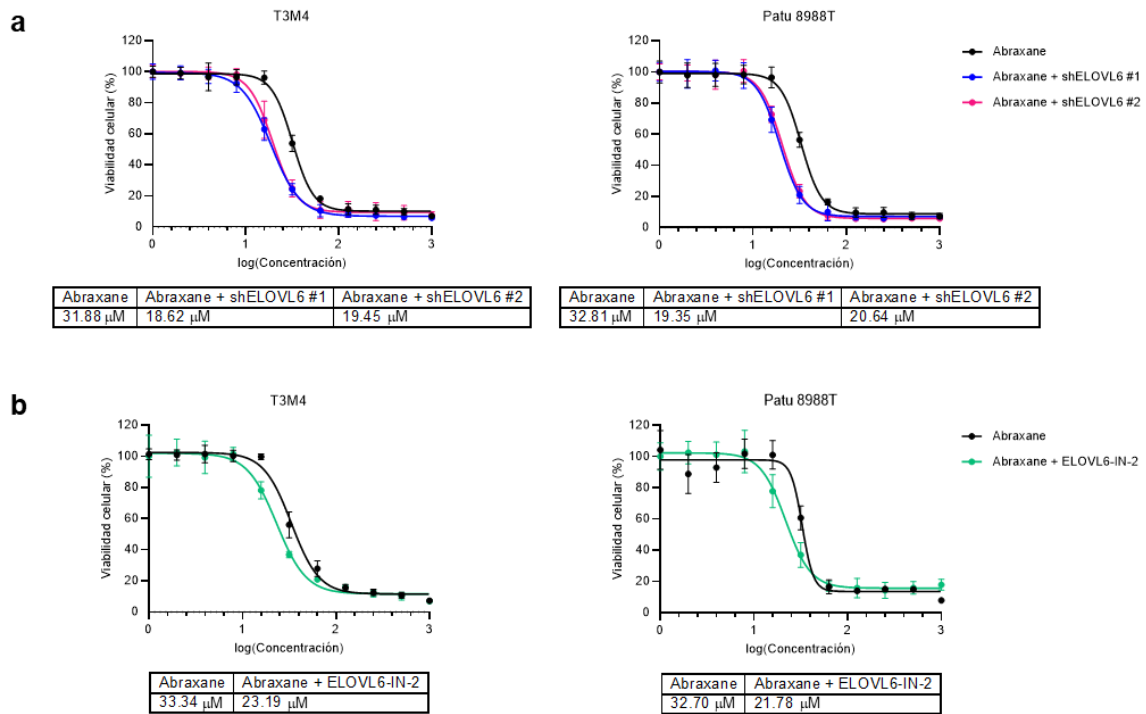


Figura 35. La interferencia de ELOVL6 sensibiliza a la quimioterapia *in vitro*. **a** Análisis y valores de IC₅₀ de Abraxane utilizando ATPlite en células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado en líneas celulares de ADP; n = 6. **b** Análisis y valores de IC₅₀ de Abraxane utilizando ATPlite en células inhibidas para *ELOVL6* en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; n = 6. Todos los datos se presentan como media \pm SD.

10. La eficacia de la interferencia de ELOVL6 es dependiente de los niveles de expresión de *c-MYC*

Cuando se silenció *ELOVL6* en las células Panc1, la línea celular con bajos niveles de *c-MYC* y *ELOVL6*, se observaron resultados *in vitro* similares a los obtenidos con T3M4 y Patu 8988T. La disminución de los niveles tanto de ARNm como de proteína (**Figuras 36a y 36b**), condujo a una reducción de la proliferación y de la formación de colonias (**Figura 36c**), una acumulación de células en la fase G1 del ciclo celular (**Figura 36d**), una disminución de la migración en *transwells* (**Figura 36e**) y un impedimento en la cicatrización de heridas (**Figura 36f**). Sin embargo, nuestras evaluaciones de la captación de compuestos revelaron que la interferencia de *ELOVL6* en Panc1 no aumentaba la permeabilidad celular en un contexto de baja expresión de *c-MYC*.

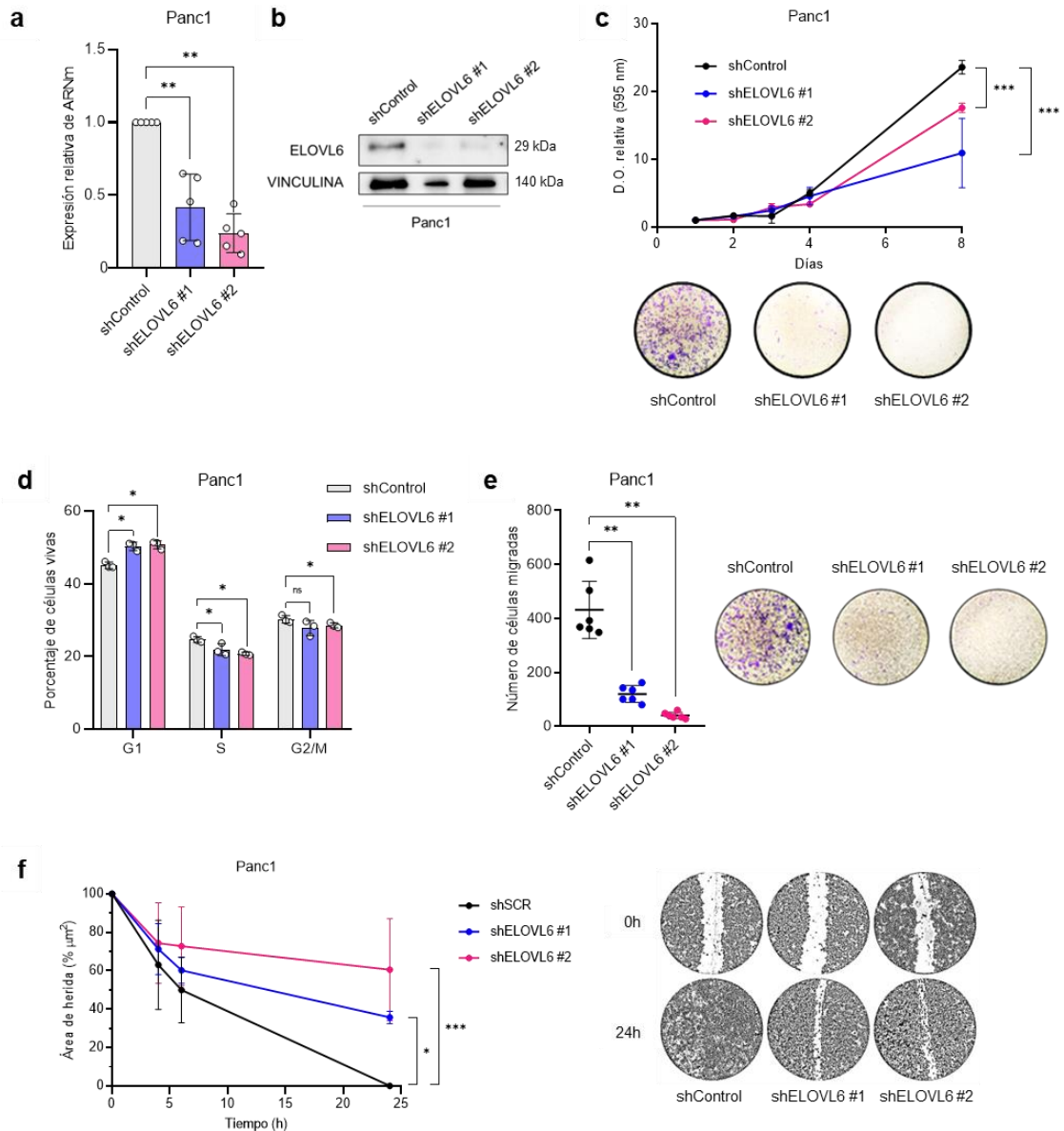


Figura 36. La interferencia de ELOVL6 disminuye la proliferación y migración celular *in vitro* en Panc1. **a** Silenciamiento de la expresión de ARNm de *ELOVL6* en Panc1; la expresión génica se normaliza respecto a *HPRT* y shControl; n = 5 por genotipo y línea celular. **b** Western blot que muestra el silenciamiento de *ELOVL6* en Panc1. **c** Ensayos de proliferación y colonias de células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado en Panc1; n = 3. **d** Ensayo de ciclo celular por FACS de células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado en Panc1; n = 3. **e** Ensayo de *transwell* de células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado en Panc1; n = 6; se muestran imágenes representativas de las superficies *transwell*. **f** Ensayo de cicatrización de heridas de células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado en Panc1; n = 3; se muestran imágenes representativas del cierre de heridas. Todos los datos se presentan como media \pm SD; ns: no estadísticamente significativo, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; (a, d, e) Prueba de Mann-Whitney; (c, f) Prueba ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Dunnett.

Para investigar si esta ausencia de efecto se atribuía a los bajos niveles de c-MYC en Panc1, la línea celular de ADP con menor expresión de c-MYC, procedimos a sobre expresar c-MYC en Panc1 (**Figuras 10c y 10d**) y realizamos análisis proliferativos. Curiosamente, se observó que las células Panc1-pBH-Myc mostraban una mayor proliferación y formación de colonias en comparación con las células Panc1-pBH (**Figuras 37c, 37d, 37e y 37f**). Además, el análisis de la composición total de ácidos grasos utilizando medio marcado isotópicamente también confirmó un aumento del metabolismo de los ácidos grasos tras la sobreexpresión de c-MYC (**Figuras 25a y 25b**).

Además, tras la interferencia de ELOVL6 utilizando shARNs (**Figura 37a**) o ELOVL6-IN-2, observamos que las células Panc1-pBH-MYC silenciadas o inhibidas experimentaban un arresto proliferativo más pronunciado (**Figuras 37c y 37d**) y una incapacidad total para formar colonias en comparación con sus controles (**Figuras 37e y 37f**). Se podía intuir mediante estos resultados que los efectos de la interferencia de ELOVL6 dependían de la dependencia del eje c-MYC/ELOVL6 en las células de ADP (**Figura 37b**).

Significativamente, el impacto fue aún más evidente al evaluar la permeabilidad celular. En las células Panc1-pBH-MYC, detectamos que la interferencia de ELOVL6 utilizando shARNs o ELOVL6-IN-2 causaba un aumento de la permeabilidad, medida en términos de captación de calceína (**Figura 38a**). Dicha interferencia se reflejó además en un aumento de la micro y la macropinocitosis (**Figuras 38b y 38c**). Por último, se observó una mayor entrada del análogo quimioterápico Flutax-2 (**Figura 38d**). Notablemente, estos efectos en la permeabilidad no se observaron cuando se interfirió ELOVL6 en células Panc1-pBH, las cuales no son tan dependientes del eje c-MYC/ELOVL6 como sus homólogas Panc1-pBH-MYC.

Colectivamente, estos resultados subrayan que los efectos de la interferencia de ELOVL6 en la permeabilidad de la membrana celular están intrínsecamente ligados a los niveles de c-MYC y ELOVL6 en la célula, resaltando la dependencia del tumor del eje c-MYC/ELOVL6.

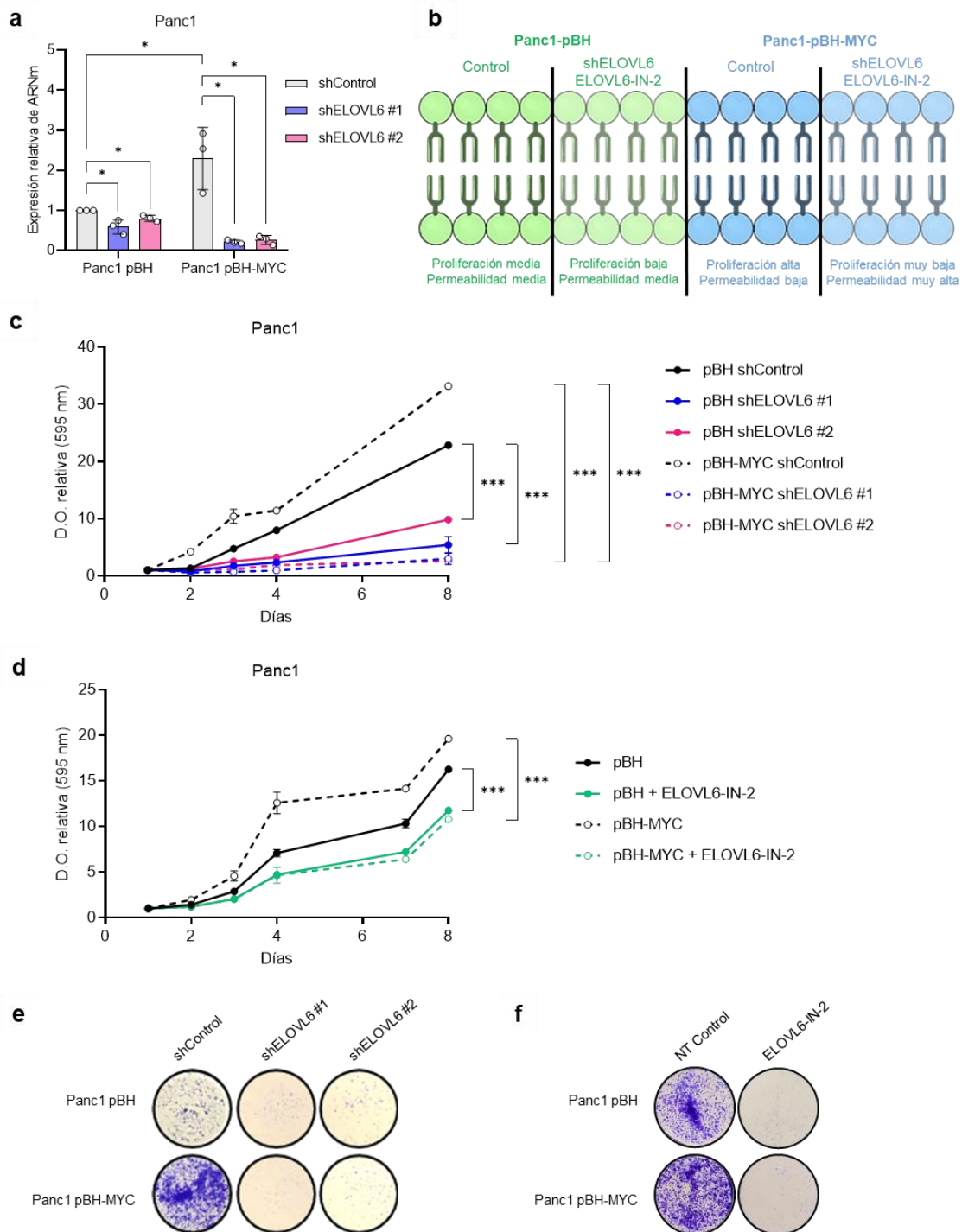


Figura 37. La eficacia de la interferencia de ELOVL6 sobre la proliferación celular depende de los niveles de expresión de c-MYC. **a** Expresión de ARNm de *ELOVLs* en Panc1 (pBH y pBH-MYC); la expresión génica se normaliza respecto a *HPRT* y shControl en Panc1-pBH; n = 3 por genotipo. **b** Esquema que muestra cómo la eficacia de la interferencia es dependiente del eje c-MYC/ELOVL6. **c** Ensayo de proliferación de células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado en Panc1 (pBH y pBH-MYC); n = 3. **d** Ensayo de proliferación de células inhibidas para *ELOVL6* en comparación con el control no tratado en Panc1 (pBH y pBH-

MYC); n = 3. **e** Ensayo de colonias de células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado en Panc1 (pBH y pBH-MYC); n = 3. **f** Ensayo de colonias de células inhibidas para *ELOVL6* en comparación con el control no tratado en Panc1 (pBH y pBH-MYC); n = 3. Todos los datos se presentan como media \pm SD; *p \leq 0,05, ***p \leq 0,001; (a) Prueba de Mann-Whitney; (c, d) Prueba ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Dunnett (c) o de Sidak (d).

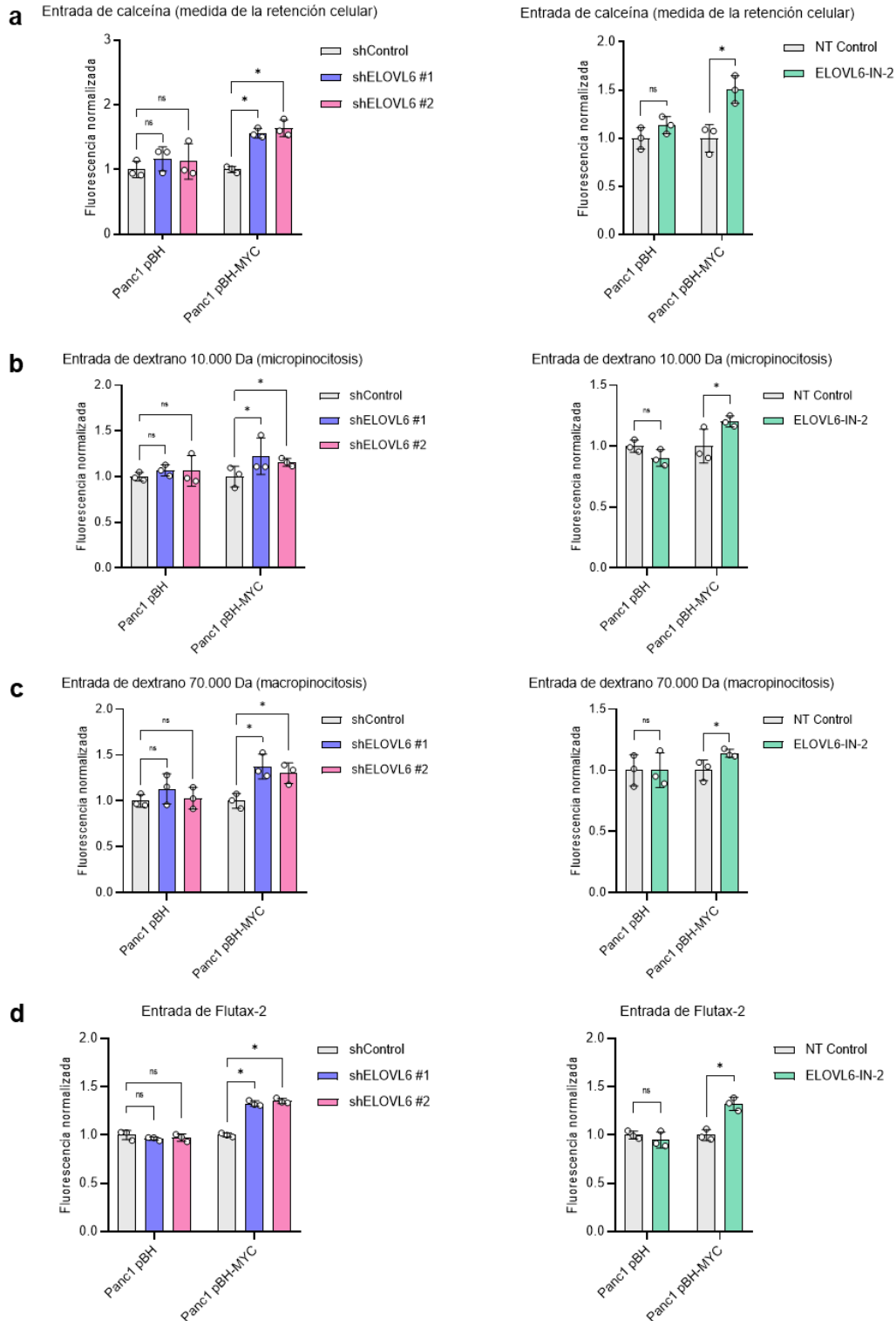


Figura 38. La eficacia de la interferencia de ELOVL6 sobre la permeabilidad celular depende de los niveles de expresión de c-MYC. **a** Captación de calceína-AM normalizada y procesamiento a calceína en células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado y células inhibidas para *ELOVL6* en comparación con el control no tratado en Panc1 (pBH y pBH-MYC); medición de la retención celular; n = 3. **b** Análisis de micropinocitosis por fluorescencia normalizada de dextrano-rodamina B de 10.000 Da incorporado por células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado y células inhibidas para *ELOVL6* en comparación con el control no tratado en Panc1 (pBH y pBH-MYC); n = 3 por condición. **c** Análisis de macropinocitosis por fluorescencia normalizada de dextrano-rodamina B de 70.000 Da incorporado por células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado y células inhibidas para *ELOVL6* en comparación con el control no tratado en Panc1 (pBH y pBH-MYC); n = 3 por condición. **d** Captación normalizada de Flutax-2 en células silenciadas para *ELOVL6* en comparación con el control no silenciado y células inhibidas para *ELOVL6* en comparación con el control no tratado en Panc1 (pBH y pBH-MYC); n = 3. Todos los datos se presentan como media \pm SD; ns: no estadísticamente significativo, * $p \leq 0,05$; (a, b, c, d) Prueba de Mann-Whitney.

11. La interferencia de ELOVL6 reduce el crecimiento tumoral y sinergiza con Abraxane *in vivo*

Para validar el efecto del silenciamiento de *ELOVL6* mediante shARNs *in vivo*, se implantaron células T3M4 por vía subcutánea en ratones desnudos (*nude mice*), distinguiendo entre las sometidas al silenciamiento y las células control no silenciadas. Para confirmar el efecto sinérgico observado *in vitro*, se administró Abraxane a una dosis de 40 mg/kg o PBS (vehículo) dos veces por semana en los intervalos especificados, monitorizando periódicamente el crecimiento tumoral. El silenciamiento de *ELOVL6* se tradujo en una disminución del volumen tumoral, y este efecto se magnificó significativamente con el tratamiento con Abraxane, eliminando la recaída tumoral (**Figura 39a**). Esto subraya el papel fundamental de *ELOVL6* en la proliferación y el crecimiento de las células humanas de ADP y enfatiza cómo el silenciamiento de *ELOVL6* sensibiliza las células tumorales a Abraxane. Así, los ratones implantados con células silenciadas para *ELOVL6* mostraron una supervivencia prolongada, que se acentuó aún más con el tratamiento con Abraxane (**Figura 39b**).

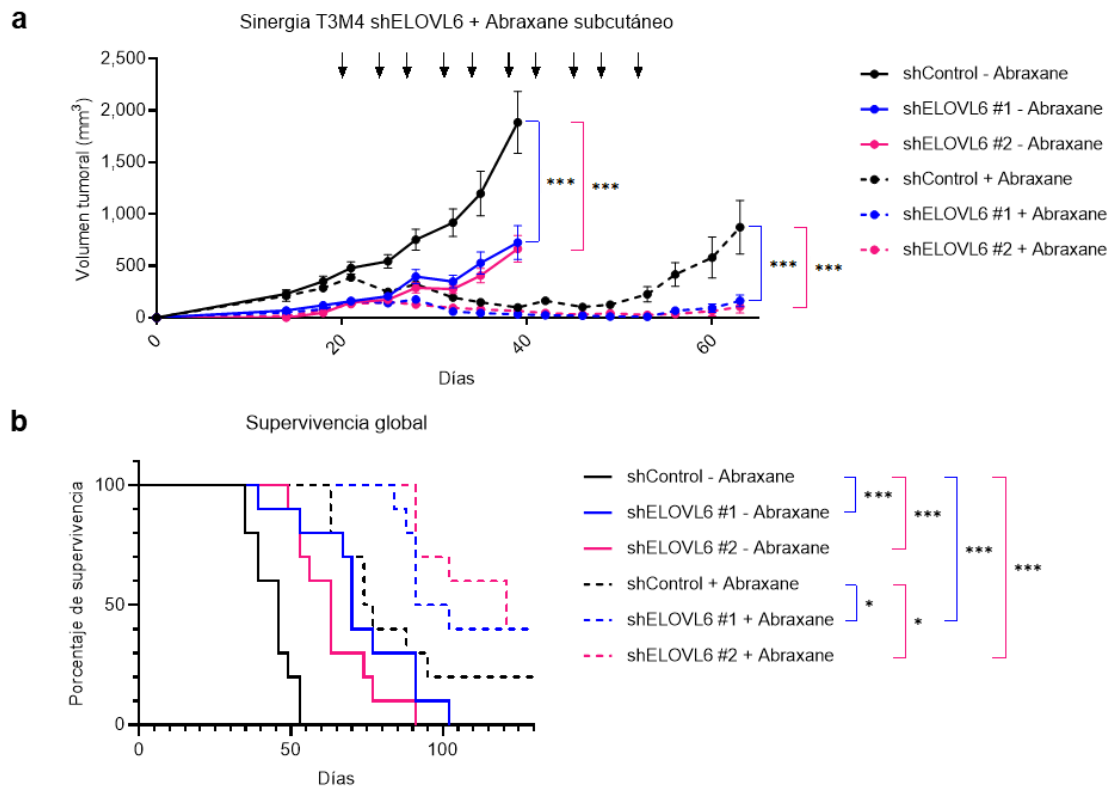


Figura 39. El silenciamiento de *ELOVL6* reduce el crecimiento tumoral y sinergiza con Abraxane *in vivo*. **a** Crecimiento tumoral en ratones desnudos implantados subcutáneamente con células T3M4 silenciadas para *ELOVL6* o con células control sin silenciar; se administró Abraxane o PBS intraperitonealmente a una dosis de 40 mg/kg dos veces por semana cuando el volumen tumoral alcanzó 500 mm³; n = 10. **b** Análisis de supervivencia de los ratones de (39a). Todos los datos se presentan como media \pm SD; *p \leq 0,05, ***p \leq 0,001; (a) Prueba ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Dunnett; (b) Prueba Log-rank (Mantel-Cox).

Para la correspondiente validación del efecto de la inhibición de *ELOVL6* mediante el tratamiento con *ELOVL6-IN-2 in vivo* y su sinergia con Abraxane, se implantaron células T3M4 en ratones desnudos (*nude mice*) y se administró *ELOVL6-IN-2* a una dosis de 10 mg/kg o metilcelulosa al 0,5% (vehículo) dos veces por semana en los intervalos especificados. Paralelamente y de forma concomitante, se administró Abraxane a una dosis de 40 mg/kg o PBS (vehículo). El tratamiento con *ELOVL6-IN-2* condujo a una reducción del crecimiento tumoral debida a la inhibición de *ELOVL6*, que se intensificó notablemente con el tratamiento con Abraxane (**Figura 40a**). Fue particularmente destacable el impacto en la supervivencia resultante de la combinación de los tratamientos con *ELOVL6-IN-2* y Abraxane, que además impidieron la recaída tumoral (**Figura 40b**).

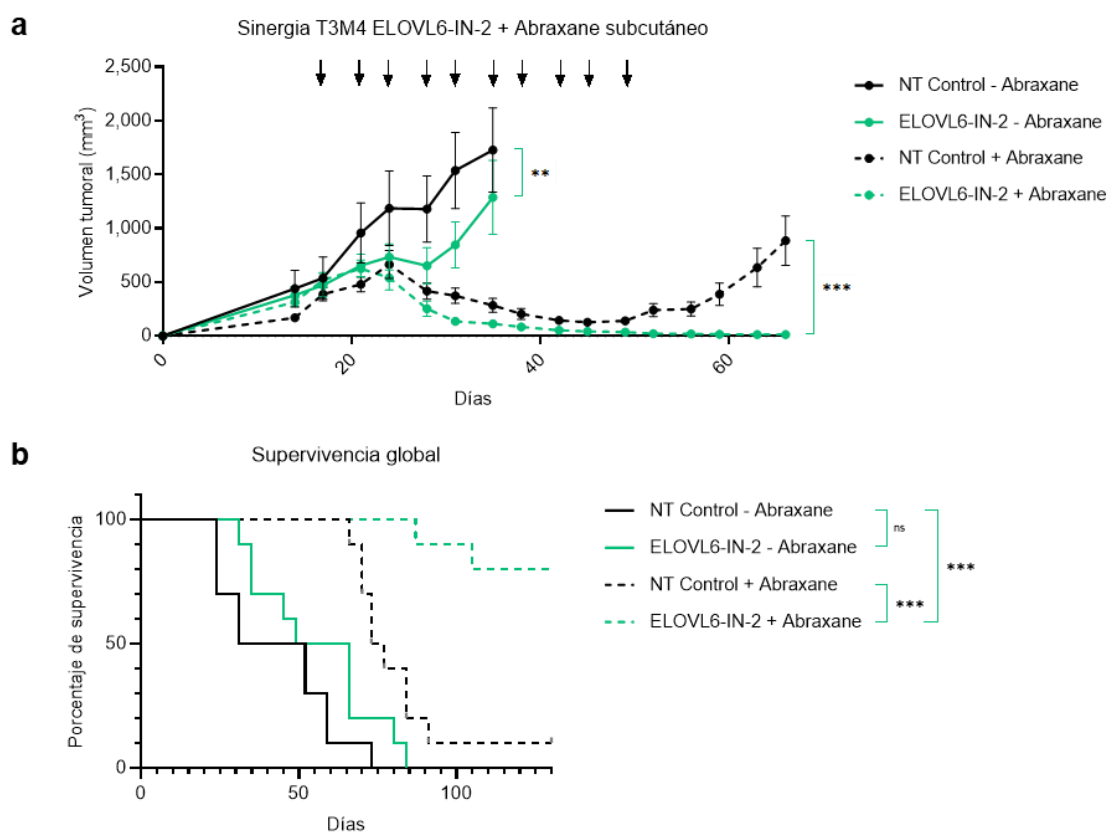


Figura 40. La inhibición de ELOVL6 reduce el crecimiento tumoral y sinergiza con Abraxane *in vivo*. **a** Crecimiento tumoral en ratones desnudos implantados subcutáneamente con células T3M4 inhibidas para ELOVL6 o células control no tratadas; se administró Abraxane o PBS intraperitonealmente a una dosis de 40 mg/kg dos veces por semana cuando el volumen tumoral alcanzó los 500 mm³; ELOVL6-IN-2 o metilcelulosa se administró por sonda oral a una dosis de 10 mg/kg en combinación con la quimioterapia; n = 10. **b** Análisis de supervivencia de los ratones en (40a). Todos los datos se presentan como media \pm SD; ns: no estadísticamente significativo, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001; (a) Prueba ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Sidak; (b) Prueba Log-rank (Mantel-Cox).

Además, para determinar si este efecto sinérgico estaba relacionado con un aumento de la entrada de Abraxane en el tumor debido a la inhibición de ELOVL6, se cuantificaron los niveles intratumorales de Abraxane en los tumores de ratones tratados con quimioterapia en presencia o ausencia del inhibidor de ELOVL6-IN-2. Para ello, se empleó un método de cromatografía líquida dirigida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Este experimento reveló un aumento de la captación de Abraxane por las células tumorales tras la inhibición de ELOVL6, lo que se correlaciona con el efecto sinérgico observado (**Figura 41a**).

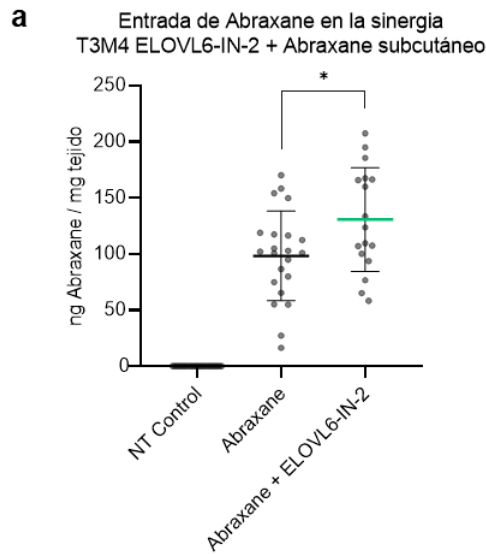


Figura 41. La inhibición de ELOVL6 favorece la entrada tumoral de Abraxane *in vivo*. a Acumulación de Abraxane dentro de los tumores de ratones tratados con ELOVL6-IN-2; determinación por espectrometría de masas. Todos los datos se presentan como media \pm SD; ns: no estadísticamente significativo, * $p \leq 0,05$; (a) Prueba T de Student no pareada.

Finalmente, diseñamos un sistema de *knock-down* mediante CRISPRi inducible dirigido a *ELOVL6* y seleccionamos los sgARNs que presentaban un mayor silenciamiento de *ELOVL6* tanto a nivel de ARN como de proteína (**Figuras 42a y 42b**), siendo #6 y #8 los elegidos. Estas líneas celulares T3M4 modificadas se implantaron por vía subcutánea en ratones desnudos y el sistema se activó mediante dieta con doxiciclina. El silenciamiento inducible de *ELOVL6* mediante CRISPRi frenó con éxito el crecimiento tumoral (**Figura 42c**) y aumentó las tasas de supervivencia (**Figura 42d**), validando así nuestros hallazgos anteriores.

Este exhaustivo conjunto de experimentos demuestra de forma concluyente, y por primera vez, que la interferencia de *ELOVL6*, ya sea mediante shARNs o el inhibidor químico ELOVL6-IN-2, sinergiza con Abraxane *in vitro* e *in vivo*, culminando en una respuesta antitumoral robusta y prometedora.

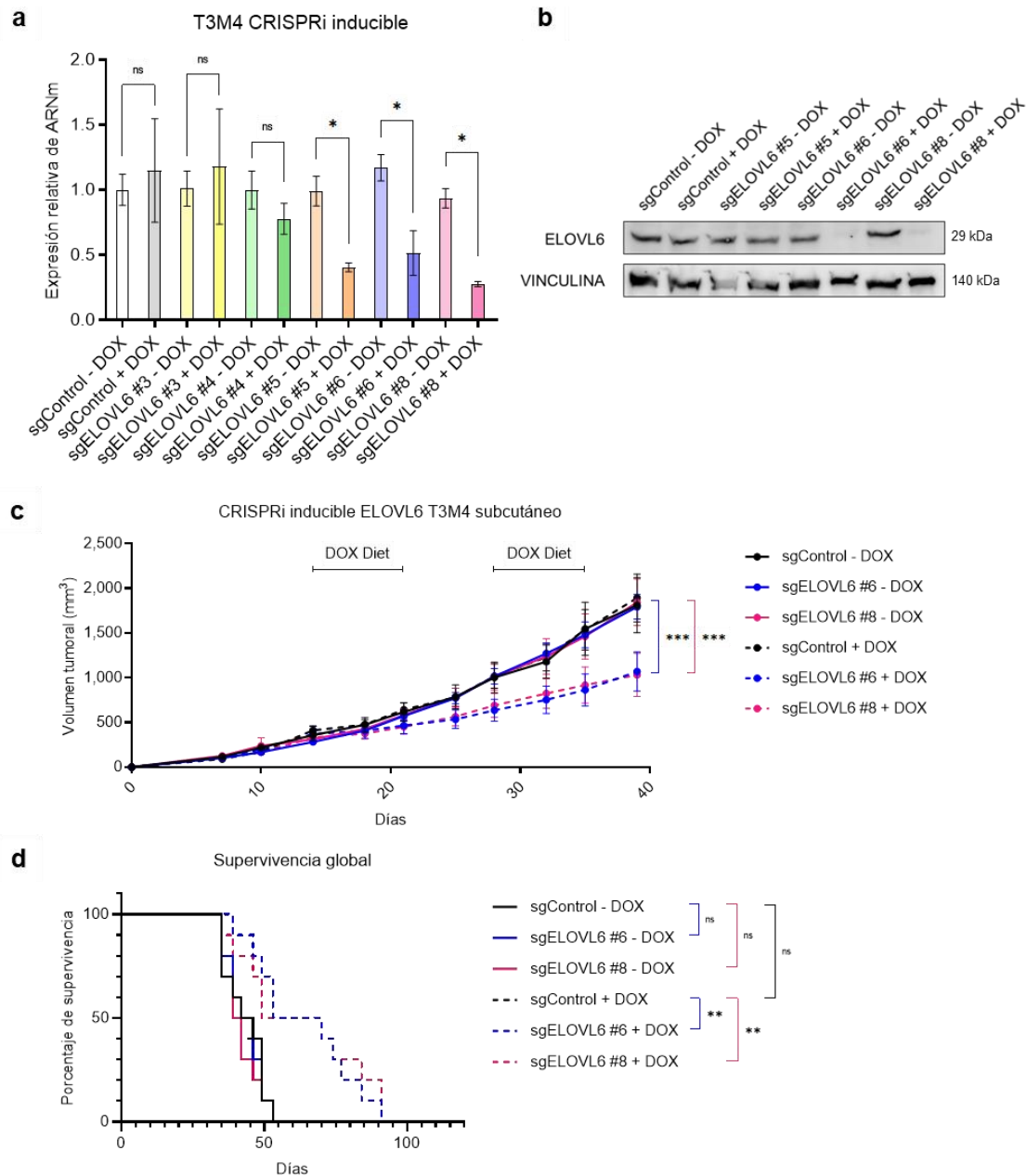


Figura 42. El *knock-down* inducible de *ELOVL6* reduce el crecimiento tumoral y sinergiza con Abraxane *in vivo*. **a** Silenciamiento de la expresión de ARNm de *ELOVL6* en el *knock-down* inducible de *ELOVL6*; la expresión génica se normaliza respecto a *HPRT* y sgControl sin tratamiento de doxociclina; n = 3 por genotipo. **b** Western blot que muestra el *knock-down* inducible de *ELOVL6*. **c** Crecimiento tumoral en ratones desnudos implantados subcutáneamente con células T3M4 portadoras del sistema inducible CRISPRi para *ELOVL6* o con células control de CRISPR/dCas9; se administró Abraxane o PBS intraperitonealmente a una dosis de 40 mg/kg dos veces por semana cuando el volumen tumoral alcanzó 500 mm³; n = 10. **d** Análisis de supervivencia de los ratones de (42c). Todos los datos se presentan como media \pm SD; *p \leq 0,05, ***p \leq 0,001; (c) Prueba ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Dunnett; (d) Prueba Log-rank (Mantel-Cox).

12. ELOVL1 se presenta como otra elongasa con potencial terapéutico en ADP

Para validar el papel de las ELOVLs como dianas terapéuticas, decidimos acudir a los datos analizados de scRNA-seq, tanto del modelo murino PRT (*Ptf1a-Cre-ER; Kras^{+LSL-G12D}; Rosa26^{LSL-tdTomato}*) realizado por *Schlesinger et al.* (*Schlesinger et al., 2020*) (**Figura 5a**), como del modelo humano con muestras tumorales de ADP realizado por *Peng et al.* (*Peng et al., 2019*) (**Figura 8a**).

Como se ha mostrado anteriormente, el análisis de scRNA-seq del modelo murino reveló la sobre expresión de las elongasas *Elovl1*, *Elovl5*, *Elovl6* y *Elovl7* en las células tumorales respecto a las células acinares. A pesar de que el patrón de expresión de *Elovl1* se caracterizaba por una distribución difusa en varios tipos celulares, lo que sugiere su presencia generalizada, se comprobó que era la elongasa cuya expresión media se veía más aumentada en las células metaplásicas murinas de ADP (**Figura 43a**).

Por otra parte, el análisis de scRNA-seq del modelo humano confirmó la sobre expresión de *ELOVL1* en las células tumorales respecto a las células acinares. A pesar de que, de nuevo, el patrón de expresión de *ELOVL1* estaba distribuido de manera difusa en varios tipos celulares, se trataba también de la elongasa más sobre expresada en las células tumorales del ADP humano (**Figura 43b**).

Por último, al consultar la cohorte de ADP de la base de datos TCGA (*The Cancer Genome Atlas Program*) utilizando el navegador GEPIA (*Gene Expression Profiling Interactive Analysis*), pudimos verificar que *ELOVL1* se encontraba significativamente sobre expresada en el adenocarcinoma ductal pancreático (*pancreatic adenocarcinoma, PAAD, T*) en comparación con el tejido normal (N) (**Figura 7a, 7b y 43c**), y que este patrón persistía en varios estadios tumorales (**Figura 43d**). Además, *ELOVL1* resultaba ser un marcador de pronóstico, puesto que los pacientes con alto nivel de expresión de esta elongasa tenían una tasa de supervivencia y una supervivencia libre de enfermedad significativamente menores que los pacientes con bajo nivel de expresión (**Figuras 43e y 43f**).

Por todos estos motivos, y porque *ELOVL1* es la única elongasa con inhibidores químicos disponibles además de *ELOVL6*, decidimos enfocarnos en *ELOVL1* para validar el potencial terapéutico de la interferencia de las elongasas en el adenocarcinoma ductal de páncreas.

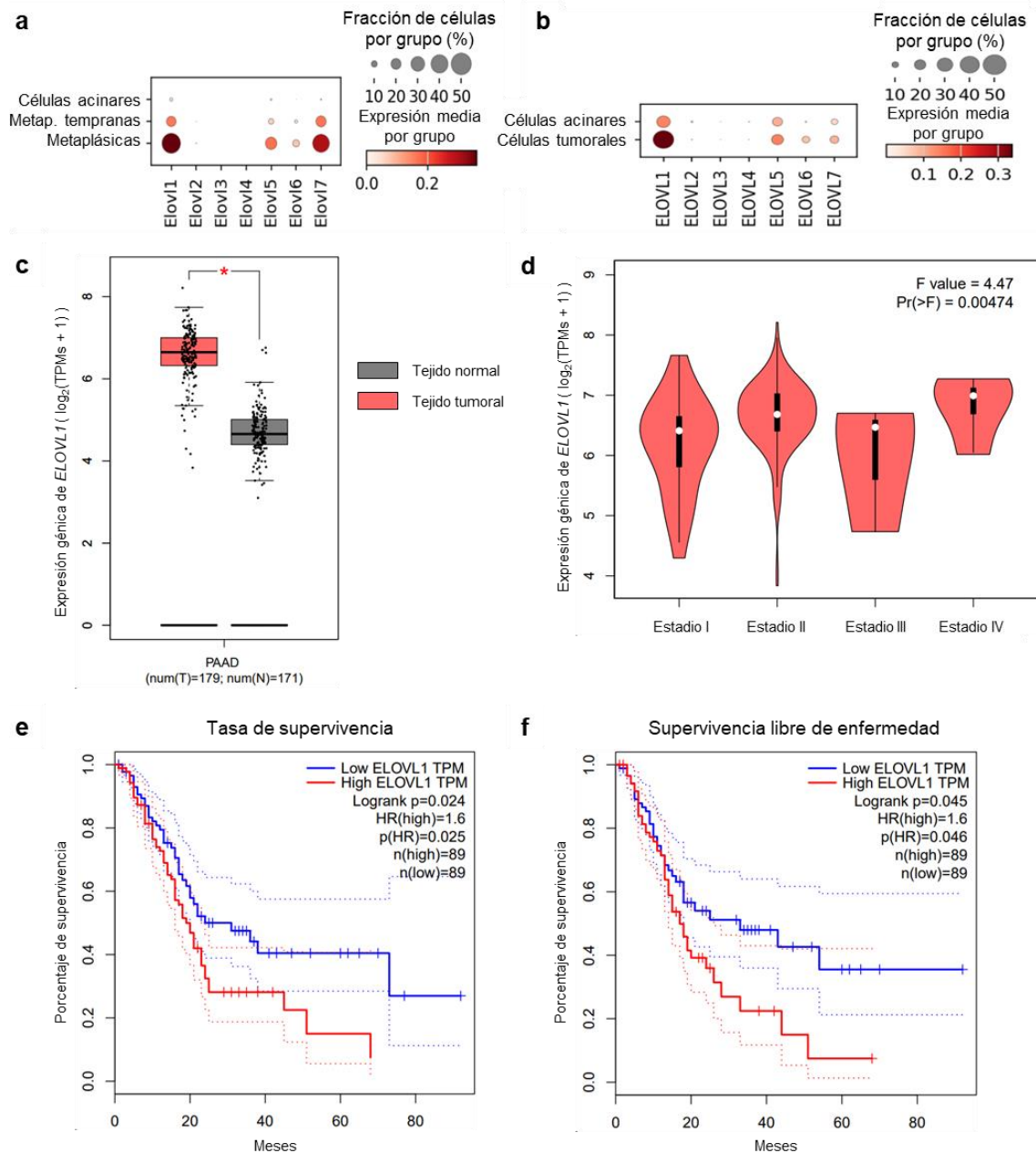


Figura 43. Análisis de expresión de *ELOVL1* en el ADP. a Dot plot de la expresión génica de las *Elovs* en el modelo murino PRT; el tamaño del punto indica el porcentaje de células pertenecientes a cada grupo que expresan cada gen concreto; la escala de color indica la expresión media dentro de cada grupo. **b** Dot plot de la expresión génica de las *ELOVLs* en el modelo humano con muestras tumorales de ADP. **c** Expresión génica de *ELOVL1* en tejido normal (N) y tumoral (T; ADP); base de datos TCGA; navegador GEPIA; TPMs: transcritos por millón; eje logarítmico. **d** Expresión génica de *ELOVL1* en diferentes estadios de progresión del ADP; base de datos TCGA; navegador GEPIA; TPMs: transcritos por millón; eje logarítmico. **e** Tasa de supervivencia asociada a niveles de expresión altos o bajos de *ELOVL1*. **f** Supervivencia libre de enfermedad asociada a niveles de expresión altos o bajos de *ELOVL1*. * $p \leq 0,05$; (c) Prueba ANOVA ordinaria de una vía; (e, f) Prueba Log-rank (Mantel-Cox).

13. La interferencia de ELOVL1 disminuye la proliferación y migración celular en el ADP

En primer lugar, para establecer el papel de ELOVL1 en la proliferación celular en los tumores humanos de ADP, se determinaron en primer lugar los niveles de esta elongasa en nuestras líneas celulares de adenocarcinoma ductal de páncreas. Este análisis reveló que, al igual que *ELOVL6*, *ELOVL1* estaba más expresada en las líneas T3M4 y Patu 8988T, siendo su expresión menor en Panc1 (**Figura 44a**). Por este motivo, se interfirió esta elongasa en las líneas celulares T3M4 y Patu 8988T, silenciándose los niveles de *ELOVL1* mediante dos shARNs distintos, denominados shELOVL1 #1 y shELOVL1 #2 (**Figura 44b**). Sin embargo, de forma contraria a lo que sucedía al silenciar *ELOVL6*, no se observó un efecto compensatorio claro al silenciar *ELOVL1*, encontrándonos elongasas cuyos niveles de expresión bajaban, otras que no variaban y varias que se sobre expresaban (**Figura 44c**). Del mismo modo, para validar la interferencia de ELOVL1 mediante su silenciamiento con shARNs, también se inhibió esta elongasa a nivel proteico utilizando el inhibidor químico ELOVL1-IN-2.

El análisis posterior de los ensayos de proliferación celular y de crecimiento de colonias reveló, como esperábamos, una reducción de la proliferación celular tras el silenciamiento mediante shARNs de *ELOVL1* en las líneas celulares T3M4 y Patu 8988T (**Figura 45a**). Del mismo modo, tras inhibir químicamente ELOVL1, se observaron los mismos efectos sobre la proliferación celular *in vitro* (**Figura 45b**).

Por último, se investigó el impacto de ELOVL1 en la migración celular mediante ensayos de cicatrización de herida (*wound healing*), descubriendo que el silenciamiento de *ELOVL1* resultaba en un impedimento de la migración celular reflejado en un retraso en el cierre de la herida (**Figura 46a**).

En conjunto, estos resultados refuerzan firmemente el papel fundamental de ELOVL1 en los procesos de proliferación y migración celular.

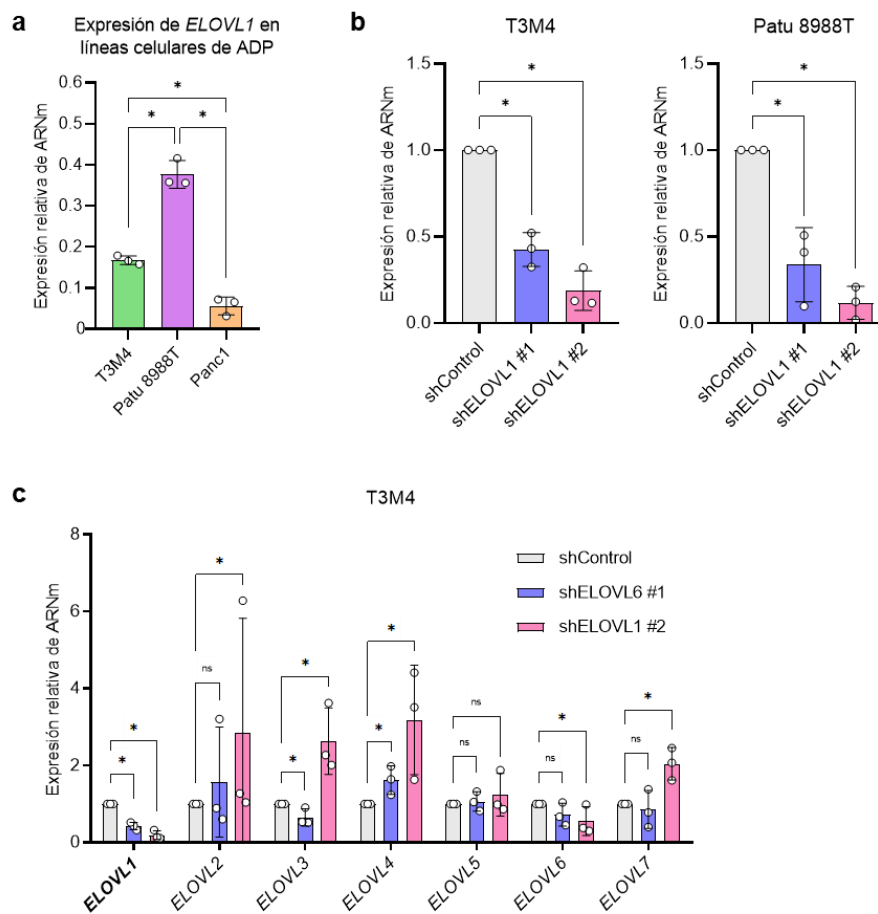


Figura 44. Expresión de *ELOVL1* en líneas celulares de ADP. **a** Expresión de ARNm de *ELOVL1* en líneas celulares de ADP; la expresión génica se normaliza respecto a *HPRT*; $n = 3$ por línea celular. **b** Expresión de ARNm que muestra el silenciamiento de *ELOVL1* en líneas celulares de ADP; la expresión génica se normaliza respecto a *HPRT* y shControl; $n = 3$ por genotipo y línea celular. **c** Expresión de ARNm que muestra el efecto del silenciamiento de *ELOVL6* sobre las diferentes elongasas en T3M4; la expresión génica se normaliza respecto a *HPRT* y shControl; $n = 3$. Todos los datos se presentan como media \pm SD; ns: no estadísticamente significativo, $*p \leq 0,05$; (a, b, c) Prueba U de Mann-Whitney.

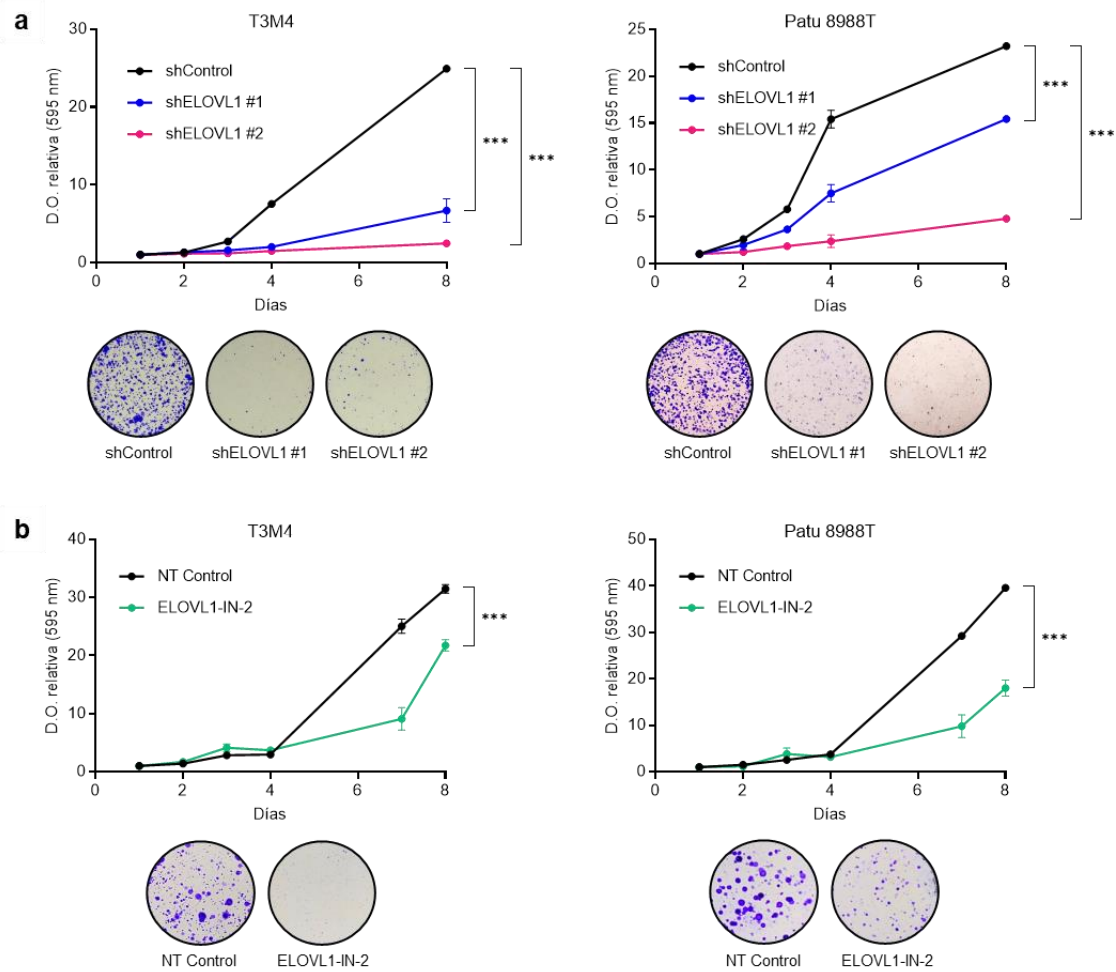


Figura 45. La interferencia de ELOVL1 disminuye la proliferación celular *in vitro*. **a** Ensayos de proliferación y colonias de células silenciadas para *ELOVL1* en comparación con el control no silenciado en líneas celulares de ADP; n = 3. **b** Ensayos de proliferación y colonias de células inhibidas para *ELOVL1* en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; n = 3. Todos los datos se presentan como media \pm SD; ***p \leq 0,001; (a, b) Prueba ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Dunnett (a) o la prueba de Sidak (b).

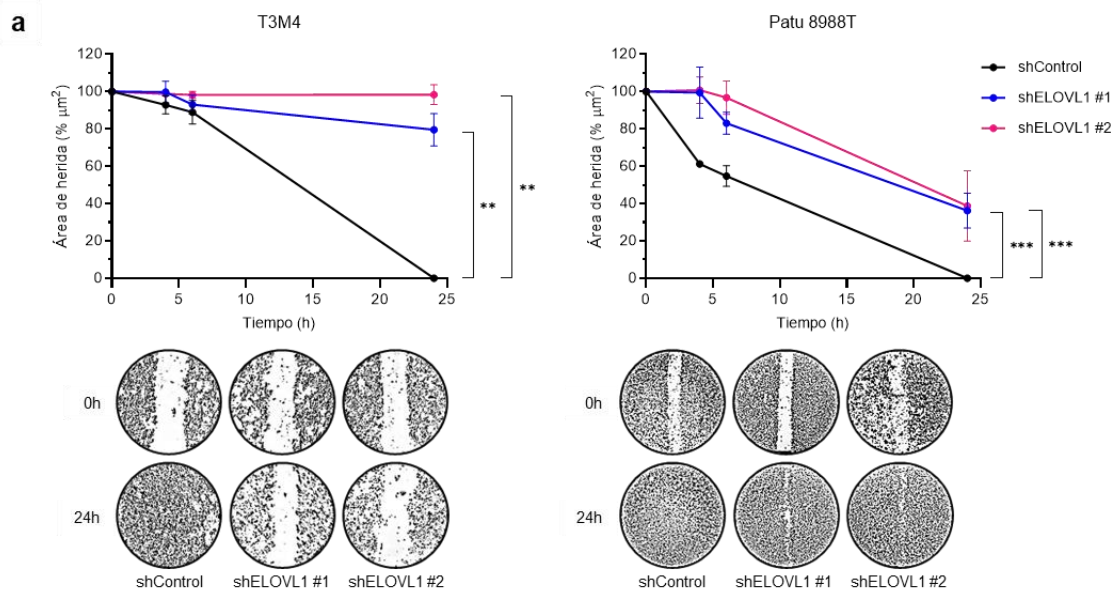


Figura 46. La interferencia de ELOVL6 disminuye la migración celular *in vitro*. a Ensayo de cicatrización de herida (*wound healing*) de células silenciadas para ELOVL1 en comparación con el control no silenciado en líneas celulares de ADP; n = 3; se muestran imágenes representativas del cierre de heridas. Todos los datos se presentan como media \pm SD; **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001; (a) Prueba ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Dunnett.

14. La interferencia de ELOVL1 valida el potencial terapéutico de las elongasas en el ADP

Para investigar más a fondo si todas estas alteraciones en la capacidad proliferativa y migratoria se correlacionaban, al igual que al interferir ELOVL6, con un aumento de la permeabilidad de la membrana celular, realizamos ensayos de captación de calceína en las líneas celulares T3M4 y Patu 8988T. Los resultados demostraron un considerable aumento en la captación de calceína al interferir *ELOVL1* utilizando tanto shARNs como el inhibidor químico ELOVL1-IN-2 (**Figura 47a**). Cabe destacar además que no se observaron cambios en la expulsión de calceína (**Figura 47b**), lo que indica que el aumento en la captación de calceína no se atribuye a una menor expulsión del fármaco por las células, sino más bien a una mayor entrada del mismo.

Del mismo modo, se analizó si la interferencia de ELOVL1 también estaba asociada con un incremento en la pinocitosis, por lo que, al igual que al interferir ELOVL6, se empleó dextrano de diferentes pesos moleculares marcado con rodamina B. Estos análisis

revelaron un incremento en la micro y macropinocitosis, tanto al silenciar nuestras líneas celulares mediante shARNs como al inhibirlas con ELOVL1-IN-2 (**Figuras 48a y 48b**).

Por último, para evaluar el impacto de la interferencia de ELOVL1 en la captación de Abraxane, realizamos ensayos de entrada de Flutax-2. Al igual que con la interferencia de ELOVL6, pudimos observar un aumento en la captación de este compuesto al interferir nuestras líneas celulares utilizando tanto shARNs como ELOVL1-IN-2 (**Figura 48c**).

A continuación, para explorar si el silenciamiento de *ELOVL1* podía sinergizar con el tratamiento con Abraxane, calculamos la IC50 de este fármaco para las líneas celulares de ADP T3M4 y Patu 8988T, comprobándose que tanto el silenciamiento de *ELOVL1* por shARNs (**Figura 49a**) como la inhibición química por ELOVL1-IN-2 (**Figura 49b**) reducían significativamente la IC50 de Abraxane.

Estos resultados sugieren un papel crucial de ELOVL1 en la regulación de la permeabilidad de la membrana y su potencial terapéutico en sinergia con Abraxane, y confirman con creces los efectos observados asociados a la interferencia de ELOVL6, abriendo nuevas posibilidades terapéuticas.

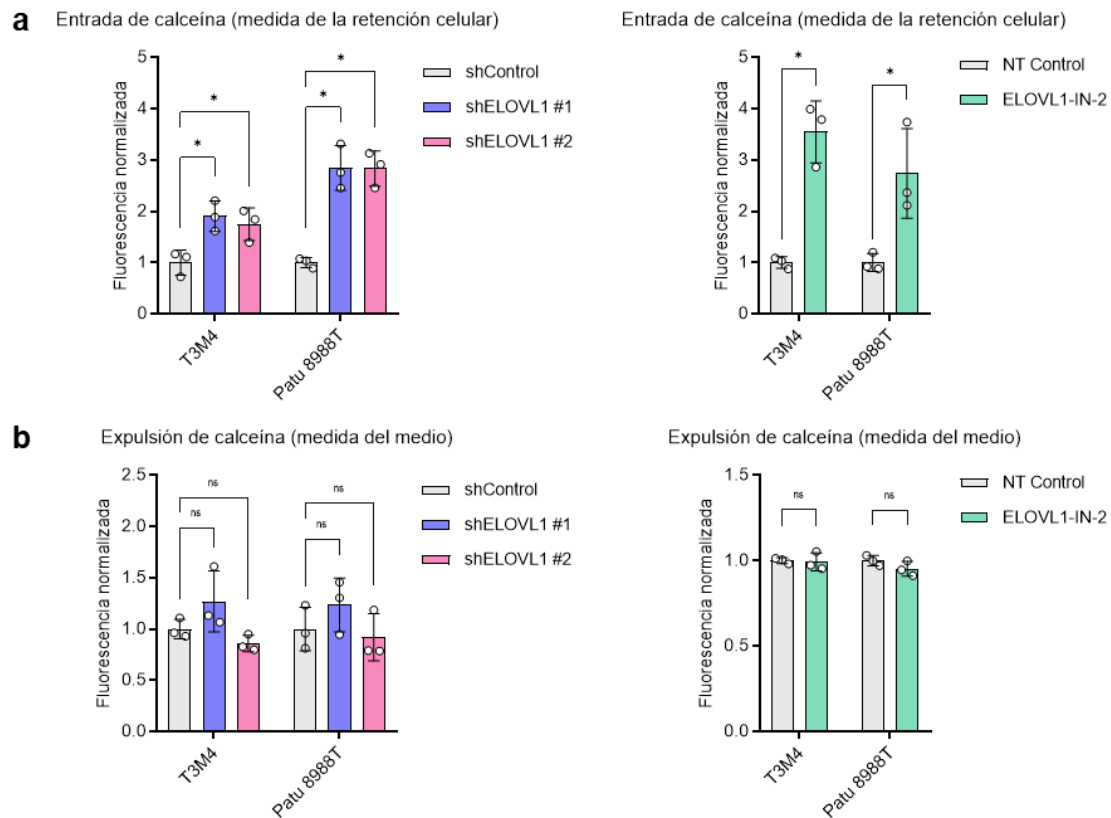


Figura 47. La interferencia de ELOVL1 aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática. **a** Captación de calceína-AM normalizada y procesamiento a calceína en células silenciadas para *ELOVL1* en comparación con el control no silenciado y en células inhibidas para *ELOVL1* en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; medición de la retención intracelular; $n = 3$. **b** Expulsión de calceína normalizada en células silenciadas para *ELOVL1* en comparación con el control no silenciado y en células inhibidas para *ELOVL1* en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; medición de medios; $n = 3$. Todos los datos se presentan como media \pm SD; ns: no estadísticamente significativo, $*p \leq 0,05$; (a, b) Prueba de Mann-Whitney.

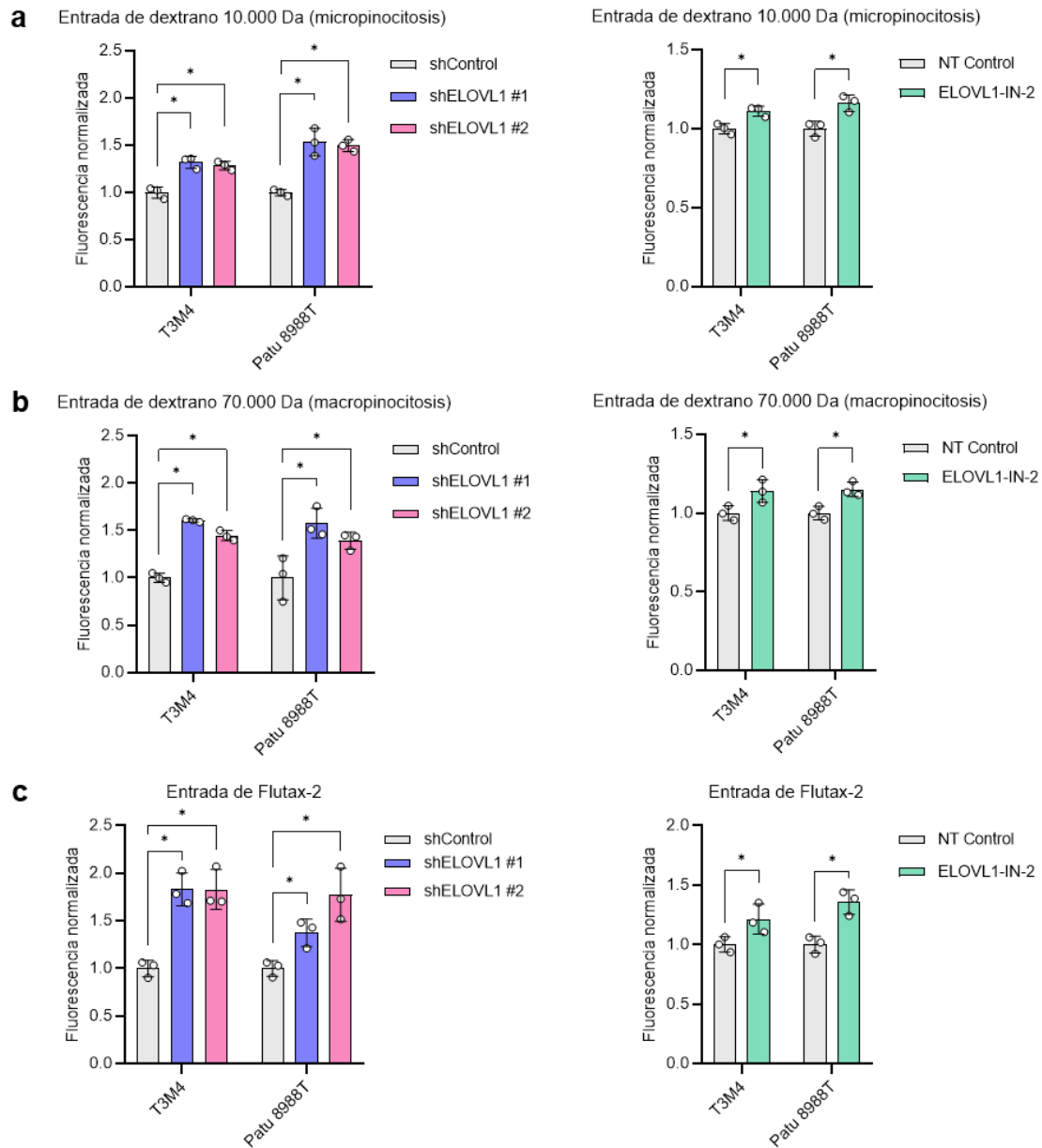


Figura 48. La interferencia de ELOVL1 aumenta la pinocitosis y la captación de quimioterapia. **a** Análisis de micropinocitosis por fluorescencia normalizada de dextranorodamina B de 10.000 Da incorporado por células silenciadas para *ELOVL1* en comparación con el control no silenciado y células inhibidas para *ELOVL1* en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; n = 3 por condición. **b** Análisis de macropinocitosis por fluorescencia normalizada de dextranorodamina B de 70.000 Da incorporado por células silenciadas para *ELOVL1* en comparación con el control no silenciado y células inhibidas para *ELOVL1* en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; n = 3 por condición. **c** Captación normalizada de Flutax-2 en células silenciadas para *ELOVL1* en comparación con el control no silenciado y células inhibidas para *ELOVL1* en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; n = 3. Todos los datos se presentan como media \pm SD; *p \leq 0,05; (a-c) Prueba de Mann-Whitney.

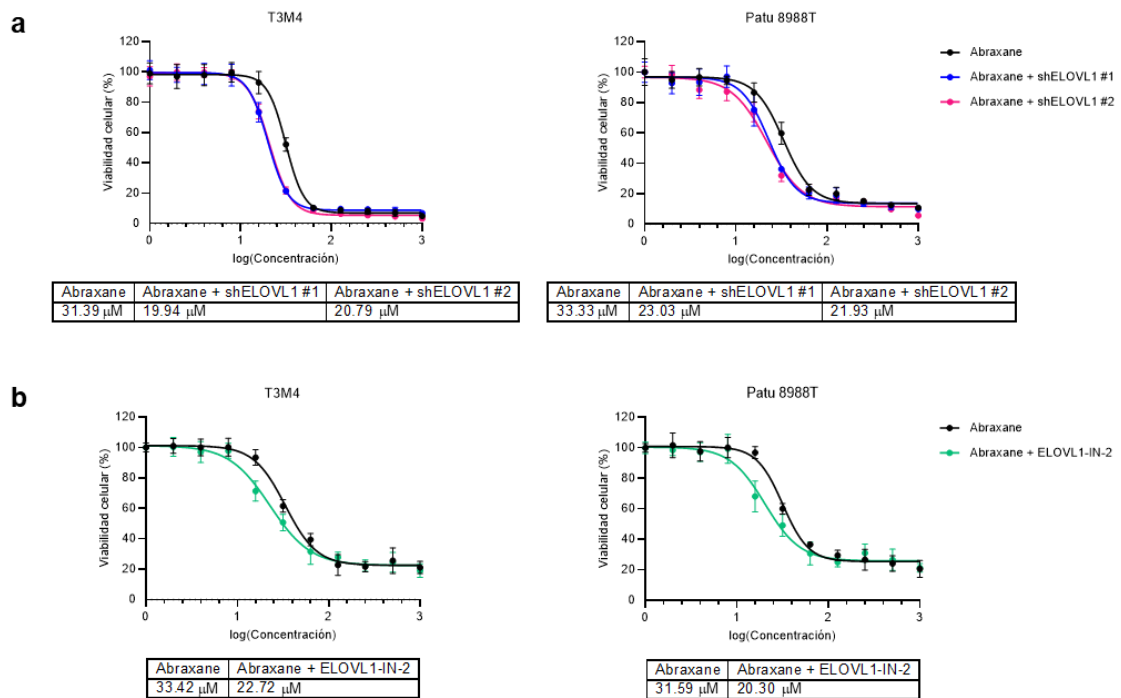


Figura 49. La interferencia de ELOVL1 sensibiliza a la quimioterapia *in vitro*. **a** Análisis y valores de IC₅₀ de Abraxane utilizando ATPlite en células silenciadas para *ELOVL1* en comparación con el control no silenciado en líneas celulares de ADP; n = 6. **b** Análisis y valores de IC₅₀ de Abraxane utilizando ATPlite en células inhibidas para *ELOVL1* en comparación con el control no tratado en líneas celulares de ADP; n = 6. Todos los datos se presentan como media \pm SD.

DISCUSIÓN

“Necesitamos especialmente de la imaginación en las ciencias. No todo es matemáticas y no todo es simple lógica, también se trata de un poco de belleza y poesía”

María Montessori (1870-1952)



El presente estudio establece *ELOVL6* como una prometedora diana terapéutica en el adenocarcinoma ductal pancreático (ADP), regulada a su vez por *c-MYC*.

Nuestra investigación demuestra, inicialmente, una correlación significativa entre la expresión de estos dos genes, *c-MYC* y *ELOVL6*, de modo que los niveles del segundo dependen directamente de los del primero. Es más, nuestros experimentos corroboran que *c-MYC* se une al promotor de *ELOVL6*, permitiendo su transcripción y siendo determinante, por lo tanto, de sus niveles de expresión.

El oncogén *c-MYC* es extensamente conocido por su capacidad para promover la proliferación celular, y su sobreexpresión se asocia con una amplia gama de cánceres, incluido el adenocarcinoma ductal pancreático. *c-MYC* regula la transcripción, entre muchas otras dianas, de genes implicados en el metabolismo, crecimiento y división celular, permitiendo de este modo la supervivencia de las células tumorales (Dang, 2012). Además de regular la expresión de *ELOVL6*, *c-MYC* interviene en diversas rutas metabólicas esenciales para el cáncer, como la glucólisis (Miller et al., 2012; Xiang et al., 2018) y la síntesis de lípidos (F. Su & Koeberle, 2024). En el ADP, se ha demostrado que *c-MYC*, sobre expresado en el 42% de los casos, se activa a través de mutaciones en *KRAS*, lo que subraya su relevancia en la biología de este cáncer. Por tanto, intervenir en la vía *c-MYC* podría tener efectos terapéuticos en múltiples frentes, no solo reduciendo la expresión de *ELOVL6*, sino también impactando negativamente sobre otros procesos clave para el desarrollo tumoral.

Por su parte, *ELOVL6* es una elongasa que juega un papel fundamental en la síntesis de ácidos grasos de cadena muy larga, esenciales para la integridad y funcionalidad de las membranas celulares (Jakobsson et al., 2006). Además, los ácidos grasos largos están implicados en la regulación del metabolismo energético y en la señalización celular, elementos críticos para la proliferación de células cancerosas. Es ampliamente conocido que las células tumorales alteran su metabolismo para suplir sus necesidades energéticas y estructurales. De este modo, consiguen modular la disponibilidad de lípidos estructurales para la síntesis de membranas, la síntesis y degradación de lípidos que contribuyen a la homeostasis energética y la abundancia de lípidos con funciones de señalización (Santos & Schulze, 2012). Estos cambios en el metabolismo lipídico afectan en última instancia a numerosos procesos celulares, como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la motilidad celular. En este contexto, la interferencia de *ELOVL6*, tanto genética como química, muestra resultados impresionantes, reduciendo

el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo*. Esta intervención induce el arresto del ciclo celular en la fase G1, lo que conduce a una bajada proliferativa y el consecuente aumento de la supervivencia global en ratones.

Estos cambios en la progresión tumoral se asocian a alteraciones en la composición lipídica de la membrana, que dan lugar a cambios en la rigidez y la permeabilidad de la misma, junto con una reducción de su grosor. En este sentido, se debe recordar que la longitud de las cadenas de ácidos grasos, particularmente en los fosfolípidos, puede influir directamente en la organización de la bicapa lipídica, lo que a su vez impacta en el grosor y otras propiedades biofísicas de la membrana (Stillwell & Wassall, 2003).

Frallicciardi *et al.* demostraron cómo la longitud de estos ácidos grasos contribuye a reducir la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares (Frallicciardi *et al.*, 2022). Del mismo modo, otros estudios han demostrado que la longitud de los ácidos grasos también es fundamental en la formación de balsas lipídicas (Heberle *et al.*, 2013; Sezgin *et al.*, 2017), microdominios críticos en la membrana plasmática que participan activamente en procesos esenciales, en particular la transducción de señales.

En cuanto a los esfingolípidos, la longitud de los ácidos grasos que los componen puede influir en la dimerización de proteínas a través de la membrana. Por ejemplo, la modulación de la dimerización del receptor ErbB2 está implicada en la señalización celular a través de un aumento de la longitud de las colas lipídicas (Gopal *et al.*, 2020). Además, se ha establecido que las elongasas desempeñan un papel crucial en vías de señalización en otros tumores, por ejemplo influyendo en la localización, dimerización y señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), como se demuestra en el trabajo de Gimple *et al.* (Gimple *et al.*, 2019).

Por otro lado, las alteraciones en las propiedades mecánicas observadas tras la interferencia de ELOVL6 aumentan consecuentemente la captación de Abraxane *in vitro* e *in vivo*, potenciando su efecto terapéutico y proporcionando nuevas opciones terapéuticas para este cáncer, donde la limitada batería farmacológica y el debilitado estado fisiológico del paciente condicionan con creces el abordaje terapéutico.

En este sentido, se sabe que la resistencia a fármacos en el cáncer está frecuentemente relacionada con la composición lipídica de las membranas celulares. Esto, a su vez, influye en la entrada de numerosos fármacos quimioterapéuticos que requieren interacción o penetración a través de las membranas celulares para alcanzar sus dianas

(Peetla et al., 2013). Las células tumorales son capaces de reorganizar sus bicapas lipídicas para evitar la entrada de fármacos quimioterapéuticos, lo que dificulta la eficacia de estos tratamientos.

En este contexto, estudios recientes han indicado que, en las poblaciones celulares compuestas por células con membranas tanto de alta como de baja permeabilidad, las células altamente permeables muestran una consecuente mayor reactividad y respuesta a la captación de fármacos. Este fenómeno ejerce una influencia negativa en la captación por parte de las células de baja permeabilidad, ya que el fármaco se agota rápidamente en el espacio extracelular (Becker et al., 2022).

Todos estos hallazgos han permitido concluir que modificar la rigidez y permeabilidad de las membranas a través de los perfiles lipídicos puede aumentar la captación de fármacos (Van Meer et al., 2008). Esto es particularmente relevante en el contexto del adenocarcinoma ductal de páncreas, donde la resistencia a la quimioterapia sigue siendo un desafío importante. Intervenir en la composición lipídica a través de la inhibición de enzimas como ELOVL6 podría aumentar la susceptibilidad de las células tumorales a otros tratamientos aún por explorar, mejorando su eficacia.

Es importante destacar que la sinergia observada, basada en la mejora en la entrada del quimioterápico Abraxane, ofrece una vía prometedora para reducir las dosis farmacológicas necesarias. Este hecho se traduciría a su vez en una disminución de los efectos secundarios asociados no deseados, algo de crucial importancia dada la condición de los pacientes.

Esta sinergia con el tratamiento con Abraxane no sólo pone de relieve el potencial de mejora de la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos al interferir procesos metabólicos, sino que también desvela un espectro de posibilidades para avanzar en las estrategias de tratamiento del ADP.

En conclusión, las células tumorales experimentan una reorganización de sus membranas para facilitar la proliferación, evadir la apoptosis y dificultar la entrada de agentes quimioterapéuticos (Bernardes & M. Fialho, 2018), y la interferencia de ELOVL6 podría resultar en una estrategia terapéutica para abordar los diferentes frentes mencionados.

Por otra parte, varios estudios avalan el importante papel de las elongasas durante la progresión tumoral. El papel crucial que juegan en el ADP no se limita únicamente a este cáncer, sino que también se ha demostrado su importancia en otros tipos de tumor. Las investigaciones sobre las alteraciones del lipidoma en los cánceres de pulmón y próstata han revelado que la elongación de las cadenas de acilo en los fosfolípidos es un rasgo oncogénico común.

En particular, entre los cambios regulados por andrógenos en el cáncer de próstata destaca la sobre expresión de *ELOVL5*, que es fundamental para la función mitocondrial y la progresión metastásica (Centenera et al., 2021).

En lo que respecta a *ELOVL6*, en el carcinoma de pulmón de células escamosas (*squamous-cell carcinoma*, SCC), el análisis de 30 SCCs humanos y del modelo de ratón *L-Ikkα^{KA/KA}* identificó *ELOVL6* como la principal enzima impulsora de esta modificación lipídica, correlacionada con un mayor crecimiento tumoral y formación de colonias (Marien et al., 2016).

En el contexto del cáncer colorrectal, se ha demostrado que la inhibición de *ELOVL6*, junto a la de la señalización de *ACSL4*, desencadena ferroptosis, un tipo de muerte celular regulada por la peroxidación de lípidos. Al alterar el metabolismo lipídico de las células cancerosas, *ELOVL6* influye en su vulnerabilidad a este proceso, sugiriendo que podría ser una diana terapéutica clave para potenciar tratamientos oncológicos basados en la ferroptosis (Tian et al., 2021).

En esta misma línea, se ha demostrado que, en el adenocarcinoma ductal de páncreas, un incremento de temperatura tumoral intrínseco dirige el metabolismo lipídico hacia la reducción de la peroxidación de lípidos, lo que resulta en una evasión de la ferroptosis. Además, esto conduce a la inhibición de p38 MAPK que, en definitiva, conlleva al desarrollo de quimiorresistencia al fármaco gemcitabina (de Laat et al., 2024). Dado que se observa un aumento de la temperatura tumoral en varios otros tipos de tumores, estos hallazgos justifican que se tenga en cuenta la temperatura tumoral a la hora de desarrollar terapias centradas en *ELOVL6*, pues su inhibición podría desencadenar una mayor ferroptosis a bajas temperaturas.

Además, en el carcinoma colorrectal (*colorrectal carcinoma*, CRC), *ELOVL4* y *ELOVL6* están sobre expresadas en tejidos cancerosos y en líneas celulares. En particular, el silenciamiento de *ELOVL6* mediante siRNA resulta en una reducción significativa de la

proliferación y migración celular, subrayando su papel en la progresión tumoral (Czumaj et al., 2023). Este descubrimiento resalta la importancia de la modulación de ELOVL6 como diana en la terapia contra el cáncer colorrectal y, potencialmente, en otros tipos de cáncer donde esta enzima esté implicada, a través de la interrupción de la reprogramación lipídica en el cáncer para limitar su desarrollo.

ELOVL6 también desempeña un papel clave tanto en la función normal de las células madre hematopoyéticas (HSC) como en la propagación de la leucemia mieloide aguda (AML). La eliminación de ELOVL6 en modelos de ratón resulta en una disminución significativa en la capacidad de migración y *homing* de las células leucémicas, lo cual afecta al potencial de repoblación y la progresión de la enfermedad. El mecanismo subyacente se basa en la regulación por ELOVL6 de la remodelación del citoesqueleto y la señalización vía PI3K-Rac1, procesos cruciales para la migración celular y la leucemogénesis. Además, la reintroducción de ELOVL6 en células deficientes de esta enzima restaura el comportamiento leucémico, lo que subraya su papel central en la progresión de AML. También cabe destacar que niveles altos de expresión de esta elongasa están correlacionados con un peor pronóstico en pacientes con AML, lo que sugiere su potencial como diana terapéutica también en este tipo de tumor (Kiyoki et al., 2023).

Adicionalmente, en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSC), ELOVL6, al regular la elongación de ácidos grasos, afecta a la composición de los lípidos de la membrana celular. Este hecho puede impactar en la activación de la vía de señalización WNT/ β -catenina, dado que ésta depende de la organización de los lípidos en la membrana plasmática. Todo ello influye, en definitiva, sobre la proliferación celular y la progresión tumoral de varios tipos de cáncer (R. Wang et al., 2024). Esta observación es muy interesante, puesto que en nuestro array de señalización celular hemos comprobado cómo una de las quinasas cuya fosforilación se ve más reducida al inhibir ELOVL6 es β -catenina. Por tanto, los descubrimientos asociados al carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello podrían ser investigados en el ADP para ayudarnos a esclarecer el mecanismo por el cual la interferencia de ELOVL6 reduce la proliferación y la progresión tumoral. La presencia de WNT elimina la fosforilación de β -catenina, de modo que ésta puede translocarse al núcleo y actuar como factor de transcripción de genes asociados a proliferación, como la *ciclina D* y *c-MYC*. Una posible explicación sería que, dado que *c-MYC* regula la expresión de *ELOVL6*, observamos un efecto compensatorio: ante la

inhibición de *ELOVL6*, que disminuye la fosforilación de β -catenina, aumentaría la expresión de *c-MYC*, revirtiendo en una sobre expresión de nuevo de *ELOVL6*.

Por último, se ha observado que el tratamiento con bortezomib puede afectar a la expresión de *ELOVL6*, lo que a su vez impacta en la elongación de ácidos grasos. Esta relación sugiere que el mecanismo a través del cual el bortezomib ejerce sus efectos terapéuticos en el tratamiento de enfermedades hematológicas, como el mieloma múltiple, podría ser a través de la modulación de *ELOVL6*. El fármaco influiría en la homeostasis y el potencial de autorrenovación de las células madre hematopoyéticas, sugiriendo en definitiva que la regulación de *ELOVL6* podría ser una diana terapéutica en enfermedades hematológicas. Además, niveles bajos de expresión de *ELOVL6* se han correlacionado con la resistencia a bortezomib, tanto en pacientes como en líneas celulares (Lipchick et al., 2021).

Del mismo modo, centrando nuestra atención en *ELOVL1*, se ha demostrado que sus niveles de expresión están aumentados en los tejidos de cáncer colorrectal, y que su inhibición disminuye los niveles de triacilglicéridos conformados por ácidos grasos de cadena larga esterificados y sin esterificar en líneas celulares, sugiriendo que esta elongasa contribuye a la acumulación de estos ácidos grasos, desempeñando un rol protumoral en este tipo de cáncer (Hama et al., 2021).

Además, se ha comprobado que *ELOVL1* está sobre expresada en el carcinoma hepatocelular en comparación con los tejidos sanos, de modo que los pacientes con alta expresión de esta elongasa presentan una menor supervivencia global y libre de enfermedad. *ELOVL1* está asociada con el metabolismo lipídico y las vías PPAR y PI3K-AKT-mTOR, por lo que silenciarla en líneas celulares de este cáncer inhibe el crecimiento tumoral, promueve la apoptosis y disminuye la metástasis e invasión, además de ralentizar el crecimiento de tumores en xenoinjertos murinos (L. Qin et al., 2024).

En esta misma línea, se cree que *ELOVL1* podría estar involucrada en la respuesta inmune en el carcinoma hepatocelular, afectando a la infiltración de células inmunitarias y los marcadores de puntos de control inmunitario, como PD-1 y CTLA4, en el este tipo de tumor. Además, la alta expresión de *ELOVL1* podría asociarse a la inestabilidad de microsatélites (MSI), la carga mutacional tumoral (TMB) y mutaciones de oncogenes como *TP53*, haciendo a este tipo de tumor insensible a la inmunoterapia (Y. Zhang et al., 2022).

Todas estas observaciones sugieren que las elongasas juegan un papel oncogénico común al modificar el metabolismo lipídico de las células tumorales. Alteraciones en la expresión o actividad de estas enzimas pueden modificar la homeostasis lipídica, afectando tanto la proliferación como la supervivencia celular. Estos hallazgos subrayan el potencial de desarrollar terapias dirigidas que bloqueen la actividad de las enzimas ELOVLs, en particular ELOVL6 y ELOVL1, para alterar el metabolismo lipídico de las células cancerosas y ofrecer nuevas vías de intervención terapéutica.

Como hemos mencionado, el papel que tienen las elongasas en cáncer estaba escasamente estudiado. Sin embargo, recientemente parece estar cobrando mayor relevancia. Por ello, cabe destacar que nuestro estudio exploratorio sobre los niveles de expresión de *ELOVL6* en las 33 cohortes incluidas en el TCGA, revela que esta elongasa se encuentra sobre expresada significativamente, sin incluir el adenocarcinoma ductal de páncreas, en nueve de ellos (carcinoma invasivo de mama, adenocarcinoma de colon, cistoadenocarcinoma seroso de ovario, adenocarcinoma rectal, adenocarcinoma de estómago, tumores testiculares de células germinales, timoma, carcinoma endometrial del cuerpo uterino y carcinosarcoma uterino). Cabe destacar cómo ocho de estos nueve tumores afectan a órganos del aparato digestivo, como el páncreas, o a órganos cuyas células son sensibles a las hormonas sexuales (estrógenos, progestinas y andrógenos), las cuales son mensajeros químicos que por su naturaleza forman parte de un grupo de compuestos denominados esteroides, es decir, se trata de lípidos (Hellberg, 2012; Hemelrijck et al., 2019; Nandi et al., 1995; Zook et al., 2001). Del mismo modo, esta enzima tiene una expresión menor en la leucemia mieloide aguda con respecto a la situación normal.

La investigación sobre la expresión de otras elongasas de la familia en los diferentes tipos de cáncer podría ofrecer nuevas dianas terapéuticas contra las que dirigir tratamientos, y este es aún un campo muy inexplorado y con potencial de explotación, sobre todo teniendo en cuenta el auge de la medicina personalizada y las terapias dirigidas.

En esta misma línea, la inhibición de la lipogénesis ha demostrado ventajas notables en el tratamiento del cáncer. En diversas investigaciones, se ha demostrado que la inhibición de enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos, como la acetil-CoA carboxilasa (ACCA) o la ATP citrato liasa (ACLY), puede limitar el crecimiento tumoral (Broadfield et al., 2021). De acuerdo con estos descubrimientos, algunos inhibidores

han progresado incluso hasta fases preclínicas. Sin embargo, su potencial en el adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) permanece en gran medida inexplorado, por lo que es necesaria una mayor investigación (Yin et al., 2022).

De estos inhibidores, los de la sintasa de ácidos grasos (FASN) en particular se han sometido a pruebas en el adenocarcinoma ductal pancreático, revelando un efecto sinérgico con la gemcitabina tanto en modelos celulares como de ratón, lo que lleva al estrés del retículo endoplásmico y, en última instancia, a la apoptosis de las células tumorales (Sokolowska et al., 2017; Tadros et al., 2017; Ventura et al., 2015).

Asimismo, estos inhibidores de FASN han demostrado sinergia con paclitaxel (Heuer et al., 2016), en consonancia con nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* utilizando el inhibidor de ELOVL6.

Sin embargo, otros inhibidores de enzimas participantes en las rutas de síntesis de ácidos grasos, como pueden ser los dirigidos a la acetil-CoA carboxilasa (ACCA) o a la ATP citrato liasa (ACLY), a pesar de resultar eficaces, están pendientes de ser probados en el ADP (Broadfield et al., 2021).

En este sentido, la combinación de inhibidores de la lipogénesis con la interferencia de ELOVL6 podría potenciar el efecto de los tratamientos actuales y emergentes, como la inmunoterapia, abriendo nuevas vías terapéuticas en el ADP.

Interferir ELOVL6 para alterar selectivamente las membranas celulares de las células tumorales podría mejorar potencialmente la administración de fármacos quimioterapéuticos, y podría servir como una valiosa estrategia para combatir la resistencia a los mismos y superar las alteraciones en la composición de las membranas.

Ciertamente, está surgiendo un campo en evolución, centrado en la investigación de la composición de la membrana plasmática de las células tumorales y su modificación para el desarrollo de nuevos fármacos que mejoren su eficacia (Escribá, 2017; Escribá et al., 2015; Zalba & Ten Hagen, 2017).

Aunque la inhibición de ELOVL6 ofrece un enfoque terapéutico prometedor, es importante considerar los efectos secundarios potenciales de su uso. *ELOVL6* se expresa no solo en las células tumorales, sino también en órganos como el hígado, donde desempeña un papel crucial en el metabolismo de los lípidos.

A pesar de ello, es cierto que la sobre expresión de *ELOVL6* en el contexto del carcinoma hepatocelular resulta un marcador de mal pronóstico, al igual que en el adenocarcinoma ductal de páncreas, y que su silenciamiento también reduce la progresión de este tipo de tumor (Y.-C. Su et al., 2018). En cualquier caso, la inhibición sistémica de esta enzima o de otros miembros de su familia podría conducir a disfunciones hepáticas, alteraciones en los perfiles lipídicos y problemas metabólicos.

En consecuencia, se requieren estudios adicionales para evaluar la seguridad de los inhibidores de *ELOVL6* a largo plazo, con el fin de minimizar los efectos adversos y maximizar el beneficio terapéutico en pacientes con ADP. Estas consideraciones son esenciales para el desarrollo de inhibidores específicos que puedan dirigirse de manera selectiva a las células tumorales sin afectar a los tejidos sanos.

Es importante señalar que la acción sobre *ELOVL6* puede aportar beneficios terapéuticos a los pacientes caracterizados por niveles elevados de *c-MYC*, vinculados a la activación de *KRAS*, así como por aumentos y amplificaciones del número de copias. Sin embargo, es importante abordar esta estrategia con cautela, ya que, como se ha mencionado, los inhibidores también podrían afectar a la actividad de *ELOVL6* en otros órganos, como el hígado, donde *ELOVL6* se expresa en gran medida.

Futuras investigaciones deberían enfocarse en la combinación de inhibidores de *ELOVL6* con terapias estándar como la quimioterapia o las inmunoterapias. Además, es crucial explorar la posibilidad de identificar marcadores específicos que permitan seleccionar pacientes con ADP que se beneficiarían más de este enfoque terapéutico. La identificación de estos subgrupos, basada en la expresión de *c-MYC* o *KRAS*, mejoraría la estratificación de los pacientes, permitiendo una terapia más personalizada y eficaz, mejorando su supervivencia y reduciendo los efectos adversos. Las investigaciones clínicas futuras determinarán la viabilidad y seguridad de estas nuevas estrategias terapéuticas (Chu et al., 2007).

En resumen, las opciones terapéuticas actuales para tratar el adenocarcinoma ductal pancreático son muy limitadas, lo que subraya la necesidad inminente de identificar nuevas dianas.

Además, queda aún mucho por explorar en el campo de la elongación de ácidos grasos, sobre activada durante la lipogénesis *de novo* en gran variedad de tumores, y nuestra investigación, en medio de un campo en auge, ha arrojado luz sobre lo prometedora que

resulta la interferencia de este proceso, abriendo las puertas a un amplio espectro de posibilidades.

La síntesis lipídica se erige como un aspecto crucial de la progresión tumoral, presentando un campo inexplorado en el tratamiento del cáncer. Nuestros hallazgos posicionan a ELOVL6 como una nueva diana terapéutica, mostrando la eficacia de su inhibición química en el ADP.

CONCLUSIONES

*“Después de todo, ¿qué es un científico entonces?
Es un hombre curioso que mira a través del ojo de
una cerradura, la cerradura de la naturaleza,
tratando de saber qué es lo que sucede”*

Jacques Yves Cousteau (1910-1997)



En base a los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. El oncogén **c-MYC induce la expresión de las diferentes elongasas de ácidos grasos de cadena muy larga (ELOVLs)**, siendo reclutado directamente a sus promotores.
2. Esta inducción se acentúa durante la transformación celular y la progresión tumoral, de modo que **en el adenocarcinoma ductal de páncreas se sobre expresan significativamente ELOVL1, ELOVL5, y notablemente, ELOVL6**, con una localización específica en el compartimento tumoral.
3. ELOVL6 presenta un papel fundamental en los procesos de **proliferación y migración celular**.
4. La interferencia genética o química de ELOVL6 ejerce un **profundo impacto en la elongación de ácidos grasos**, lo que en última instancia conduce a un cambio en el panorama lipidómico de las células, **modulando la composición de la membrana plasmática**.
5. Dicho cambio en la composición lipídica de la membrana resulta en un **menor espesor de la misma**.
6. ELOVL6 es crucial en la regulación de **las propiedades mecánicas de la membrana plasmática y su permeabilidad**, influyendo tanto en la entrada pasiva de sustancias como en la pinocitosis.
7. La interferencia de ELOVL6 **sinergiza con el tratamiento con Abraxane**, ofreciendo una nueva perspectiva terapéutica mediante la combinación de quimioterapia con la inhibición de ELOVL6.
8. Los efectos de la interferencia de ELOVL6 en la permeabilidad de la membrana celular están intrínsecamente ligados a los niveles de expresión de *c-MYC* y *ELOVL6* en la célula, resaltando la **dependencia del tumor del eje c-MYC/ELOVL6**.
9. La interferencia de ELOVL6 **sinergiza con Abraxane *in vivo***, culminando en una **respuesta antitumoral robusta y prometedora**.

10. **ELOVL1 valida el potencial terapéutico de la interferencia de las elongasas** de ácidos grasos de cadena muy larga en el adenocarcinoma ductal de páncreas.

BIBLIOGRAFÍA

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”

Marie Curie (1867-1934)



- Alcoriza-Balaguer, M. I., García-Cañaveras, J. C., Benet, M., Juan-Vidal, O., & Lahoz, A. (2023). FAMetA: A mass isotopologue-based tool for the comprehensive analysis of fatty acid metabolism. *Briefings in Bioinformatics*, 24(2), bbad064. <https://doi.org/10.1093/bib/bbad064>
- Alcoriza-Balaguer, M. I., García-Cañaveras, J. C., Ripoll-Esteve, F. J., Roca, M., & Lahoz, A. (2022). LipidMS 3.0: An R-package and a web-based tool for LC-MS/MS data processing and lipid annotation. *Bioinformatics*, 38(20), 4826-4828. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac581>
- Ameer, F., Scandiuizzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., & Zaidi, N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*, 63(7), 895-902. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.04.003>
- Atkinson, M. A., Campbell-Thompson, M., Kusmartseva, I., & Kaestner, K. H. (2020). Organisation of the human pancreas in health and in diabetes. *Diabetologia*, 63(10), 1966-1973. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05203-7>
- Barabas, P., Liu, A., Xing, W., Chen, C.-K., Tong, Z., Watt, C. B., Jones, B. W., Bernstein, P. S., & Križaj, D. (2013). Role of ELOVL4 and very long-chain polyunsaturated fatty acids in mouse models of Stargardt type 3 retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(13), 5181-5186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214707110>
- Bardeesy, N., & DePinho, R. A. (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer*, 2(12), 897-909. <https://doi.org/10.1038/nrc949>
- Bazira, P. J., & Mahadevan, V. (2022). Anatomy of the pancreas and spleen. *Surgery (Oxford)*, 40(4), 213-218. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2022.02.002>

- Becker, S., Kuznetsov, A. V., Zhao, D., de Monte, F., & Pontrelli, G. (2022). Model of drug delivery to populations composed of two cell types. *Journal of Theoretical Biology*, 534, 110947. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2021.110947>
- Beger, H. G., Buchler, M. W., Kozarek, R., Lerch, M. M., Neoptolemos, J. P., Warshaw, A. L., Whitcomb, D. C., & Shiratori, K. (2009). *The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery: Vol. Anatomy, Histology, and Fine Structure of the Pancreas* (pp. 10-23; 3rd ed.). John Wiley & Sons Ltd.
- Behrens, G., Jochem, C., Schmid, D., Keimling, M., Ricci, C., & Leitzmann, M. F. (2015). Physical activity and risk of pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Epidemiology*, 30(4), 279-298. <https://doi.org/10.1007/s10654-015-0014-9>
- Bernardes, N., & M. Fialho, A. (2018). Perturbing the Dynamics and Organization of Cell Membrane Components: A New Paradigm for Cancer-Targeted Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3871. <https://doi.org/10.3390/ijms19123871>
- Bernstein, N. J., Fong, N. L., Lam, I., Roy, M. A., Hendrickson, D. G., & Kelley, D. R. (2020). Solo: Doublet Identification in Single-Cell RNA-Seq via Semi-Supervised Deep Learning. *Cell Systems*, 11(1), 95-101.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2020.05.010>
- Bhattacharyya, S., Oon, C., Kothari, A., Horton, W., Link, J., Sears, R. C., & Sherman, M. H. (2020). Acidic fibroblast growth factor underlies microenvironmental regulation of MYC in pancreatic cancer. *Journal of Experimental Medicine*, 217(8), e20191805. <https://doi.org/10.1084/jem.20191805>
- Bijlsma, M. F., & van Laarhoven, H. W. M. (2015). The conflicting roles of tumor stroma in pancreatic cancer and their contribution to the failure of clinical trials: A

- systematic review and critical appraisal. *Cancer and Metastasis Reviews*, 34(1), 97-114. <https://doi.org/10.1007/s10555-014-9541-1>
- Boroughs, L. K., & DeBerardinis, R. J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nature cell biology*, 17(4), 351-359. <https://doi.org/10.1038/ncb3124>
- Bosetti, C., Lucenteforte, E., Silverman, D. T., Petersen, G., Bracci, P. M., Ji, B. T., Negri, E., Li, D., Risch, H. A., Olson, S. H., Gallinger, S., Miller, A. B., Bueno-de-Mesquita, H. B., Talamini, R., Polesel, J., Ghadirian, P., Baghurst, P. A., Zatonski, W., Fontham, E., ... La Vecchia, C. (2012). Cigarette smoking and pancreatic cancer: An analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Annals of Oncology*, 23(7), 1880-1888. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr541>
- Broadfield, L. A., Pane, A. A., Talebi, A., Swinnen, J. V., & Fendt, S.-M. (2021). Lipid metabolism in cancer: New perspectives and emerging mechanisms. *Developmental Cell*, 56(10), 1363-1393. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.04.013>
- Carioli, G., Malvezzi, M., Bertuccio, P., Boffetta, P., Levi, F., La Vecchia, C., & Negri, E. (2021). European cancer mortality predictions for the year 2021 with focus on pancreatic and female lung cancer. *Annals of Oncology*, 32(4), 478-487. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.01.006>
- Carmona-Antoñanzas, G., Tocher, D. R., Martinez-Rubio, L., & Leaver, M. J. (2014). Conservation of lipid metabolic gene transcriptional regulatory networks in fish and mammals. *Gene*, 534(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.040>
- Carrer, A., Trefely, S., Zhao, S., Campbell, S. L., Norgard, R. J., Schultz, K. C., Sidoli, S., Parris, J. L. D., Affronti, H. C., Sivanand, S., Egolf, S., Sela, Y., Trizzino, M.,

- Gardini, A., Garcia, B. A., Snyder, N. W., Stanger, B. Z., & Wellen, K. E. (2019). Acetyl-CoA Metabolism Supports Multistep Pancreatic Tumorigenesis. *Cancer Discovery*, 9(3), 416-435. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0567>
- Centenera, M. M., Scott, J. S., Machiels, J., Nassar, Z. D., Miller, D. C., Zinonos, I., Dehairs, J., Burvenich, I. J. G., Zadra, G., Chetta, P. M., Bango, C., Evergren, E., Ryan, N. K., Gillis, J. L., Mah, C. Y., Tieu, T., Hanson, A. R., Carelli, R., Bloch, K., ... Butler, L. M. (2021). ELOVL5 Is a Critical and Targetable Fatty Acid Elongase in Prostate Cancer. *Cancer Research*, 81(7), 1704-1718. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2511>
- Chen, H., Liu, H., & Qing, G. (2018). Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3, 5. <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0008-7>
- Chu, G. C., Kimmelman, A. C., Hezel, A. F., & DePinho, R. A. (2007). Stromal biology of pancreatic cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(4), 887-907. <https://doi.org/10.1002/jcb.21209>
- Cohen, R., Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Faivre, S., De Gramont, A., & Raymond, E. (2015). Targeting cancer cell metabolism in pancreatic adenocarcinoma. *Oncotarget*, 6(19), 16832-16847. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4160>
- Commisso, C., Davidson, S. M., Soydaner-Azeloglu, R. G., Parker, S. J., Kamphorst, J. J., Hackett, S., Grabocka, E., Nofal, M., Drebin, J. A., Thompson, C. B., Rabinowitz, J. D., Metallo, C. M., Vander Heiden, M. G., & Bar-Sagi, D. (2013). Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature*, 497(7451), 633-637. <https://doi.org/10.1038/nature12138>
- Cullis, J., Siolas, D., Avanzi, A., Barui, S., Maitra, A., & Bar-Sagi, D. (2017). Macropinocytosis of Nab-paclitaxel Drives Macrophage Activation in Pancreatic

- Cancer. *Cancer Immunology Research*, 5(3), 182-190.
<https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0125>
- Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C., & Farese, R. V. (2013). Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metabolism*, 18(2), 153-161.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.017>
- Czumaj, A., Kobiela, J., Mika, A., Pappou, E., & Śledziński, T. (2023). The Effect of Silencing Fatty Acid Elongase 4 and 6 Genes on the Proliferation and Migration of Colorectal Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), 17615. <https://doi.org/10.3390/ijms242417615>
- Dang, C. V. (2012). MYC on the Path to Cancer. *Cell*, 149(1), 22-35.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.003>
- de Laat, V., Topal, H., Spotbeen, X., Talebi, A., Dehairs, J., Idkowiak, J., Vanderhoydonc, F., Ostin, T., Zhao, P., Jacquemyn, M., Wölk, M., Sablina, A., Augustyns, K., Vanden Berghe, T., Roskams, T., Daelemans, D., Fedorova, M., Topal, B., & Swinnen, J. V. (2024). Intrinsic temperature increase drives lipid metabolism towards ferroptosis evasion and chemotherapy resistance in pancreatic cancer. *Nature Communications*, 15(1), 8540. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52978-z>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Du, A., Wang, Z., Huang, T., Xue, S., Jiang, C., Qiu, G., & Yuan, K. (2023). Fatty acids in cancer: Metabolic functions and potential treatment. *MedComm – Oncology*, 2(1), e25. <https://doi.org/10.1002/mog2.25>

- Erkan, M., Reiser-Erkan, C., Michalski, C. W., Deucker, S., Sauliunaite, D., Streit, S., Esposito, I., Friess, H., & Kleeff, J. (2009). Cancer-Stellate Cell Interactions Perpetuate the Hypoxia-Fibrosis Cycle in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Neoplasia*, *11*(5), 497-508. <https://doi.org/10.1593/neo.81618>
- Escribá, P. V. (2017). Membrane-lipid therapy: A historical perspective of membrane-targeted therapies — From lipid bilayer structure to the pathophysiological regulation of cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1859*(9), 1493-1506. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.017>
- Escribá, P. V., Busquets, X., Inokuchi, J., Balogh, G., Török, Z., Horváth, I., Harwood, J. L., & Vígh, L. (2015). Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Progress in Lipid Research*, *59*, 38-53. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.04.003>
- Fang, Z., Liu, X., & Peltz, G. (2022). GSEApY: A comprehensive package for performing gene set enrichment analysis in Python. *Bioinformatics*, *39*(1), btac757. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac757>
- Fantini, J. (2023). Lipid rafts and human diseases: Why we need to target gangliosides. *FEBS Open Bio*, *13*(9), 1636-1650. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13612>
- Feng, Y.-H., Chen, W.-Y., Kuo, Y.-H., Tung, C.-L., Tsao, C.-J., Shiau, A.-L., & Wu, C.-L. (2016). Elovl6 is a poor prognostic predictor in breast cancer. *Oncology Letters*, *12*(1), 207-212. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4587>
- Frallicciardi, J., Melcr, J., Siginou, P., Marrink, S. J., & Poolman, B. (2022). Membrane thickness, lipid phase and sterol type are determining factors in the permeability of membranes to small solutes. *Nature Communications*, *13*(1), 1605. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29272-x>

- Gardner, E. R., Dahut, W., & Figg, W. D. (2008). Quantitative determination of total and unbound paclitaxel in human plasma following Abraxane treatment. *Journal of Chromatography B*, 862(1-2), 213-218. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.12.013>
- Gayoso, A., Lopez, R., Xing, G., Boyeau, P., Valiollah Pour Amiri, V., Hong, J., Wu, K., Jayasuriya, M., Mehlman, E., Langevin, M., Liu, Y., Samaran, J., Misrachi, G., Nazaret, A., Clivio, O., Xu, C., Ashuach, T., Gabitto, M., Lotfollahi, M., ... Yosef, N. (2022). A Python library for probabilistic analysis of single-cell omics data. *Nature Biotechnology*, 40(2), 163-166. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01206-w>
- Genkinger, J. M., Kitahara, C. M., Bernstein, L., Berrington De Gonzalez, A., Brotzman, M., Elena, J. W., Giles, G. G., Hartge, P., Singh, P. N., Stolzenberg-Solomon, R. Z., Weiderpass, E., Adami, H.-O., Anderson, K. E., Beane-Freeman, L. E., Buring, J. E., Fraser, G. E., Fuchs, C. S., Gapstur, S. M., Gaziano, J. M., ... Jacobs, E. J. (2015). Central adiposity, obesity during early adulthood, and pancreatic cancer mortality in a pooled analysis of cohort studies. *Annals of Oncology*, 26(11), 2257-2266. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv355>
- Gimple, R. C., Kidwell, R. L., Kim, L. J. Y., Sun, T., Gromovsky, A. D., Wu, Q., Wolf, M., Lv, D., Bhargava, S., Jiang, L., Prager, B. C., Wang, X., Ye, Q., Zhu, Z., Zhang, G., Dong, Z., Zhao, L., Lee, D., Bi, J., ... Rich, J. N. (2019). Glioma Stem Cell-Specific Superenhancer Promotes Polyunsaturated Fatty-Acid Synthesis to Support EGFR Signaling. *Cancer Discovery*, 9(9), 1248-1267. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0061>
- Gopal, S. M., Pawar, A. B., Wassenaar, T. A., & Sengupta, D. (2020). Lipid-dependent conformational landscape of the ErbB2 growth factor receptor dimers. *Chemistry*

and Physics of Lipids, 230, 104911.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104911>

Gouw, A. M., Margulis, K., Liu, N. S., Raman, S. J., Mancuso, A., Toal, G. G., Tong, L., Mosley, A., Hsieh, A. L., Sullivan, D. K., Stine, Z. E., Altman, B. J., Schulze, A., Dang, C. V., Zare, R. N., & Felsher, D. W. (2019). The MYC Oncogene Cooperates with Sterol-Regulated Element-Binding Protein to Regulate Lipogenesis Essential for Neoplastic Growth. *Cell Metabolism*, 30(3), 556-572.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.07.012>

Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Cañamero, M., Grippo, P. J., Verdaguer, L., Pérez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E. P., & Barbacid, M. (2007). Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. *Cancer Cell*, 11(3), 291-302. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.012>

Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P. G. P., & Jacobsson, A. (2010). The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Progress in Lipid Research*, 49(2), 186-199. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.12.002>

Guo, D., Bell, E. H., & Chakravarti, A. (2013). Lipid metabolism emerges as a promising target for malignant glioma therapy. *CNS Oncology*, 2(3), 289-299. <https://doi.org/10.2217/cns.13.20>

Hama, K., Fujiwara, Y., Hayama, T., Ozawa, T., Nozawa, K., Matsuda, K., Hashiguchi, Y., & Yokoyama, K. (2021). Very long-chain fatty acids are accumulated in triacylglycerol and nonesterified forms in colorectal cancer tissues. *Scientific Reports*, 11(1), 6163. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85603-w>

- Han, W., Gao, S., Barrett, D., Ahmed, M., Han, D., Macoska, J. A., He, H. H., & Cai, C. (2018). Reactivation of androgen receptor-regulated lipid biosynthesis drives the progression of castration-resistant prostate cancer. *Oncogene*, *37*(6), 710-721. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.385>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Harayama, T., & Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(5), 281-296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>
- Heberle, F. A., Petruzielo, R. S., Pan, J., Drazba, P., Kučerka, N., Standaert, R. F., Feigenson, G. W., & Katsaras, J. (2013). Bilayer Thickness Mismatch Controls Domain Size in Model Membranes. *Journal of the American Chemical Society*, *135*(18), 6853-6859. <https://doi.org/10.1021/ja3113615>
- Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y. C., Laslo, P., Cheng, J. X., Murre, C., Singh, H., & Glass, C. K. (2010). Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Molecular cell*, *38*(4), 576-589. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.004>
- Helfrich, W. (1973). Elastic Properties of Lipid Bilayers: Theory and Possible Experiments. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *28*(11-12), 693-703. <https://doi.org/10.1515/znc-1973-11-1209>
- Hellberg, D. (2012). Sex Steroids and Cervical Cancer. *Anticancer Research*, *32*(8), 3045-3054.
- Hemelrijck, M. V., Sollie, S., Nelson, W. G., Yager, J. D., Kanarek, N. F., Dobs, A., Platz, E. A., & Rohrmann, S. (2019). Selenium and sex steroid hormones in a US

nationally representative sample of men: A role for the link between selenium and estradiol in prostate carcinogenesis? *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 28(3), 578-583. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-18-0520>

Hendrich, A., & Michalak, K. (2003). Lipids as a Target for Drugs Modulating Multidrug Resistance of Cancer Cells. *Current Drug Targets*, 4(1), 23-30. <https://doi.org/10.2174/1389450033347172>

Hessmann, E., Schneider, G., Ellenrieder, V., & Siveke, J. T. (2016). MYC in pancreatic cancer: Novel mechanistic insights and their translation into therapeutic strategies. *Oncogene*, 35(13), 1609-1618. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.216>

Heuer, T. S., Ventura, R., Mordec, K., Lai, J., Fridlib, M., Buckley, D., & Kemble, G. (2016). FASN Inhibition and Taxane Treatment Combine to Enhance Anti-tumor Efficacy in Diverse Xenograft Tumor Models through Disruption of Tubulin Palmitoylation and Microtubule Organization and FASN Inhibition-Mediated Effects on Oncogenic Signaling and Gene Expression. *EBioMedicine*, 16, 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.12.012>

Hilvo, M., Denkert, C., Lehtinen, L., Müller, B., Brockmüller, S., Seppänen-Laakso, T., Budczies, J., Bucher, E., Yetukuri, L., Castillo, S., Berg, E., Nygren, H., Sysi-Aho, M., Griffin, J. L., Fiehn, O., Loibl, S., Richter-Ehrenstein, C., Radke, C., Hyötyläinen, T., ... Orešič, M. (2011). Novel Theranostic Opportunities Offered by Characterization of Altered Membrane Lipid Metabolism in Breast Cancer Progression. *Cancer Research*, 71(9), 3236-3245. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3894>

- Howard, J. M., & Hess, W. (2002). *History of the Pancreas: Mysteries of a Hidden Organ* (1.^a ed.). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0555-6>
- Hruban, R. H., Wilentz, R. E., & Maitra, A. (2005). Identification and Analysis of Precursors to Invasive Pancreatic Cancer. En G. H. Su (Ed.), *Pancreatic Cancer: Methods and Protocols* (pp. 1-13). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-780-7:001>
- Hryniewicz-Jankowska, A., Augoff, K., Biernatowska, A., Podkalicka, J., & Sikorski, A. F. (2014). Membrane rafts as a novel target in cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1845(2), 155-165. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.01.006>
- Iizuka, K., Takao, K., & Yabe, D. (2020). ChREBP-Mediated Regulation of Lipid Metabolism: Involvement of the Gut Microbiota, Liver, and Adipose Tissue. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 587189. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.587189>
- Ikeda, M., Kanao, Y., Yamanaka, M., Sakuraba, H., Mizutani, Y., Igarashi, Y., & Kihara, A. (2008). Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis. *FEBS Letters*, 582(16), 2435-2440. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.06.007>
- Ilic, I., & Ilic, M. (2022). International patterns in incidence and mortality trends of pancreatic cancer in the last three decades: A joinpoint regression analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 28(32), 4698-4715. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i32.4698>
- Ishihara, N., Suzuki, S., Tanaka, S., Watanabe, Y., Nagayama, D., Saiki, A., Tanaka, T., & Tatsuno, I. (2017). Atorvastatin increases Fads1, Fads2 and Elovl5 gene expression via the geranylgeranyl pyrophosphate-dependent Rho kinase

- pathway in 3T3-L1 cells. *Molecular Medicine Reports*, 16(4), 4756-4762.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7141>
- Isokawa, M., Sassa, T., Hattori, S., Miyakawa, T., & Kihara, A. (2019). Reduced chain length in myelin sphingolipids and poorer motor coordination in mice deficient in the fatty acid elongase *Elovl1*. *FASEB BioAdvances*, 1(12), 747-759.
<https://doi.org/10.1096/fba.2019-00067>
- Istiqamah, N., Matsuzaka, T., Shimizu, M., Motomura, K., Ohno, H., Hasebe, S., Sharma, R., Okajima, Y., Matsuda, E., Han, S.-I., Mizunoe, Y., Osaki, Y., Aita, Y., Suzuki, H., Sone, H., Takeuchi, Y., Sekiya, M., Yahagi, N., Nakagawa, Y., & Shimano, H. (2023). Identification of key microRNAs regulating ELOVL6 and glioblastoma tumorigenesis. *BBA Advances*, 3, 100078.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2023.100078>
- Jakobsson, A., Westerberg, R., & Jacobsson, A. (2006). Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Progress in Lipid Research*, 45(3), 237-249. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.004>
- Jørgensen, J. A., Zadavec, D., & Jacobsson, A. (2007). Norepinephrine and rosiglitazone synergistically induce *Elovl3* expression in brown adipocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293(5), E1159-E1168. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00213.2007>
- Kamphorst, J. J., Nofal, M., Commisso, C., Hackett, S. R., Lu, W., Grabocka, E., Vander Heiden, M. G., Miller, G., Drebin, J. A., Bar-Sagi, D., Thompson, C. B., & Rabinowitz, J. D. (2015). Human Pancreatic Cancer Tumors Are Nutrient Poor and Tumor Cells Actively Scavenge Extracellular Protein. *Cancer Research*, 75(3), 544-553. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2211>

- Kang, Y. P., Yoon, J.-H., Long, N. P., Koo, G.-B., Noh, H.-J., Oh, S.-J., Lee, S. B., Kim, H. M., Hong, J. Y., Lee, W. J., Lee, S. J., Hong, S.-S., Kwon, S. W., & Kim, Y.-S. (2019). Spheroid-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Provokes Global Alterations of Breast Cancer Lipidome: A Multi-Layered Omics Analysis. *Frontiers in Oncology*, 9, 145. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00145>
- Kasuga, A., Okamoto, T., Udagawa, S., Mori, C., Mie, T., Furukawa, T., Yamada, Y., Takeda, T., Matsuyama, M., Sasaki, T., Ozaka, M., Ueki, A., & Sasahira, N. (2022). Molecular Features and Clinical Management of Hereditary Pancreatic Cancer Syndromes and Familial Pancreatic Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ijms23031205>
- Kieu, T.-L.-V., Pierre, L., Derangère, V., Perrey, S., Truntzer, C., Jalil, A., Causse, S., Groetz, E., Dumont, A., Guyard, L., Arnould, L., De Barros, J.-P. P., Apetoh, L., Rébé, C., Limagne, E., Jourdan, T., Demizieux, L., Masson, D., Thomas, C., ... Rialland, M. (2022). Downregulation of Elovl5 promotes breast cancer metastasis through a lipid-droplet accumulation-mediated induction of TGF- β receptors. *Cell Death & Disease*, 13(9), 758. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05209-6>
- Kihara, A. (2012). Very long-chain fatty acids: Elongation, physiology and related disorders. *Journal of Biochemistry*, 152(5), 387-395. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs105>
- Kiyoki, Y., Kato, T., Kito, S., Matsuzaka, T., Morioka, S., Sasaki, J., Makishima, K., Sakamoto, T., Nishikii, H., Obara, N., Sakata-Yanagimoto, M., Sasaki, T., Shimano, H., & Chiba, S. (2023). The fatty acid elongase Elovl6 is crucial for hematopoietic stem cell engraftment and leukemia propagation. *Leukemia*, 37(4), 910-913. <https://doi.org/10.1038/s41375-023-01842-y>

- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C. D., Biankin, A. V., Neale, R. E., Tempero, M., Tuveson, D. A., Hruban, R. H., & Neoptolemos, J. P. (2016). Pancreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16022. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>
- Kong, B., Cheng, T., Wu, W., Regel, I., Raulefs, S., Friess, H., Erkan, M., Esposito, I., Kleeff, J., & Michalski, C. W. (2015). Hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress characterizes a necrotic phenotype of pancreatic cancer. *Oncotarget*, 6(31), 32154-32160. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5168>
- Kong, L., Dawkins, E., Campbell, F., Winkler, E., Derks, R. J. E., Giera, M., Kamp, F., Steiner, H., & Kros, A. (2020). Photo-controlled delivery of very long chain fatty acids to cell membranes and modulation of membrane protein function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(5), 183200. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183200>
- Kortlever, R. M., Sodir, N. M., Wilson, C. H., Burkhart, D. L., Pellegrinet, L., Brown Swigart, L., Littlewood, T. D., & Evan, G. I. (2017). Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression. *Cell*, 171(6), 1301-1315.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.013>
- Kyselová, L., Vítová, M., & Řezanka, T. (2022). Very long chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 87, 101180. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101180>
- Lai, K. Z. H., Yehia, N. A., Semnani-Azad, Z., Mejia, S. B., Boucher, B. A., Malik, V., Bazinet, R. P., & Hanley, A. J. (2023). Lifestyle Factors Associated with Circulating Very Long-Chain Saturated Fatty Acids in Humans: A Systematic Review of Observational Studies. *Advances in Nutrition*, 14(1), 99-114. <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2022.10.004>

- Law, J. O., Jones, C. M., Stevenson, T., Williamson, T. A., Turner, M. S., Kusumaatmaja, H., & Grellscheid, S. N. (2023). A bending rigidity parameter for stress granule condensates. *Science Advances*, 9(20), eadg0432. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg0432>
- Le, A. H., & Machesky, L. M. (2022). Image-based Quantification of Macropinocytosis Using Dextran Uptake into Cultured Cells. *Bio-protocol*, 12(7), e4367. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4367>
- Leonard, A. E., Bobik, E. G., Dorado, J., Kroeger, P. E., Chuang, L.-T., Thurmond, J. M., Parker-Barnes, J. M., Das, T., Huang, Y.-S., & Mukerji, P. (2000). *Cloning of a human cDNA encoding a novel enzyme involved in the elongation of long-chain polyunsaturated fatty acids.*
- Li, B., Qin, Y., Yu, X., Xu, X., & Yu, W. (2022). Lipid raft involvement in signal transduction in cancer cell survival, cell death and metastasis. *Cell Proliferation*, 55(1), e13167. <https://doi.org/10.1111/cpr.13167>
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2019). The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Research*, 47(8), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz114>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>

- Lim, J. P., & Gleeson, P. A. (2011). Macropinocytosis: An endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology & Cell Biology*, 89(8), 836-843. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.20>
- Lin, J., Yang, J., Xu, X., Wang, Y., Yu, M., & Zhu, Y. (2020). A robust 11-genes prognostic model can predict overall survival in bladder cancer patients based on five cohorts. *Cancer Cell International*, 20(1), 402. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01491-6>
- Lin, R., Tao, R., Gao, X., Li, T., Zhou, X., Guan, K.-L., Xiong, Y., & Lei, Q.-Y. (2013). Acetylation Stabilizes ATP-Citrate Lyase to Promote Lipid Biosynthesis and Tumor Growth. *Molecular cell*, 51(4), 506-518. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.002>
- Lipchick, B. C., Utley, A., Han, Z., Moparthy, S., Yun, D. H., Bianchi-Smiraglia, A., Wolff, D. W., Fink, E., Liu, L., Furdui, C. M., Lee, J., Lee, K. P., & Nikiforov, M. A. (2021). The fatty acid elongase ELOVL6 regulates bortezomib resistance in multiple myeloma. *Blood Advances*, 5(7), 1933-1946. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002578>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lucarelli, G., Ferro, M., Loizzo, D., Bianchi, C., Terracciano, D., Cantiello, F., Bell, L. N., Battaglia, S., Porta, C., Gernone, A., Perego, R. A., Maiorano, E., De Cobelli, O., Castellano, G., Vincenti, L., Ditunno, P., & Battaglia, M. (2020). Integration of Lipidomics and Transcriptomics Reveals Reprogramming of the Lipid Metabolism and Composition in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Metabolites*, 10(12), 509. <https://doi.org/10.3390/metabo10120509>

- Maitra, A., Adsay, N. V., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., De Marzo, A., Cameron, J. L., Yeo, C. J., & Hruban, R. H. (2003). Multicomponent Analysis of the Pancreatic Adenocarcinoma Progression Model Using a Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Tissue Microarray. *Modern Pathology*, *16*(9), 902-912. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000086072.56290.FB>
- Makohon-Moore, A. P., Zhang, M., Reiter, J. G., Bozic, I., Allen, B., Kundu, D., Chatterjee, K., Wong, F., Jiao, Y., Kohutek, Z. A., Hong, J., Attiyeh, M., Javier, B., Wood, L. D., Hruban, R. H., Nowak, M. A., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Iacobuzio-Donahue, C. A. (2017). Limited heterogeneity of known driver gene mutations among the metastases of individual patients with pancreatic cancer. *Nature Genetics*, *49*(3), 358-366. <https://doi.org/10.1038/ng.3764>
- Marien, E., Meister, M., Muley, T., Del Pulgar, T. G., Derua, R., Spraggins, J. M., Van De Plas, R., Vanderhoydonc, F., Machiels, J., Binda, M. M., Dehairs, J., Willette-Brown, J., Hu, Y., Dienemann, H., Thomas, M., Schnabel, P. A., Caprioli, R. M., Lacal, J. C., Waelkens, E., & Swinnen, J. V. (2016). Phospholipid profiling identifies acyl chain elongation as a ubiquitous trait and potential target for the treatment of lung squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, *7*(11), 12582-12597. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7179>
- Martinez-Lage, M., Torres-Ruiz, R., Puig-Serra, P., Moreno-Gaona, P., Martin, M. C., Moya, F. J., Quintana-Bustamante, O., Garcia-Silva, S., Carcaboso, A. M., Petazzi, P., Bueno, C., Mora, J., Peinado, H., Segovia, J. C., Menendez, P., & Rodriguez-Perales, S. (2020). In vivo CRISPR/Cas9 targeting of fusion oncogenes for selective elimination of cancer cells. *Nature Communications*, *11*(1), 5060. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18875-x>

- Martin-Perez, M., Urdiroz-Urricelqui, U., Bigas, C., & Benitah, S. A. (2022). The role of lipids in cancer progression and metastasis. *Cell Metabolism*, 34(11), 1675-1699. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.09.023>
- Matsuzaka, T. (2021). Role of fatty acid elongase Elovl6 in the regulation of energy metabolism and pathophysiological significance in diabetes. *Diabetology International*, 12(1), 68-73. <https://doi.org/10.1007/s13340-020-00481-3>
- McDonald, O. G., Li, X., Saunders, T., Tryggvadottir, R., Mentch, S. J., Warmoes, M. O., Word, A. E., Carrer, A., Salz, T. H., Natsume, S., Stauffer, K. M., Makohon-Moore, A., Zhong, Y., Wu, H., Wellen, K. E., Locasale, J. W., Iacobuzio-Donahue, C. A., & Feinberg, A. P. (2017). Epigenomic reprogramming during pancreatic cancer progression links anabolic glucose metabolism to distant metastasis. *Nature Genetics*, 49(3), 367-376. <https://doi.org/10.1038/ng.3753>
- Menendez, J. A., & Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7(10), 763-777. <https://doi.org/10.1038/nrc2222>
- Miller, D. M., Thomas, S. D., Islam, A., Muench, D., & Sedoris, K. (2012). C-Myc and Cancer Metabolism. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(20), 5546-5553. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0977>
- Molino, D., & Galli, T. (2014). Biogenesis and transport of membrane domains-potential implications in brain pathologies. *Biochimie*, 96, 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.014>
- Mollinedo, F., & Gajate, C. (2015). Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Advances in Biological Regulation*, 57, 130-146. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.10.003>

- Mollinedo, F., & Gajate, C. (2020). Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: Implications in tumor progression and therapy. *Journal of Lipid Research*, 61(5), 611-635. <https://doi.org/10.1194/jlr.TR119000439>
- Moon, Y.-A., & Horton, J. D. (2003). Identification of Two Mammalian Reductases Involved in the Two-carbon Fatty Acyl Elongation Cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 7335-7343. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211684200>
- Morigny, P., Houssier, M., Mairal, A., Ghilain, C., Mouisel, E., Benhamed, F., Masri, B., Recazens, E., Denechaud, P.-D., Tavernier, G., Caspar-Bauguil, S., Virtue, S., Sramkova, V., Monbrun, L., Mazars, A., Zanoun, M., Guilmeau, S., Barquissau, V., Beuzelin, D., ... Langin, D. (2018). Interaction between hormone-sensitive lipase and ChREBP in fat cells controls insulin sensitivity. *Nature Metabolism*, 1(1), 133-146. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0007-6>
- Muthalagu, N., Monteverde, T., Raffo-Iraolagoitia, X., Wiesheu, R., Whyte, D., Hedley, A., Laing, S., Kruspig, B., Upstill-Goddard, R., Shaw, R., Neidler, S., Rink, C., Karim, S. A., Gyuraszova, K., Nixon, C., Clark, W., Biankin, A. V., Carlin, L. M., Coffelt, S. B., ... Murphy, D. J. (2020). Repression of the Type I Interferon Pathway Underlies MYC- and KRAS-Dependent Evasion of NK and B Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discovery*, 10(6), 872-887. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0620>
- Naganuma, T., Sato, Y., Sassa, T., Ohno, Y., & Kihara, A. (2011). Biochemical characterization of the very long-chain fatty acid elongase ELOVL7. *FEBS Letters*, 585(20), 3337-3341. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.024>

- Nagarajan, S. R., Butler, L. M., & Hoy, A. J. (2021). The diversity and breadth of cancer cell fatty acid metabolism. *Cancer & Metabolism*, 9, 2. <https://doi.org/10.1186/s40170-020-00237-2>
- Nakhai, H., Siveke, J. T., Mendoza-Torres, L., & Schmid, R. M. (2008). Conditional inactivation of Myc impairs development of the exocrine pancreas. *Development*, 135(19), 3191-3196. <https://doi.org/10.1242/dev.017137>
- Nandi, S., Guzman, R. C., & Yang, J. (1995). Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: A unifying hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(9), 3650-3657.
- Navarro, S. (2014). Breve historia de la anatomía y fisiología de una recóndita y enigmática glándula llamada páncreas. *Gastroenterología y Hepatología*, 37(9), 527-534. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2014.06.007>
- Nie, L., Pascoa, T. C., Pike, A. C. W., Bushell, S. R., Quigley, A., Ruda, G. F., Chu, A., Cole, V., Speedman, D., Moreira, T., Shrestha, L., Mukhopadhyay, S. M. M., Burgess-Brown, N. A., Love, J. D., Brennan, P. E., & Carpenter, E. P. (2021). The structural basis of fatty acid elongation by the ELOVL elongases. *Nature Structural & Molecular Biology*, 28(6), 512-520. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00605-6>
- Notta, F., Chan-Seng-Yue, M., Lemire, M., Li, Y., Wilson, G. W., Connor, A. A., Denroche, R. E., Liang, S.-B., Brown, A. M. K., Kim, J. C., Wang, T., Simpson, J. T., Beck, T., Borgida, A., Buchner, N., Chadwick, D., Hafezi-Bakhtiari, S., Dick, J. E., Heisler, L., ... Gallinger, S. (2016). A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature*, 538(7625), 378-382. <https://doi.org/10.1038/nature19823>

- Ohno, Y., Suto, S., Yamanaka, M., Mizutani, Y., Mitsutake, S., Igarashi, Y., Sassa, T., & Kihara, A. (2010). ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(43), 18439-18444. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005572107>
- Peetla, C., Vijayaraghavalu, S., & Labhasetwar, V. (2013). Biophysics of Cell Membrane Lipids in Cancer Drug Resistance: Implications for Drug Transport and Drug Delivery with Nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, *65*(0), 10.1016/j.addr.2013.09.004. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.004>
- Peng, J., Sun, B.-F., Chen, C.-Y., Zhou, J.-Y., Chen, Y.-S., Chen, H., Liu, L., Huang, D., Jiang, J., Cui, G.-S., Yang, Y., Wang, W., Guo, D., Dai, M., Guo, J., Zhang, T., Liao, Q., Liu, Y., Zhao, Y.-L., ... Wu, W. (2019). Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Research*, *29*(9), 725-738. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0195-y>
- Perrotti, F., Rosa, C., Cicalini, I., Sacchetta, P., Del Boccio, P., Genovesi, D., & Pieragostino, D. (2016). Advances in Lipidomics for Cancer Biomarkers Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(12), 1992. <https://doi.org/10.3390/ijms17121992>
- Petrova, E., Scholz, A., Paul, J., Sturz, A., Haike, K., Siegel, F., Mumberg, D., & Liu, N. (2016). Acetyl-CoA carboxylase inhibitors attenuate WNT and Hedgehog signaling and suppress pancreatic tumor growth. *Oncotarget*, *8*(30), 48660-48670. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12650>
- Qin, C., Yang, G., Yang, J., Ren, B., Wang, H., Chen, G., Zhao, F., You, L., Wang, W., & Zhao, Y. (2020). Metabolism of pancreatic cancer: Paving the way to better

- anticancer strategies. *Molecular Cancer*, 19(1), 50.
<https://doi.org/10.1186/s12943-020-01169-7>
- Qin, L., Song, C., Yuan, F., Wang, X., Yang, Y., Ma, Y., & Chen, Z. (2024). ELOVL1 is upregulated and promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma through regulating PI3K-AKT-mTOR signaling. *Heliyon*, 10(15), e34961.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34961>
- Radzsheuskaya, A., Shlyueva, D., Müller, I., & Helin, K. (2016). Optimizing sgRNA position markedly improves the efficiency of CRISPR/dCas9-mediated transcriptional repression. *Nucleic Acids Research*, 44(18), e141-e141.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw583>
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Research*, 74(11), 2913-2921. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
- Ramírez, F., Ryan, D. P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A. S., Heyne, S., Dündar, F., & Manke, T. (2016). deepTools2: A next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research*, 44(Web Server issue), W160-W165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw257>
- Raphael, B. J., Hruban, R. H., Aguirre, A. J., Moffitt, R. A., Yeh, J. J., Stewart, C., Robertson, A. G., Cherniack, A. D., Gupta, M., Getz, G., Gabriel, S. B., Meyerson, M., Cibulskis, C., Fei, S. S., Hinoue, T., Shen, H., Laird, P. W., Ling, S., Lu, Y., ... Zenklusen, J. C. (2017). Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 32(2), 185-203.e13.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.007>

- Ren, B., Liu, X., & Suriawinata, A. A. (2019). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions: Histopathology, Cytopathology, and Molecular Pathology. *The American Journal of Pathology*, *189*(1), 9-21. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.10.004>
- Robichaud, P.-P., Munganyiki, J. E., Boilard, E., & Surette, M. E. (2018). Polyunsaturated fatty acid elongation and desaturation in activated human T-cells: ELOVL5 is the key elongase. *Journal of Lipid Research*, *59*(12), 2383-2396. <https://doi.org/10.1194/jlr.M090050>
- Rodríguez Gil, Y., Jiménez Sánchez, P., Muñoz Velasco, R., García García, A., & Sánchez-Arévalo Lobo, V. J. (2021). Molecular Alterations in Pancreatic Cancer: Transfer to the Clinic. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 2077. <https://doi.org/10.3390/ijms22042077>
- Rodríguez-García, R., López-Montero, I., Mell, M., Egea, G., Gov, N. S., & Monroy, F. (2015). Direct Cytoskeleton Forces Cause Membrane Softening in Red Blood Cells. *Biophysical Journal*, *108*(12), 2794-2806. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.05.005>
- Röhrig, F., & Schulze, A. (2016). The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *16*(11), 732-749. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.89>
- Rysman, E., Brusselmans, K., Scheys, K., Timmermans, L., Derua, R., Munck, S., Van Veldhoven, P. P., Waltregny, D., Daniëls, V. W., Machiels, J., Vanderhoydonc, F., Smans, K., Waelkens, E., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2010). De novo Lipogenesis Protects Cancer Cells from Free Radicals and Chemotherapeutics by Promoting Membrane Lipid Saturation. *Cancer Research*, *70*(20), 8117-8126. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3871>

- Sabò, A., Kress, T. R., Pelizzola, M., de Pretis, S., Gorski, M. M., Tesi, A., Morelli, M. J., Bora, P., Doni, M., Verrecchia, A., Tonelli, C., Fagà, G., Bianchi, V., Ronchi, A., Low, D., Müller, H., Guccione, E., Campaner, S., & Amati, B. (2014). Selective transcriptional regulation by Myc in cellular growth control and lymphomagenesis. *Nature*, 511(7510), 488-492. <https://doi.org/10.1038/nature13537>
- Saisho, Y., Butler, A. E., Meier, J. J., Monchamp, T., Allen-Auerbach, M., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2007). Pancreas volumes in humans from birth to age one hundred taking into account sex, obesity, and presence of type-2 diabetes. *Clinical Anatomy*, 20(8), 933-942. <https://doi.org/10.1002/ca.20543>
- Sánchez-Arévalo Lobo, V. J., Fernández, L. C., Carrillo-de-Santa-Pau, E., Richart, L., Cobo, I., Cendrowski, J., Moreno, U., Del Pozo, N., Megías, D., Bréant, B., Wright, C. V., Magnuson, M., & Real, F. X. (2017). C-Myc downregulation is required for preacinar to acinar maturation and pancreatic homeostasis. *Gut*, [gutjnl-2016-312306](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312306). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312306>
- Santos, C. R., & Schulze, A. (2012). Lipid metabolism in cancer. *The FEBS Journal*, 279(15), 2610-2623. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x>
- Sarantis, P., Koustas, E., Papadimitropoulou, A., Papavassiliou, A. G., & Karamouzis, M. V. (2020). Pancreatic ductal adenocarcinoma: Treatment hurdles, tumor microenvironment and immunotherapy. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 12(2), 173-181. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v12.i2.173>
- Sassa, T., & Kihara, A. (2014). Metabolism of Very Long-Chain Fatty Acids: Genes and Pathophysiology. *Biomolecules & Therapeutics*, 22(2), 83-92. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.017>
- Sassa, T., Ohno, Y., Suzuki, S., Nomura, T., Nishioka, C., Kashiwagi, T., Hirayama, T., Akiyama, M., Taguchi, R., Shimizu, H., Itohara, S., & Kihara, A. (2013). Impaired

- Epidermal Permeability Barrier in Mice Lacking *Elovl1* , the Gene Responsible for Very-Long-Chain Fatty Acid Production. *Molecular and Cellular Biology*, 33(14), 2787-2796. <https://doi.org/10.1128/MCB.00192-13>
- Schlesinger, Y., Yosefov-Levi, O., Kolodkin-Gal, D., Granit, R. Z., Peters, L., Kalifa, R., Xia, L., Nasereddin, A., Shiff, I., Amran, O., Nevo, Y., Elgavish, S., Atlan, K., Zamir, G., & Parnas, O. (2020). Single-cell transcriptomes of pancreatic preinvasive lesions and cancer reveal acinar metaplastic cells' heterogeneity. *Nature Communications*, 11, 4516. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18207-z>
- Schönenberger, M. J. (2015). Hypoxia signaling pathways: Modulators of oxygen-related organelles. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00042>
- Sellam, F., Harir, N., Khaled, M. B., Mrabent, N. M., Salah, R., & Diaf, M. (2015). Epidemiology and Risk Factors for Exocrine Pancreatic Cancer in a Northern African Population. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 46(2), 126-130. <https://doi.org/10.1007/s12029-015-9693-4>
- Seufferlein, T., Hammel, P., Delpero, J. R., Macarulla, T., Pfeiffer, P., Prager, G. W., Reni, M., Falconi, M., Philip, P. A., & Cutsem, E. V. (2019). Optimizing the management of locally advanced pancreatic cancer with a focus on induction chemotherapy: Expert opinion based on a review of current evidence. *Cancer Treatment Reviews*, 77, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.05.007>
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: Composition, regulation and physiological relevance of lipid rafts. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(6), 361-374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>

- Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(1), 12-49. <https://doi.org/10.3322/caac.21820>
- Singh, K., Pruski, M., Bland, R., Younes, M., Guha, S., Thosani, N., Maitra, A., Cash, B. D., McAllister, F., Logsdon, C. D., Chang, J. T., & Bailey-Lundberg, J. M. (2021). Kras mutation rate precisely orchestrates ductal derived pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic cancer. *Laboratory Investigation*, 101(2), 177-192. <https://doi.org/10.1038/s41374-020-00490-5>
- Skoudy, A., Hernández-Muñoz, I., & Navarro, P. (2011). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Transcription Factors: Role of c-Myc. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 42(2), 76-84. <https://doi.org/10.1007/s12029-011-9258-0>
- Slieker, R. C., Relton, C. L., Gaunt, T. R., Slagboom, P. E., & Heijmans, B. T. (2018). Age-related DNA methylation changes are tissue-specific with ELOVL2 promoter methylation as exception. *Epigenetics & Chromatin*, 11(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0191-3>
- Snaebjornsson, M. T., & Schulze, A. (2019). Tumours use a metabolic twist to make lipids. *Nature*, 566(7744), 333-334. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-00352-1>
- Sodir, N. M., Kortlever, R. M., Barhet, V. J. A., Campos, T., Pellegrinet, L., Kupczak, S., Anastasiou, P., Swigart, L. B., Soucek, L., Arends, M. J., Littlewood, T. D., & Evan, G. I. (2020). MYC Instructs and Maintains Pancreatic Adenocarcinoma Phenotype. *Cancer Discovery*, 10(4), 588-607. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0435>
- Sokolowska, E., Presler, M., Goyke, E., Milczarek, R., Swierczynski, J., & Sledzinski, T. (2017). Orlistat Reduces Proliferation and Enhances Apoptosis in Human

- Pancreatic Cancer Cells (PANC-1). *Anticancer Research*, 37(11), 6321-6327.
<https://doi.org/10.21873/anticancerres.12083>
- Springfeld, C., Jäger, D., Büchler, M. W., Strobel, O., Hackert, T., Palmer, D. H., & Neoptolemos, J. P. (2019). Chemotherapy for pancreatic cancer. *La Presse Médicale*, 48(3, Part 2), e159-e174. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2019.02.025>
- Stillwell, W., & Wassall, S. R. (2003). Docosahexaenoic acid: Membrane properties of a unique fatty acid. *Chemistry and Physics of Lipids*, 126(1), 1-27.
[https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(03\)00101-4](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(03)00101-4)
- Stine, Z. E., Walton, Z. E., Altman, B. J., Hsieh, A. L., & Dang, C. V. (2015). MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer discovery*, 5(10), 1024-1039.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0507>
- Su, F., & Koeberle, A. (2024). Regulation and targeting of SREBP-1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Metastasis Reviews*, 43(2), 673-708.
<https://doi.org/10.1007/s10555-023-10156-5>
- Su, Y.-C., Feng, Y.-H., Wu, H.-T., Huang, Y.-S., Tung, C.-L., Wu, P., Chang, C.-J., Shiau, A.-L., & Wu, C.-L. (2018). Elovl6 is a negative clinical predictor for liver cancer and knockdown of Elovl6 reduces murine liver cancer progression. *Scientific Reports*, 8(1), 6586. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24633-3>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15545-15550.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>

- Sun, Y., He, W., Luo, M., Zhou, Y., Chang, G., Ren, W., Wu, K., Li, X., Shen, J., Zhao, X., & Hu, Y. (2015). SREBP1 regulates tumorigenesis and prognosis of pancreatic cancer through targeting lipid metabolism. *Tumor Biology*, 36(6), 4133-4141. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3047-5>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Swierczynski, J., Hebanowska, A., & Sledzinski, T. (2014). Role of abnormal lipid metabolism in development, progression, diagnosis and therapy of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(9), 2279-2303. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i9.2279>
- Tadros, S., Shukla, S. K., King, R. J., Gunda, V., Vernucci, E., Abrego, J., Chaika, N. V., Yu, F., Lazenby, A. J., Berim, L., Grem, J., Sasson, A. R., & Singh, P. K. (2017). De Novo Lipid Synthesis Facilitates Gemcitabine Resistance through Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Cancer. *Cancer Research*, 77(20), 5503-5517. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3062>
- Tamura, K., Makino, A., Hullin-Matsuda, F., Kobayashi, T., Furihata, M., Chung, S., Ashida, S., Miki, T., Fujioka, T., Shuin, T., Nakamura, Y., & Nakagawa, H. (2009). Novel Lipogenic Enzyme ELOVL7 Is Involved in Prostate Cancer Growth through Saturated Long-Chain Fatty Acid Metabolism. *Cancer Research*, 69(20), 8133-8140. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0775>
- Tanaka, K., Kandori, S., Sakka, S., Nitta, S., Tanuma, K., Shiga, M., Nagumo, Y., Negoro, H., Kojima, T., Mathis, B., Shimazui, T., Watanabe, M., Sato, T.-A., Miyamoto, T., Matsuzaka, T., Shimano, H., & Nishiyama, H. (2021). ELOVL2 promotes cancer

- progression by inhibiting cell apoptosis in renal cell carcinoma. *Oncology Reports*, 47(2), 23. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8234>
- Tando, Y., Yanagimachi, M., Matsushashi, Y., Nakamura, T., & Kamisawa, T. (2010). A Brief Outline of the History of the Pancreatic Anatomy. *Digestive Surgery*, 27(2), 84-86. <https://doi.org/10.1159/000286435>
- Tennant, D. A., Durán, R. V., & Gottlieb, E. (2010). Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 10(4), 267-277. <https://doi.org/10.1038/nrc2817>
- Tian, X., Li, S., & Ge, G. (2021). Apatinib Promotes Ferroptosis in Colorectal Cancer Cells by Targeting ELOVL6/ACSL4 Signaling. *Cancer Management and Research*, 13, 1333-1342. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S274631>
- Tolkach, Y., Merseburger, A., Herrmann, T., Kuczyk, M., Serth, J., & Imkamp, F. (2015). Signatures of Adverse Pathological Features, Androgen Insensitivity and Metastatic Potential in Prostate Cancer. *ANTICANCER RESEARCH*.
- Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 112-124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- Vance, J. E., & Tasseva, G. (2013). Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(3), 543-554. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.08.016>
- Velasco, R. M., García, A. G., Sánchez, P. J., Sellart, I. M., & Sánchez-Arévalo Lobo, V. J. (2023). Tumour microenvironment and heterotypic interactions in pancreatic cancer. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 79(1), 179-192. <https://doi.org/10.1007/s13105-022-00875-8>

- Ventura, R., Mordec, K., Waszczuk, J., Wang, Z., Lai, J., Fridlib, M., Buckley, D., Kemble, G., & Heuer, T. S. (2015). Inhibition of de novo Palmitate Synthesis by Fatty Acid Synthase Induces Apoptosis in Tumor Cells by Remodeling Cell Membranes, Inhibiting Signaling Pathways, and Reprogramming Gene Expression. *EBioMedicine*, 2(8), 808-824. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.06.020>
- Wahlström, T., & Arsenian Henriksson, M. (2015). Impact of MYC in regulation of tumor cell metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(5), 563-569. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.004>
- Walter, K., Hong, S.-M., Nyhan, S., Canto, M., Fedarko, N., Klein, A., Griffith, M., Omura, N., Medghalchi, S., Kuhajda, F., & Goggins, M. (2009). Serum Fatty Acid Synthase as a Marker of Pancreatic Neoplasia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 18(9), 2380-2385. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0144>
- Walz, S., Lorenzin, F., Morton, J., Wiese, K. E., von Eyss, B., Herold, S., Rycak, L., Dumay-Odelot, H., Karim, S., Bartkuhn, M., Roels, F., Wuestefeld, T., Fischer, M., Teichmann, M., Zender, L., Wei, C.-L., Sansom, O., Wolf, E., & Eilers, M. (2014). Activation and repression by oncogenic Myc shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature*, 511(7510), 483-487. <https://doi.org/10.1038/nature13473>
- Wang, R., Liu, X., Li, X., Qian, M., Yang, X., Jiang, Q., Wang, Y., Liu, H., Chen, J., Wang, X., & Gong, L. (2024). ELOVL6 promotes the progression of head and neck squamous cell carcinoma via activating WNT/ β -catenin pathway. *Molecular Carcinogenesis*, 63(6), 1079-1091. <https://doi.org/10.1002/mc.23710>
- Wang, Y., Botolin, D., Christian, B., Busik, J., Xu, J., & Jump, D. B. (2005). Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases.

- Journal of Lipid Research*, 46(4), 706-715. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400335-JLR200>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296-W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Whiteman, D. C., Webb, P. M., Green, A. C., Neale, R. E., Fritschi, L., Bain, C. J., Parkin, D. M., Wilson, L. F., Olsen, C. M., Nagle, C. M., Pandeya, N., Jordan, S. J., Antonsson, A., Kendall, B. J., Hughes, M. C. B., Ibiebele, T. I., Miura, K., Peters, S., & Carey, R. N. (2015). Cancers in Australia in 2010 attributable to modifiable factors: Introduction and overview. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 39(5), 403-407. <https://doi.org/10.1111/1753-6405.12468>
- Witkiewicz, A. K., McMillan, E. A., Balaji, U., Baek, G., Lin, W.-C., Mansour, J., Mollaei, M., Wagner, K.-U., Koduru, P., Yopp, A., Choti, M. A., Yeo, C. J., McCue, P., White, M. A., & Knudsen, E. S. (2015). Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nature Communications*, 6(1), 6744. <https://doi.org/10.1038/ncomms7744>
- Wolf, F. A., Angerer, P., & Theis, F. J. (2018). SCANPY: Large-scale single-cell gene expression data analysis. *Genome Biology*, 19, 15. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1382-0>
- Xiang, S., Gu, H., Jin, L., Thorne, R. F., Zhang, X. D., & Wu, M. (2018). LncRNA IDH1-AS1 links the functions of c-Myc and HIF1 α via IDH1 to regulate the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(7), E1465-E1474. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711257115>

- Xu, W., Ding, H., Zhang, M., Liu, L., Yin, M., Weng, Z., & Xu, C. (2022). The prognostic role of fatty acid metabolism-related genes in patients with gastric cancer. *Translational Cancer Research*, 11(10), 3593-3609. <https://doi.org/10.21037/tcr-22-761>
- Ye, L.-Y., Zhang, Q., Bai, X.-L., Pankaj, P., Hu, Q.-D., & Liang, T.-B. (2014). Hypoxia-inducible factor 1 α expression and its clinical significance in pancreatic cancer: A meta-analysis. *Pancreatology*, 14(5), 391-397. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2014.06.008>
- Yeboah, G. K., Lobanova, E. S., Brush, R. S., & Agbaga, M.-P. (2021). Very long chain fatty acid-containing lipids: A decade of novel insights from the study of ELOVL4. *Journal of Lipid Research*, 62, 100030. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100030>
- Yi, M., Li, J., Chen, S., Cai, J., Ban, Y., Peng, Q., Zhou, Y., Zeng, Z., Peng, S., Li, X., Xiong, W., Li, G., & Xiang, B. (2018). Emerging role of lipid metabolism alterations in Cancer stem cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0784-5>
- Yin, X., Xu, R., Song, J., Ruze, R., Chen, Y., Wang, C., & Xu, Q. (2022). Lipid metabolism in pancreatic cancer: Emerging roles and potential targets. *Cancer Communications*, 42(12), 1234-1256. <https://doi.org/10.1002/cac2.12360>
- Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J. W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J. L., Yan, H., Wang, W., Chen, S., Viale, A., Zheng, H., Paik, J., Lim, C., Guimaraes, A. R., Martin, E. S., ... DePinho, R. A. (2012). Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism. *Cell*, 149(3), 656-670. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.058>

- Yu, M., Liu, H., Duan, Y., Zhang, D., Li, S., & Wang, F. (2015). Four types of fatty acids exert differential impact on pancreatic cancer growth. *Cancer Letters*, *360*(2), 187-194. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.02.002>
- Zalba, S., & Ten Hagen, T. L. M. (2017). Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews*, *52*, 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.10.008>
- Zeisig, R., Koklič, T., Wiesner, B., Fichtner, I., & Sentjurč, M. (2007). Increase in fluidity in the membrane of MT3 breast cancer cells correlates with enhanced cell adhesion in vitro and increased lung metastasis in NOD/SCID mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *459*(1), 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.09.030>
- Zeng, S., Pöttler, M., Lan, B., Grützmann, R., Pilarsky, C., & Yang, H. (2019). Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(18), 4504. <https://doi.org/10.3390/ijms20184504>
- Zhan, H., Zhou, B., Cheng, Y., Xu, J., Wang, L., Zhang, G., & Hu, S. (2017). Crosstalk between stromal cells and cancer cells in pancreatic cancer: New insights into stromal biology. *Cancer Letters*, *392*, 83-93. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.01.041>
- Zhang, C., Zhu, N., Li, H., Gong, Y., Gu, J., Shi, Y., Liao, D., Wang, W., Dai, A., & Qin, L. (2022). New dawn for cancer cell death: Emerging role of lipid metabolism. *Molecular Metabolism*, *63*, 101529. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101529>
- Zhang, X., & Wang, Y. (2019). Identification of hub genes and key pathways associated with the progression of gynecological cancer. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.11004>

- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C. A., Eeckhoute, J., Johnson, D. S., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Myers, R. M., Brown, M., Li, W., & Liu, X. S. (2008). Model-based Analysis of CHIP-Seq (MACS). *Genome Biology*, 9(9), R137. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>
- Zhang, Y., Pang, S., Sun, B., Zhang, M., Jiao, X., Lai, L., Qian, Y., Yang, N., & Yang, W. (2022). ELOVLs Predict Distinct Prognosis Value and Immunotherapy Efficacy In Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 12, 884066. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.884066>
- Zhao, W., Prijic, S., Urban, B. C., Tisza, M. J., Zuo, Y., Li, L., Tan, Z., Chen, X., Mani, S. A., & Chang, J. T. (2016). Candidate Antimetastasis Drugs Suppress the Metastatic Capacity of Breast Cancer Cells by Reducing Membrane Fluidity. *Cancer Research*, 76(7), 2037-2049. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1970>
- Zhao, Z., & Liu, W. (2020). Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 19, 1533033820962117. <https://doi.org/10.1177/1533033820962117>
- Zook, B. C., Jänne, O. A., Abraham, A. A., & Nash, H. A. (2001). The Development and Regression of Deciduosarcomas and Other Lesions Caused by Estrogens and Progestins in Rabbits. *Toxicologic Pathology*, 29(4), 411-416. <https://doi.org/10.1080/01926230152499755>

