

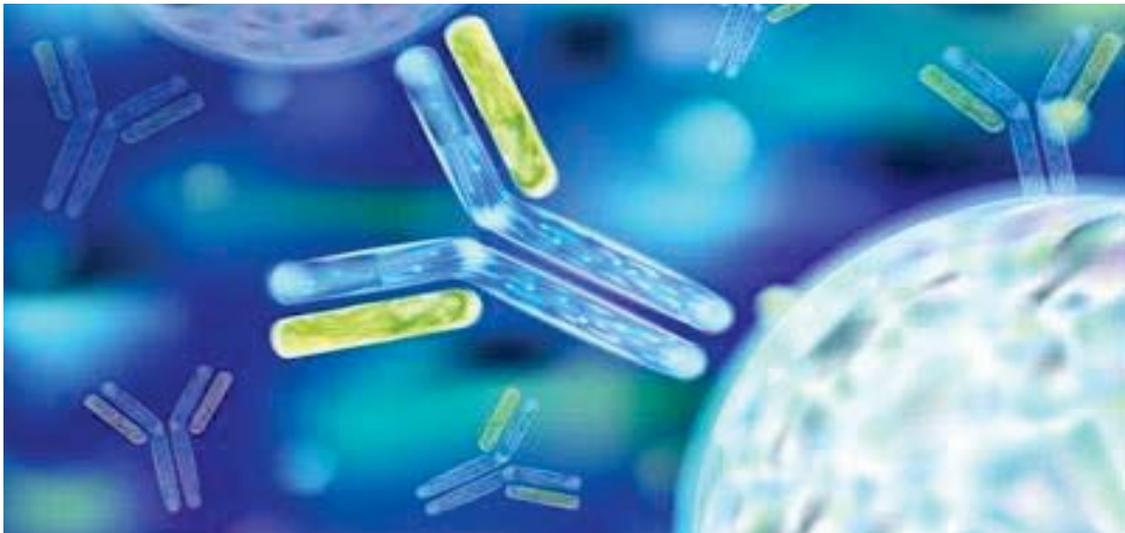
## Máster en Biotecnología Avanzada

### TRABAJO FIN DE MÁSTER

Inmunoterapia anti-CCR9 frente al cáncer de ovario resistente al cisplatino: estudio de una nueva aplicación terapéutica mediante la modulación del sistema inmune de la paciente

Inmunoterapia anti-CCR9 contra o cancro de ovario resistente ao cisplatino: estudo dunha nova aplicación terapéutica mediante a modulación do sistema inmunitario da paciente

Anti-CCR9 immunotherapy for cisplatin-resistant ovarian cancer: exploring a new therapeutic application by modulating the patient's



**Marcos Bazarra Barreiros**

**Febrero 2022**





## **Inmunoterapia anti-CCR9 frente al cáncer de ovario resistente al cisplatino: estudio de una nueva aplicación terapéutica mediante la modulación del sistema inmune de la paciente**

Inmunoterapia anti-CCR9 contra o cancro de ovario resistente ao cisplatino: estudo dunha nova aplicación terapéutica mediante a modulación do sistema inmunitario da paciente

Anti-CCR9 immunotherapy for cisplatin-resistant ovarian cancer: exploring a new therapeutic application by modulating the patient's

Trabajo realizado por Marcos Bazarra Barreiros en el Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas de la Universidade de Santiago de Compostela (CiMUS), en Santiago de Compostela a febrero de 2022 para su presentación en la Facultade de Ciencias da Universidade da Coruña

**Dra. Tobio Ageitos, Araceli y Dr. Vidal Figueroa, Anxo en calidad de tutores de este Trabajo Fin de Máster autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.**

Firma:

**TOBIO  
AGEITOS  
ARACELI  
4483385  
OL**

Firmado digitalmente por  
TOBIO AGEITOS ARACELI -  
44833850L  
Nombre de  
reconocimiento (DN):  
c=ES,  
serialNumber=IDCES-4483  
3850L,  
givenName=ARACELI,  
sn=TOBIO AGEITOS,  
cn=TOBIO AGEITOS  
ARACELI - 44833850L  
Fecha: 2022.02.11 08:44:57  
+01'00'

Firma:



Firmado digitalmente por  
VIDAL FIGUEROA ANXO -  
36097751X  
Nombre de reconocimiento  
(DN): c=ES,  
serialNumber=IDCES-36097751  
X, givenName=ANXO,  
sn=VIDAL FIGUEROA, cn=VIDAL  
FIGUEROA ANXO - 36097751X  
Fecha: 2022.02.10 19:55:18  
+01'00'

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Cáncer	1
1.1.1. Causas del cáncer	1
1.1.2. Relevancia del estudio del cáncer	2
1.1.3. Importancia de la detección temprana	3
1.2. Cáncer de ovario	3
1.3. Quimioterapia	4
1.3.1. Cisplatino como quimioterapéutico	4
1.4. Inmunoterapia	5
1.4.1. El receptor de quimiocinas 9 (CCR9) como diana inmunoterapéutica	6
1.4.2. Anticuerpos 91R y 92R como inmunoterapéuticos	9
1.4.3. Anticuerpo SRB1 como inmunoterapéutico	10
<b>2. Objetivos</b>	<b>11</b>
<b>3. Material y métodos</b>	<b>12</b>
3.1. Líneas celulares	12
3.2. Estudio de la expresión de CCR9	12
3.3. Valoración del efecto inmunoterapéutico de SRB1 mediado por NKs	14
3.3.1. Análisis de datos	15
3.4. Determinación de linfocitos T CD8 <sup>+</sup>	16
<b>4. Resultados</b>	<b>18</b>
4.1. Efecto ambiental sobre la expresión de CCR9	18
4.1.1. Efecto de la concentración de oxígeno y la presencia de ligando CCL25 sobre la expresión de CCR9	18
4.1.2. Efecto de la densidad celular sobre la expresión de CCR9	19
4.1.3. Efecto de la presencia de cisplatino sobre la expresión de CCR9	19
4.2. Pureza del aislamiento de linfocitos T CD8 <sup>+</sup>	20
4.3. Efecto inmunoterapéutico de SRB1	21
4.3.1. Efecto inmunoterapéutico de SRB1 sobre la línea A2780 WT	22
4.3.2. Efecto inmunoterapéutico de SRB1 sobre la línea A2780 Cis	24
<b>5. Discusión</b>	<b>26</b>
5.1. Eficacia del aislamiento de linfocitos T CD8 <sup>+</sup>	26
5.2. Efecto del microambiente sobre la expresión de CCR9	26
5.3. Efecto inmunoterapéutico de SRB1	28
<b>6. Conclusiones</b>	<b>30</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>31</b>

## Resumen

El aumento de riesgo de padecer cáncer derivado de hábitos insalubres y de la edad han llevado a esta enfermedad a ser una de las más mortales del mundo. La agresividad y dificultad de detección temprana de algunos cánceres resalta, no solo la necesidad de prevención, sino de encontrar tratamientos eficaces una vez se ha detectado la afección. El presente trabajo tiene como objetivo el estudio de un nuevo inmunoterapéutico (SRB1) ante el cáncer de ovario, basado en un anticuerpo anti-CCR9. Para ello se cuantificó la eficacia de un método de aislamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, se observó la expresión de CCR9 en distintas condiciones y líneas celulares y se estudió el efecto de SRB1 sobre dos líneas celulares de cáncer de ovario. Los resultados señalaron que la expresión de CCR9 es mayor en modelos de cáncer de ovario con resistencia a cisplatino, que la concentración celular y la hipoxia son condiciones relacionadas con la sobreexpresión de CCR9 y finalmente, que el inmunoterapéutico media en la vía citotóxica de las células “Natural Killer” aumentando la mortalidad de las células cancerígenas.

**Palabras clave:** inmunoterapia, cáncer de ovario, expresión de CCR9, SRB1, resistencia a cisplatino.

## Resumo

O aumento do risco de padecer cancro derivado de hábitos insalubres e da idade levaron a esta enfermidade a ser unha das máis mortais do mundo. A agresividade e dificultade de detección temperá dalgúns cancros resalta, non só a necesidade de prevención, senón de encontrar tratamentos eficaces unha vez se detectou a afección. O presente estudo ten como obxectivo a proba dun novo inmunoterapéutico (SRB1) ante o cancro de ovario, baseado nun anticorpo anti-CCR9. Pra conseguilo cuantificouse a eficacia dun método de aislamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, observouse a expresión de CCR9 en distintas condicións e liñas celulares e estudouse o efecto de SRB1 sobre dous líneas celulares de cancro de ovario. Os resultados sinalaron que a expresión de CCR9 é maior en modelos de cancro de ovario con resistencia a cisplatino, que a concentración celular e a hipoxia son condicións relacionadas coa sobreexpresión de CCR9 e finalmente, que o inmunoterapéutico media na vía citotóxica das células “Natural Killer” aumentando a mortalidade das células cancerixenas.

**Palabras clave:** inmunoterapia, cancro de ovario, expresión de CCR9, SRB1, resistencia a cisplatino.

## Summary

The increased risk of cancer due to unhealthy habits and age have made this disease one of the deadliest in the world. The aggressiveness and difficulty of early detection of some cancers highlight, not only the need for prevention, but also to find effective treatments when the condition has been detected. The objective of this study is to test a new immunotherapeutic (SRB1) against ovarian cancer, based on an anti-CCR9 antibody. To this end, the efficacy of a CD8<sup>+</sup> T lymphocyte isolation method was quantified, CCR9 expression was observed in different conditions and cell lines, and the effect of SRB1 on two ovarian cancer cell lines was studied. The results indicated that the expression of CCR9 is higher in models of ovarian cancer with resistance to cisplatin. Further cell concentration and hypoxia are conditions related to the overexpression of CCR9 and finally, that the immunotherapeutic mediates the cytotoxic pathway of “Natural Killer” cells by increasing the mortality of cancer cells.

**Keywords:** immunotherapy, ovarian cancer, expression of CCR9, SRB1, resistance to cisplatin.

# **1. Introducción**

## **1.1. Cáncer**

El cáncer es una enfermedad que causa un crecimiento descontrolado en las células de todo tipo de tejidos y es capaz de propagarse a otras partes del cuerpo, transformando las células sanas en células tumorales mediante un proceso constituido por varias etapas que suelen consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno (Araya y Paizano, 2021; OMS, 2021). El cáncer es la enfermedad más importante relacionada con la renovación de los tejidos y se produce como consecuencia de alteraciones patológicas en el ADN, siendo la mayoría de las mutaciones que causan esta enfermedad somáticas (Alberts *et al.*, 2011).

### **1.1.1. Causas del cáncer**

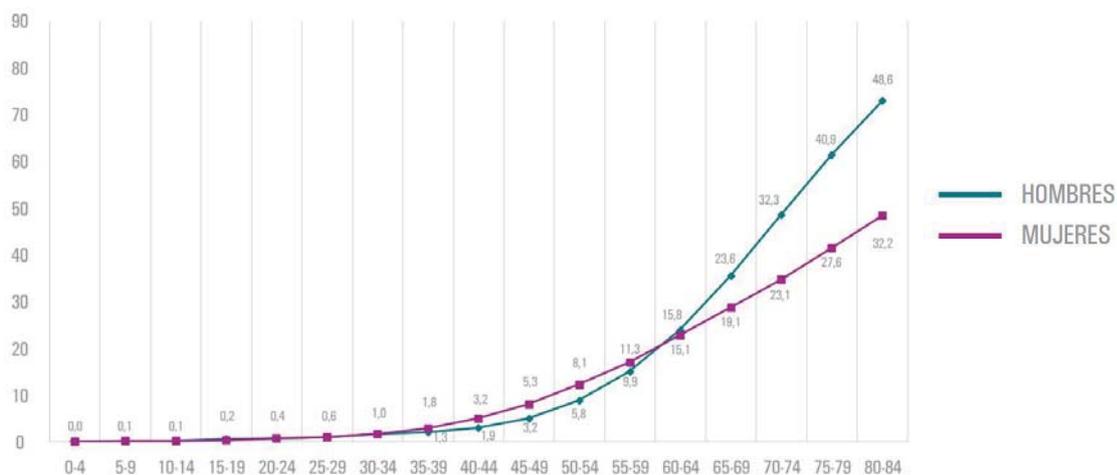
La alteración de la información genética es el resultado de la interacción entre los factores genéticos y agentes externos. Los denominados mutágenos son sustancias que, al ser inhaladas, ingeridas o por contacto con la piel pueden causar alteraciones hereditarias en el material genético o aumentar su frecuencia. Entre los mutágenos destacan los carcinógenos, que son sustancias o mezclas de sustancias capaces de inducir cáncer o elevar la tasa de incidencia (MITRAMISS, 2017; OMS, 2021).

Los carcinógenos se clasifican en físicos, químicos y biológicos. Entre los carcinógenos físicos se encuentran las radiaciones ionizantes (rayos X), las radiaciones no ionizantes (radiación ultravioleta) y las radiaciones emitidas por la corteza terrestre (radón). A pesar de no ser frecuentes, también cabe mencionar a las fugas en accidentes nucleares, debido a que la radiación emitida es un potente carcinógeno (AECC, 2021).

Por otro lado, los cánceres provocados por los carcinógenos químicos son más frecuentes en países desarrollados porque mayoritariamente proceden de la actividad industrial. Se han descubierto dos mil compuestos químicos carcinogénicos y pocos de ellos se encuentran en contacto con el ser humano. La capacidad de una sustancia de provocar cáncer depende del tiempo de exposición y la cantidad de dosis recibida. Los carcinógenos químicos más comunes según la Asociación Española contra el Cáncer son el “amianto, arsénico, benceno, cadmio, mercurio, níquel, plomo, hidrocarburos clorados, naftilamina” (AECC, 2021).

En la última década, los carcinógenos biológicos están adquiriendo mayor importancia, ya que en torno al 20 % de los casos de cáncer se deben a infecciones persistentes causadas por bacterias, parásitos y virus, entre estos últimos destacan el virus del papiloma humano que causa cáncer de cuello uterino, el virus de la hepatitis B que produce cáncer de hígado y la bacteria *Helicobacter pylori* que provoca cáncer de estómago (AECC, 2021).

La OMS estima que un tercio de las muertes mundiales por cáncer se deben a los cinco principales factores evitables de riesgo: tabaco, alcohol, sedentarismo, agentes infecciosos y dieta inadecuada, siendo el tabaco el principal de ellos, y causante de un 33% de los cánceres a nivel mundial y de hasta el 22% de las muertes por cáncer. La tasa de incidencia aumenta de forma considerable con la edad (Figura 1) debido a que se acumulan los factores de riesgo de determinados tipos de cáncer y debido a la disminución de la eficacia de los mecanismos de reparación celular (Garcell *et al.*, 2019; OMS, 2021; SEOM, 2022).



**Figura 1.-** Probabilidad de desarrollar un cáncer (excluidos los tumores cutáneos no melanoma) por edad y sexos en España el año 2021 (figura tomada de SEOM, 2022).

### 1.1.2. Relevancia del estudio del cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, habiéndose estimado en 10 millones los fallecimientos en 2020 como consecuencia de esta enfermedad (Araya y Paizano, 2021; OMS, 2021). Por este motivo, su investigación ha cobrado cada vez mayor relevancia y su estudio ha dado lugar a grandes avances científicos, generando conocimientos útiles para los campos de la Biología y la Medicina (Andonegui, 2006). Estos

avances han permitido aumentar la tasa de supervivencia de los pacientes, sin embargo, es necesario seguir desarrollando nuevas técnicas de diagnóstico temprano y nuevos tratamientos efectivos para cada tipo de cáncer. El diagnóstico temprano aumenta la tasa de supervivencia porque es más probable que el tratamiento resulte efectivo, además, es más barato (OMS, 2021).

La investigación científica del cáncer genera conocimientos interdisciplinarios, por ejemplo, investigar los mecanismos de división celular ha ayudado a lograr grandes avances en las terapias de regeneración de tejidos, otra de las ventajas del estudio de esta enfermedad es conocer por qué las células diferenciadas no son capaces de volver a proliferar. Cabe destacar que el estudio del cáncer ha permitido conocer nuevas vías de señalización relacionadas con el desarrollo del cáncer (Andonegui, 2006).

### **1.1.3. Importancia de la detección temprana**

El sistema inmunológico es capaz de eliminar el tumor en los estados incipientes, sin embargo, la capacidad de evadir este sistema da lugar al desarrollo del tumor. Existen diferentes mecanismos para inhibir el proceso antitumoral. Las células cancerígenas evaden al sistema inmunológico mediante la supresión de la acción de las células T al impedir el reconocimiento de los antígenos cancerígenos específicos e inhibiendo la respuesta de los linfocitos citotóxicos CD8 positivos (Fin *et al.*, 2012).

## **1.2. Cáncer de ovario**

El cáncer de ovario es el 7º cáncer más frecuente entre las mujeres en todo el mundo (Reid *et al.*, 2016; Araya y Paizano, 2021). Diversos estudios asocian los factores genéticos y hormonales como causantes de esta enfermedad, por lo que es de gran importancia evaluar el riesgo de padecer esta patología mediante el estudio de dichos factores. Además, esta enfermedad afecta a cualquier edad, sin embargo, es más frecuente en mujeres mayores de 55 años porque durante la menopausia los ovarios dejan de producir ovocitos (Araya y Paizano, 2021).

Este cáncer presenta una alta tasa de mortalidad. De hecho, es el cáncer ginecológico más letal. Esto se debe a que en etapas tempranas la paciente no presenta síntomas, en la mayoría de los casos, dificultando el diagnóstico a tiempo. Entre los síntomas frecuentes en

etapas avanzadas se encuentran: dolor de espalda, cansancio, dolor/distensión abdominal, constipación o problemas urinarios (Araya y Paizano, 2021).

Se reconoce al cáncer de ovario como el cáncer ginecológico más letal, entendiéndose que sólo alrededor del 45% de las mujeres con esta enfermedad sobrevive durante cinco años a partir de la fecha de diagnóstico. Los factores genéticos y hormonales, por ejemplo, las mutaciones de la línea germinal en *BRCA* (genes supresores que se encargan de reparar el daño del ADN y desempeñan una función importante en la transcripción) causan el 90% de los casos y estas pueden heredarse. Son genes que suprimen tumores, que se encargan de reparar el daño del ADN y la regulación transcripcional (Jasin, 2002; Zhang *et al.*, 2018). La supervivencia en la última década ha aumentado debido a que se ha duplicado el diagnóstico temprano, incluso en pacientes sin síntomas, como consecuencia de la combinación de análisis o el cribado entre el marcador temporal CA-125 y estudios de imagen (Zhang *et al.*, 2018; Araya y Paizano, 2021).

### **1.3. Quimioterapia**

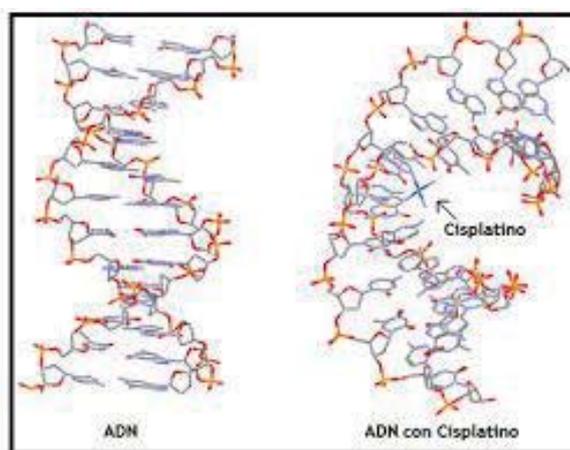
La quimioterapia detiene o ralentiza el crecimiento de las células tumorales y se usa para curar, detener o ralentizar el crecimiento de las células cancerígenas o una vez superado el cáncer, disminuir las posibilidades de padecer esta enfermedad de nuevo. También puede usarse para aliviar los síntomas, disminuyendo el tamaño de los tumores que causan dolor y otros problemas. Una de sus desventajas es que perjudica a las células sanas del cuerpo, ya que destruye o ralentiza su crecimiento (Instituto Nacional del Cáncer, 2015). La resistencia a la quimioterapia es la mayor causa de muerte por cáncer de ovario (Xu *et al.*, 2020). Un hito histórico del siglo XX que ha revolucionado el tratamiento del cáncer fue el descubrimiento por Barnett Rosenberg en 1960 de un fármaco con actividad anticancerígena que contiene platino denominado cisplatino. Desde este hito, el uso de compuestos inorgánicos para el tratamiento de enfermedades ha recibido gran aceptación (Rosenberg *et al.*, 1965; Chabner, 2010; Crabb y Moore, 2010; Toloza, 2016).

#### **1.3.1. Cisplatino como quimioterapéutico**

El cisplatino es el principal quimioterapéutico empleado para tratar el cáncer de ovario (Toloza, 2016; Xu *et al.*, 2020). Este fármaco inhibe la síntesis de ADN mediante la alteración de su estructura, produciendo enlaces cruzados en el interior y entre las cadenas que conforman el ADN (Figura 2). Otra de las funciones es inhibir en menor medida la

síntesis de ARN y proteínas. Además, se caracteriza por amplificar la inmunogenicidad tumoral, teniendo cualidades inmunosupresoras, radiosensibilizantes y antibacterianas. Este agente citotóxico se une a todas las bases que conforman el ADN, principalmente en la posición N-7 de guanina y adenina (AEP, 2020).

A pesar de ser uno de los tratamientos contra el cáncer líder en la industria farmacéutica, tiene efectos secundarios graves como lesiones renales y neurológicas, por lo que es necesario emplearlo en dosis bajas. Otra problemática es que las células tumorales son capaces de desarrollar resistencia al cisplatino. Por estos motivos, se evidencia la necesidad de buscar otros sistemas de administración u otros fármacos que actúen de manera específica en el tumor (Toloza, 2016).



**Figura 2.-** Modificaciones estructurales del ADN en presencia del cisplatino (figura tomada de Toloza, 2016)

#### **1.4. Inmunoterapia**

La inmunoterapia es un tratamiento que emplea el propio sistema inmunitario del paciente para atacar a las células cancerígenas. Fisiológicamente, el sistema inmune del cuerpo humano tiene la función de identificar y eliminar las células anormales. Por ello, la inmunoterapia trata de curar el cáncer ayudando a detectar y matar las células cancerígenas (Xu *et al.*, 2020). Los tratamientos capaces de reconocer de forma específica las células tumorales, como la inmunoterapia, presentan grandes ventajas en cuanto a seguridad frente a otros tratamientos no específicos, como lo sería la quimioterapia (Chamarro *et al.*, 2014; Somovilla-Crespo *et al.*, 2018).

Diversos estudios han demostrado que una serie de receptores localizados en la membrana de las células son capaces de inhibir o activar la actividad citotóxica de los

linfocitos T. Estos receptores actúan como puntos de control y tienen la capacidad de regular la actividad de los linfocitos T frente a proteínas endógenas, como a infecciones crónicas y antígenos tumorales (Pardoll, 2012). El uso de anticuerpos monoclonales como moduladores de los puntos de control (activación o inhibición de los receptores reguladores de la actividad citotóxica de las células T) ha aumentado la tasa de supervivencia de los pacientes. Por este motivo, la inmunoterapia como tratamiento antitumoral ha adquirido gran protagonismo en los últimos años. Los fármacos con capacidad inhibitoria como Ipilimumab [Licencia de aplicación biológica (BLA): 125377] (anticuerpo monoclonal anti CTLA-4), Pembrolizumab [BLA: 125514] y Nivolumab [BLA: 125554] (anticuerpos monoclonales anti –PD1), que han sido aprobados por la FDA (U.S. Food and Drug administration, 2022), han aportado grandes beneficios a la industria farmacéutica, por lo que en la actualidad hay una fuerte inversión en el desarrollo de proyectos que buscan conocer nuevos puntos de regulación en la respuesta inmune tumoral como diana terapéutica en los tratamientos antitumorales.

#### **1.4.1. El receptor de quimiocinas 9 (CCR9) como diana inmunoterapéutica**

Los receptores de quimiocinas son proteínas de membrana con 7 dominios transmembrana asociados a proteínas G. La unión de las quimiocinas con sus receptores puede inducir un aumento del calcio intracelular, el reensamblaje del citoesqueleto y promover la activación de la integrina, todo lo cual produce efectos quimiotácticos, de este modo participan en una gran variedad de fenómenos fisiológicos y patológicos, como el crecimiento y desarrollo celular, las lesiones tisulares, la reacción inflamatoria, la angiogénesis y la tumorigénesis (Schulz *et al.*, 2016).

Las quimiocinas son una clase de moléculas pequeñas en la superfamilia de las citoquinas que son producidas por las células endoteliales y otras células parenquimales. Generalmente consisten en 70-125 aminoácidos, tienen una estructura molecular similar y tienen un peso molecular de unos 6-14 kDa. Las quimiocinas están compuestas principalmente por tres componentes: un extremo N-terminal extracelular, tres bucles extracelulares y un extremo C-terminal (Xu *et al.*, 2020).

El receptor de quimiocinas 9 (CCR9) es expresado en las células linfoides, en el timo, en el intestino delgado, linfocitos T de memoria circulantes, células plasmáticas secretoras de inmunoglobulina A y células dendríticas (Zabel *et al.*, 1999), pertenece a la familia de los receptores de  $\beta$ -quimiocinas y consiste en un transcrito A, de 369 aminoácidos y 42 kDa, y

un transcrito B, de 357 aminoácidos y 40.8 kDa (Tu *et al.*, 2016). Mientras que su ligando, la quimiocina 25 (CCL25), es expresada de forma selectiva por las células dendríticas medulares y por las células epiteliales corticales en el timo y en el epitelio del intestino delgado en condiciones normales (Chen *et al.*, 2020), es un miembro de la subfamilia de quimiocinas CC y consiste en un isotipo 1, de 150 aminoácidos y 16.6 kDa, un isotipo 2, de 84 aminoácidos y 9.5 kDa, y un isotipo 3, de 149 aminoácidos y 16.5 kDa (Tu *et al.*, 2016).

Se observó que la interacción CCL25/CCR9 es esencial para el “homing” de los progenitores de los linfocitos T CCR9<sup>+</sup> en el timo, para desarrollo y mantenimiento de la composición de células inmunes presentes en el intestino, donde la mayoría de los linfocitos expresan CCR9, y es un componente crítico de la respuesta antiinflamatoria tisular, incluyendo el intestino delgado y el hígado (Chen *et al.*, 2020).

Los linfocitos T CCR9<sup>+</sup> tienen un mayor potencial de ser activados y de producir citoquinas proinflamatorias y los linfocitos T “helper” CCR9<sup>+</sup> pueden promover la expansión y supervivencia de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos). El fenotipo, más activo, de los linfocitos T CCR9<sup>+</sup>, tanto *in vivo* como *in vitro*, parece indicar que median una respuesta antitumoral más fuerte que el resto (Chen *et al.*, 2020).

La correlación entre un aumento de los linfocitos T CCR9<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> y la supervivencia prolongada en pacientes con melanoma implica que esos linfocitos T pueden mediar respuestas antitumorales más fuertes que el resto de los linfocitos T (Jacquelot *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha demostrado que la presencia de CCL25 intratumoral promueve la infiltración de linfocitos CCR9<sup>+</sup> (Chen *et al.*, 2020). Todo lo cual sustenta el hecho de que el tratamiento con anticuerpos que reconocen y neutralizan CCL25 acelera el crecimiento de tumores, según se ha probado en un modelo tumoral que expresa CCL25 en ratón (Jacquelot *et al.*, 2016).

CCR9 es expresado en múltiples cánceres y ejerce un potente efecto inmunorregulador en los linfocitos T, reduciendo la señalización STAT (es la ruta encargada de comunicar al núcleo las señales químicas externas para comenzar la transcripción). Como resultado disminuye la secreción de citoquinas por parte de los linfocitos “T-helper” y, consecuentemente, su capacidad citotóxica. Además, inhibir la expresión de CCR9 en las células tumorales ayuda a la inmunoterapia de cáncer humano mediado por linfocitos T. El silenciamiento de CCR9 en las células tumorales aumenta la lisis celular mediada por

linfocitos T citotóxicos, lo cual se ve revertido ante una sobreexpresión de CCR9 (Khandelwal *et al.*, 2015)

Las quimiocinas, aparte de otras funciones, regulan las habilidades migratorias e invasoras de las células cancerígenas. Muchos estudios han confirmado que CCR9 y su exclusivo ligando, CCL25, están sobreexpresados en gran variedad de tumores malignos y están asociados con la proliferación tumoral, la apoptosis, la metástasis y la resistencia a fármacos (Xu *et al.*, 2020).

- **La proliferación** es un proceso caracterizado por el aumento de la división celular que conduce a un aumento del número de células (Alberts *et al.*, 2003). La proliferación ilimitada es una cualidad única de los tumores y tiende a causar enormes daños en las células y tejidos adyacentes. Se ha demostrado que la interacción CCL25/CCR9 facilita la proliferación de las células cancerígenas en el páncreas. La sobreexpresión de CCR9 en el carcinoma hepatocelular provoca un aumento de la división celular aumentando la proliferación del carcinoma. Además, la presencia de CCL25 facilita la proliferación del carcinoma nasofaríngeo. Sin embargo, si silenciamos CCR9, este efecto se ve suprimido (Xu *et al.*, 2020).
- **La apoptosis** es un proceso fisiológico de muerte celular programada llevado a cabo por aquellas células que ya no son necesarias en organismos multicelulares. Puede desencadenarse tanto por factores internos, como por señales extracelulares (Alberts *et al.*, 2003). La evidencia nos indica que generalmente CCL25/CCR9 tiene un efecto antiapoptótico en las células cancerígenas (Xu *et al.*, 2020). La activación de CCR9 produce un amplio rango de actividades antiapoptóticas en las células hematopoyéticas leucémicas (Youn *et al.*, 2001). Inhibir la interacción CCL25/CCR9 en las células cancerígenas de pulmón provoca el aumento de la apoptosis de las mismas. Además, se observó que la interacción CCL25/CCR9 provoca un aumento en la expresión de proteínas antiapoptóticas y un descenso de las apoptóticas (Li *et al.*, 2015).
- **La metástasis** es una de las propiedades de las células tumorales malignas, que tras acumular una gran cantidad de mutaciones adquieren la capacidad de transferir cáncer de un órgano a otro (Alberts *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la expresión de CCR9 está asociada con la metástasis en órganos específicos. En varios tipos de carcinoma de ovario se ha observado un aumento de CCR9 con respecto a

los niveles en ovarios sanos (Xu *et al.*, 2020). Lo cual está relacionado con su capacidad migratoria e invasiva hacia órganos con gradientes superiores de CCL25. Siendo el intestino, cuyas células son una fuente de CCL25, un sitio muy común para la migración metastática de células de carcinoma de ovario. Por último, la quimiocina CCL25, de manera dependiente a su receptor CCR9, estimula la producción de colagenasas incrementando la capacidad metastática del cáncer de ovario (Johnson *et al.*, 2010).

- **La resistencia** a cisplatino en los carcinomas de ovario está relacionada con la interacción entre CCL25/CCR9, ya que esta reprime la apoptosis inducida por el quimioterapéutico (Johnson *et al.*, 2010).

#### 1.4.2. Anticuerpos 91R y 92R como inmunoterapéuticos

91R es un anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina G2b procedente de ratón que reconoce de forma específica el receptor de quimiocinas CCR9 humano. Se ha comprobado que 91R ejerce una relación competitiva con CCL25 por el sitio de reconocimiento específico de CCR9, disminuyendo el efecto ejercido por CCL25. El anticuerpo 91R induce citotoxicidad a través de dos vías: la vía citotóxica dependiente de complemento y la vía citotóxica dependiente de anticuerpo cuyas células efectoras son las “natural killers” (NKs). Los tumores leucémicos humanos, injertados en ratón y tratados con 91R, presentan un aumento de la necrosis y la apoptosis, y una reducción de la angiogénesis y la proliferación (Chamorro *et al.*, 2014).

92R es un anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina G2a de ratón creado usando la isoforma A del CCR9 humano como inmunógeno. Se ha demostrado que 92R se une con gran afinidad al dominio N-terminal de la CCR9 humana, compitiendo con 91R por la unión con el receptor. Las diferencias entre 91R y 92R fueron corroboradas *in vivo*, resultando más eficaz 92R a la hora de tratar tumores leucémicos humanos CCR9<sup>+</sup> injertados en ratón. Estas diferencias pueden deberse tanto a la diferencia en el paratopo de los anticuerpos, como al uso de diferentes isoformas de la inmunoglobulina, siendo inmunoglobulina G2b para el anticuerpo 91R e inmunoglobulina G2a para el anticuerpo 92R (Somovilla-Crespo *et al.*, 2018).

### **1.4.3. Anticuerpo SRB1 como inmunoterapéutico**

SRB1 es un anticuerpo humanizado que reconoce de forma específica el receptor de quimiocinas humano CCR9 que ha sido desarrollado por la empresa “SunRock Biopharma” a partir de los anticuerpos monoclonales murinos empleados en el estudio de Chamorro *et al.* (2014). Este anticuerpo ha sido optimizado mediante mutagénesis dirigida para aumentar su capacidad de reconocer a CCR9 y su capacidad de desencadenar la ruta citotóxica dependiente de anticuerpo tanto de NKs como de linfocitos T (resultados sin publicar de SunRock Biopharma).

## 2. Objetivos

En la lucha contra el cáncer uno de los objetivos principales es parar e incluso reducir el crecimiento de los tumores malignos, salvando así la vida del paciente. Para ello es crucial el desarrollo de fármacos, tratamientos y operaciones que además de combatir el cáncer, reduzcan en todo lo posible los efectos secundarios. La inmunoterapia logra esto al desarrollar anticuerpos específicos de dianas terapéuticas contra el cáncer, que son capaces, no solo de desencadenar la respuesta inmune del propio organismo, sino de guiarla para provocar la lisis de las células que conformarían el tumor, reduciendo al mínimo los efectos secundarios derivados del uso de esta técnica.

El objetivo del presente Trabajo Fin de Máster es el estudio del efecto de un anticuerpo anti-CCR9 (SRB1) como inmunoterapéutico ante el cáncer de ovario. Para ello se realizaron los siguientes experimentos:

- Cuantificación de la eficacia de un método de aislamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, de cara a futuros experimentos.
- Estudio de la expresión de CCR9, para conocer qué líneas celulares serán más susceptibles al inmunoterapéutico y en qué condiciones.
- Estudio del efecto de SRB1 *in vitro*, empleando como modelo de experimentación las líneas celulares A2780 WT y A2780 Cis.

El plan de trabajo que se ha seguido para llevar a cabo estos objetivos se muestra en la tabla 1:

MES	PLAN DE TRABAJO
Octubre 2021	Aprendizaje de técnicas (Western Blot, citometría, microscopia y cultivo celular)
Noviembre 2021	Búsqueda de bibliografía y diseño experimental
Noviembre - Enero 2021-2022	Realización de los experimentos y obtención de datos
Enero - Febrero 2022	Análisis de datos y redacción del Trabajo Fin de Máster
Febrero 2022	Preparación del Trabajo Fin de Máster para su defensa

**Tabla 1.-** Esquema representativo de la organización del presente Trabajo Fin de Máster.

### **3. Material y métodos**

#### **3.1. Líneas celulares**

Para la realización del estudio se utilizaron 4 líneas celulares diferentes, HEK293 pCI-neo (línea celular inmortalizada de riñón de embrión humano transfectada con el plásmido pCI-neo) [suministrada por “SunRock Biopharma”], HEK293 CCR9 (en este caso, el plásmido tiene un inserto para expresar la proteína CCR9) [suministrada por “SunRock Biopharma”], A2780 WT (línea celular de cáncer de ovario) [suministrada por “Merck Life Science”] y A2780 Cis (línea celular de cáncer de ovario resistente a cisplatino) [suministrada por “Merck Life Science”]. Las líneas fueron cultivadas a 37° C, oscuridad, aireación constante y medio de cultivo específico, medio comercial “RPMI-1640” con el añadido de un 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-Glutamina, 100 unidades/mL de Penicilina y 100 µg/mL de Estreptomicina para las líneas A2780 y medio comercial DMEM con los mismos añadidos para las líneas HEK293. La resistencia al cisplatino en la línea A2780 Cis fue mantenida realizando un tratamiento de 48 h con cisplatino 1 µM cada 3 pases del cultivo y las células transfectadas de la línea HEK293 CCR9 fueron mantenidas mediante selección positiva cultivándola con Geneticina 10 µg/mL.

#### **3.2. Estudio de la expresión de CCR9**

Para estudiar la expresión de CCR9 en las distintas líneas y condiciones se empleó la técnica de western blot, que sirve para medir la concentración de proteínas de forma relativa y por comparación, siguiendo el procedimiento descrito por Mahmood y Yang (2012). En un gel de acrilamida 12% cargan las muestras de interés, previamente preparadas con 50 µg de proteína y aplicándoles un shock térmico de 5 min a 95 °C, y se hace correr durante 2h aplicando una corriente de 25 mA por gel. Tras esto se traspasan las proteínas a una membrana de PVDF con poros de 0,45 µm para su inmovilización. Para ello se emplean papeles de filtro empapados en tampones de isopropanol 20% y concentraciones crecientes de tris base, colocándolos en un “Semi-Dry Blotter” de la siguiente manera: ánodo, 6 filtros con Tris Base 25 mM y ácido aminocaproico 40 mM, gel de la electroforesis, membrana de PVDF, 3 filtros con Tris Base 25 mM, 6 filtros con Tris Base 250 mM y el cátodo. Se cierra el “Semi-Dry Blotter” y se somete a una corriente de 44 mA durante 1h 30 min. Se fija con tampón de bloqueo (2,5 g de leche en polvo disuelta en 50 mL de Tris Base 25 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,05% (TNT 0,05%)) durante 4 horas. Esta membrana es incubada

con anticuerpo primario anti-CCR9 de conejo (0,961 µg/mL, disuelto en Tris Base 25 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 al 1% (TNT 1%)) toda la noche, y posteriormente con anticuerpo secundario anti-rabbit de cabra (anticuerpo específico que reconoce el anticuerpo de conejo) conjugado con una peroxidasa (dilución 1:5000 [GE Healthcare, NA941V], disuelto en TNT 0,05%) durante 1 hora. Finalmente se empleó una película radiográfica para captar la luz emitida por las peroxidases y se rebeló para leer el western blot.

Se empleó como señal de referencia la proteína GAPDH, la cual es comúnmente empleada en el western blot por su expresión constante (Taylor y Posch, 2014). Para su lectura se repitió el proceso empleando como anticuerpo primario anti-GAPDH de ratón (0,133 µg/mL, disuelto en TNT 1%) y anticuerpo secundario anti-mouse de burro (anticuerpo específico que reconoce el anticuerpo de ratón) conjugado con una peroxidasa (dilución 1:5000 [GE Healthcare, NA931VS], disuelto en TNT 0,05%) ambas incubaciones de una hora.

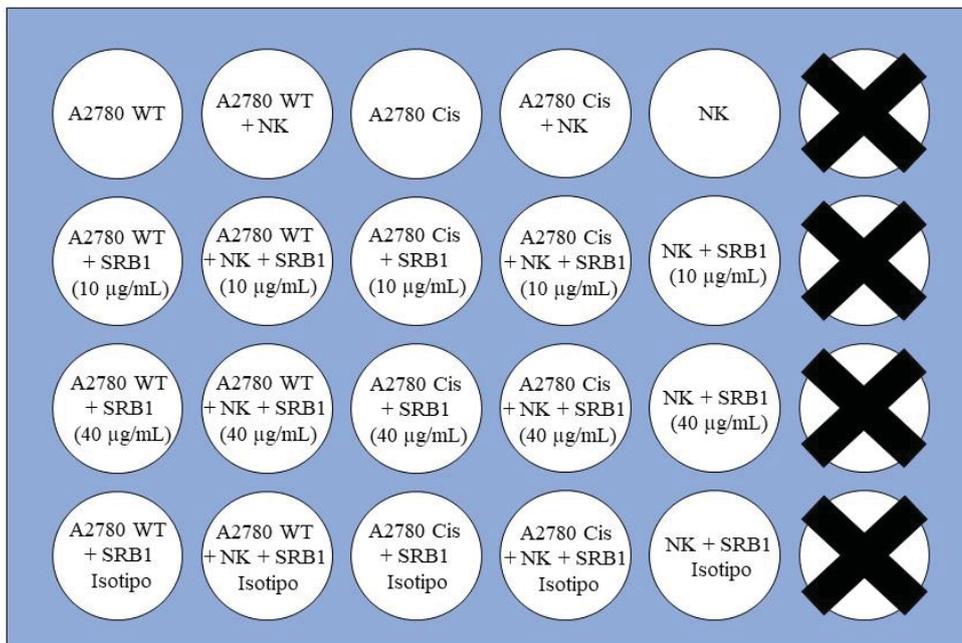
El estudio de la modulación de la expresión de CCR9 se realizó mediante tres aproximaciones diferentes, cuyas condiciones fueron las siguientes:

- Determinación de la expresión de CCR9 en condiciones de hipoxia: se comprobó si la **concentración de oxígeno** afectaba a la expresión de CCR9, ya que la concentración de oxígeno de la zona interior de un tumor es mucho menor por la falta de capilares sanguíneos. Además, se determinó la **dependencia del ligando CCL25** en la expresión del receptor CCR9, tanto en A2780 WT como en A2780 Cis. Para ello, se realizaron 4 condiciones por línea celular, cada uno con un tratamiento distinto, combinando normoxia/hipoxia (0,2% de oxígeno) con presencia/ausencia de CCL25 100 ng/mL, dicho tratamiento se mantuvo durante 24h.
- Influencia de la densidad celular sobre la expresión del receptor CCR9: se comprobó si la **densidad celular** afectaba a la expresión de CCR9, para ver si esta aumentaba a medida que lo hacía el tamaño del tumor, en las líneas celulares A2780 WT, A2780 Cis, HEK293 pCI-neo y HEK293 CCR9. Para ello, se realizaron 2 condiciones por línea celular ( $0.2 \times 10^6$  cels/mL y  $1 \times 10^6$  cels/mL), manteniendo las células en cultivo durante 24h.
- Determinación de la expresión de CCR9 en presencia del quimioterápico cisplatino: se comprobó si la **presencia de cisplatino** en el medio de cultivo afectaba a la expresión de CCR9 como mecanismo generador de resistencia, debido a que la

interacción CCL25/CCR9 está relacionada con la resistencia al quimioterapéutico (Johnson *et al.*, 2010), tanto en A2780 WT como en A2780 Cis con diferentes tiempos de incubación. Para ello, se realizaron 6 condiciones por línea celular, cada una con un tratamiento distinto, combinando presencia/ausencia de cisplatino 1,5  $\mu\text{M}$  con tres tiempos de incubación distintos, 24/48/72 horas.

### 3.3. Valoración del efecto inmunoterapéutico de SRB1 mediado por NKs

Esta valoración será llevada a cabo sobre las líneas A2780 WT y A2780 Cis. Ambas serán teñidas con un fluoróforo verde, mediante un kit comercial de PKH67 (SIGMA-ALDRICH, 2012), para poder identificarlas y visualizarlas durante todo el experimento, y con 7-AAD para realizar un seguimiento de la mortalidad celular. En una placa de 24 pocillos se siembran en 5 cultivos distintos: células tumorales (WT y A2780 Cis), efectoras (NKs) solas y co-cultivo de células tumorales + NKs (Figura 3) [se siembran de 6500 células tumorales y 20 veces más NKs por pocillo]. Cada uno de estos cultivos será sometido a 4 tratamientos distintos: control, SRB1 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , SRB1 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e isotipo de SRB1 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , empleando 20 de los 24 pocillos (Figura 3). En adicción, se suplementará el medio con interleucina 2 humana para activar las NKs (Chamarro *et al.*, 2014).



**Figura 3.-** Representación de la distribución empleada para los cultivos y los tratamientos en una placa de 24 pocillos. En esta distribución hay un cultivo en cada columna y un tratamiento en cada fila, dando lugar a 20 pocillos diferentes entre sí.

Pasadas 2 horas de la siembra y justo después de añadir el tratamiento, esta placa se observará al microscopio de fluorescencia (Microscopio: Leica DMI6000B Widefield) y se harán 5 capturas de diferentes posiciones de cada pocillo cada 15 min, empleando el programa “Las X Widefield”, lo que nos permitirá su posterior análisis.

### **3.3.1. Análisis de datos**

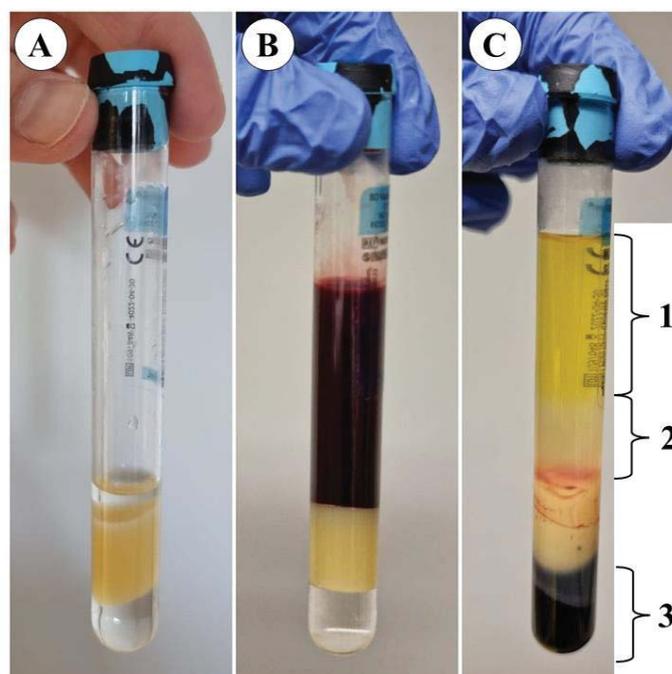
Tras realizar el experimento por triplicado, se empleó el programa “Las X Widefield” para el visualizado de las imágenes, en las cuales se contó el número de células tumorales, totales y muertas, cada 2 horas hasta las 10 horas.

A continuación, estos datos fueron relativizados expresándolos en porcentaje de células tumorales muertas sobre el total de células cancerígenas y restando la mortalidad basal (a tiempo 0) de todos los tiempos medidos, para así eliminar del análisis las células ya muertas al principio del experimento y observar únicamente el efecto de los tratamientos. Se empleo el programa “Excel” para el tratamiento de los datos, que posteriormente se importaron en el programa “GraphPad Prism 9” para el análisis estadístico. Se realizaron los siguientes análisis: (1) prueba “ANOVA” fijando como significativo un  $p$ -valor  $\leq 0.05$ , para comprobar que las diferencias de mortalidad de un tratamiento a diferentes horas no son estadísticamente iguales a 0; (2) prueba “Tukey” fijando como significativo un  $p$ -valor  $\leq 0.05$ , para comprobar si existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos a la misma hora, mediante comparaciones dos a dos, y finalmente; (3) regresión lineal, para obtener la pendiente de la recta de crecimiento de la mortalidad respecto al tiempo, sobre la que se ha inferido el efecto de los tratamientos con anticuerpos, del tratamiento con NKs y del efecto sinérgico de los anticuerpos con las NKs.

Estos efectos fueron calculados restándole a la pendiente de la regresión lineal de cada tratamiento la pendiente de la regresión lineal del control (células tumorales sin anticuerpos ni NKs). El efecto sinérgico de los anticuerpos con las NKs se calculó restándole al efecto del tratamiento conjunto el efecto de los otros dos tratamientos individuales, entendiendo que la diferencia entre la suma de ambos tratamientos y el tratamiento conjunto se debe a una sinergia entre ambos tratamientos.

### 3.4. Determinación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>

Para la determinación de la pureza del aislamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> se empleó la técnica de citometría. En primer lugar, tras la aprobación por parte de un comité ético, se extrajo sangre de un donante sano en tubos con citrato de sodio como anticoagulante, ficoll para la separación en fases y gel que ayuda a esta separación. Antes de que pasasen 2 horas desde la extracción sanguínea estos tubos se centrifugaron 15 min a 1500G sin frenado en la centrifuga para no dañar las células, lo cual alarga el proceso 15 min. Con esto, la sangre queda separada en tres fases, la superior y la inferior son el plasma y los eritrocitos respectivamente, que serán desechadas, y entre ambas se encuentra una fase de células mononucleares de la sangre periférica, que fueron cuidadosamente separadas (Figura 4). De estas células se obtuvieron los linfocitos T CD8<sup>+</sup> empleando un kit comercial basado en selección negativa (“CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit” de la marca “Miltenyi Biotec”), se dejaron atrapadas las células que no nos interesaban en una columna magnética cuya selección se realiza por anticuerpos y la unión con un componente magnético, gracias a la complementariedad de la biotina (Miltenyi Biotec, 2020).



**Figura 4.-** Distintas etapas de la separación de la sangre en fases. (A) Tubo en el que se extraerá la sangre, preparado con citrato de sodio, en la parte superior, gel para ayudar a la separación, en el medio, y ficoll en la parte inferior. (B) Tubo tras la extracción de la sangre, en la que esta se encuentra mezclada con el citrato de sodio para evitar la coagulación. (C) Tubo con sangre tras ser centrifugado, en el cual se distinguen las distintas fases: (C.1) plasma, (C.2) células mononucleares de la sangre periférica y (C.3) eritrocitos.

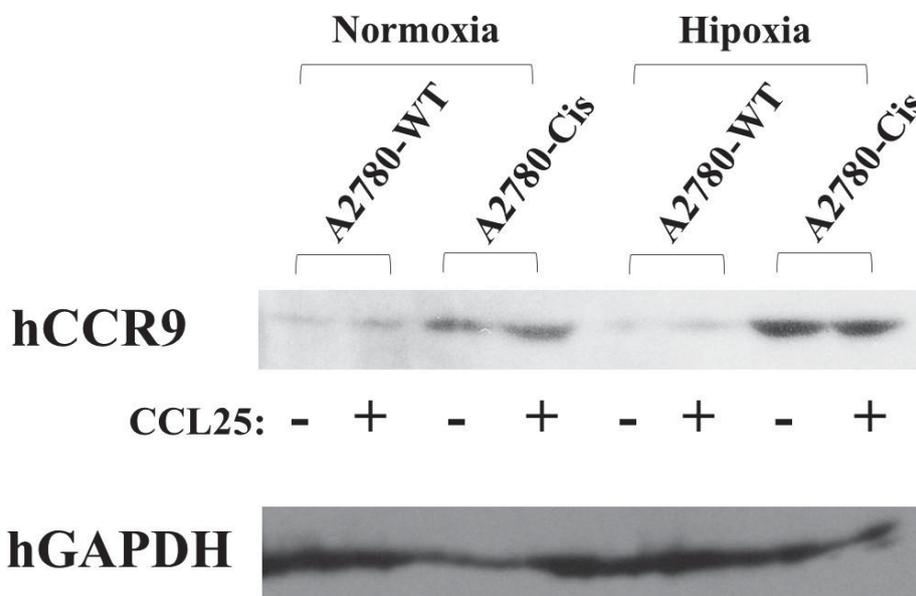
Tras este procedimiento se obtuvo una muestra rica en linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Para determinar la pureza de la muestra se analizó por citometría siguiendo las indicaciones del fabricante del kit de selección (Miltenyi Biotec). Para ello, se realizaron varias tinciones de 30 min con los anticuerpos y sus isotipos conjugados a fluoróforos: ficoeritrina (PE) conjugada con anti-CD3 (2,5 µg/mL; su isotipo 1,25 µg/mL), fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) conjugada con anti-CD8 (10 µg/mL; su isotipo 10 µg/mL) y alofococianina (APC) conjugada con CD56 (2,5 µg/mL; su isotipo 2,5 µg/mL). Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> darán positivo en CD3 y CD8 y negativo en CD56. Estos receptores fueron escogidos de forma específica para poder discernir nuestras células de interés. La viabilidad fue medida mediante una tinción de 10 min con 7-AAD (0,5 µg/mL), un fluoróforo rojo que se une al ADN, particularmente a las regiones ricas en guanina y citosina, de tal manera que solo emitirá fluorescencia cuando las células lisen. Finalmente, los datos fueron analizados con el programa informático "FlowJo". Para este análisis se seleccionó el grupo de células cuyo tamaño y complejidad se corresponde con los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y en las muestras control, teñidas con fluoróforos conjugados a anticuerpos isotipo, el 99% de las células se marcaron como negativas para la tinción y se extrapolaron esa selección a la muestra teñida con los fluoróforos conjugados con anticuerpos específicos para la visualización de los resultados.

## 4. Resultados

### 4.1. Efecto ambiental sobre la expresión de CCR9

#### 4.1.1. Efecto de la concentración de oxígeno y la presencia de ligando CCL25 sobre la expresión de CCR9

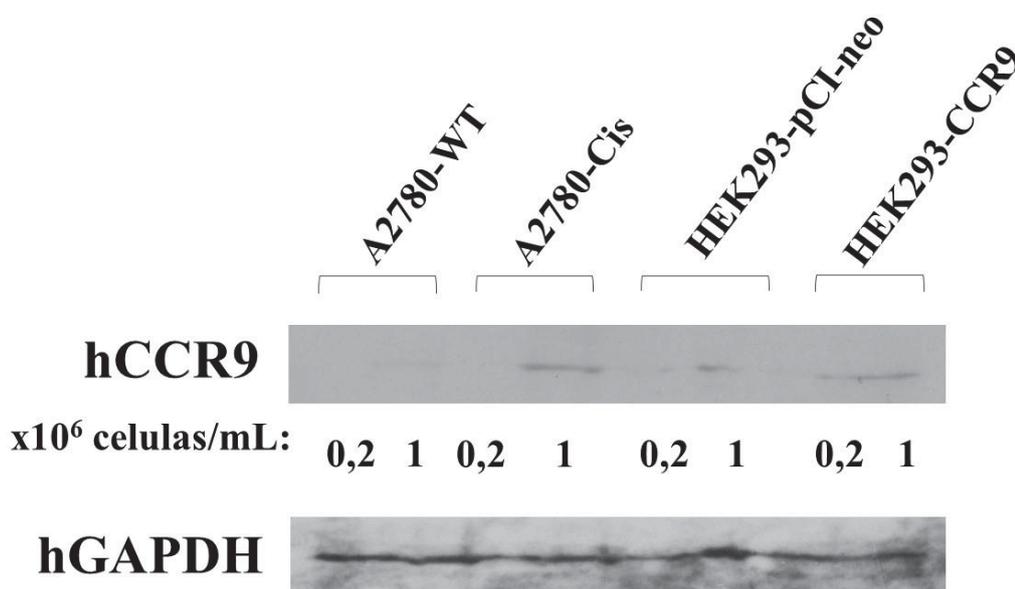
Con el objetivo de observar el efecto que tiene un medio hipóxico, como sería el interior de un tumor canceroso, y la presencia de ligando CCL25 sobre la expresión de CCR9 en dos líneas celulares de cáncer de ovario (A2780 WT y A2780 Cis), se realizó un western blot (Figura 5). Como se puede observar, la línea celular A2780 Cis presenta una mayor concentración de CCR9 que la línea A2780 WT. Con respecto a la concentración de oxígeno, la prueba parece indicar que aumenta la expresión de CCR9 en hipoxia en la línea celular A2780 Cis, mientras que en la línea celular A2780 WT, se observa una mayor expresión en normoxia, pero esta es mínima y no se puede asegurar que sea representativa. Para finalizar, la presencia de ligando CCL25 en el medio no presentó ninguna diferencia apreciable en ninguna de las dos líneas celulares, independientemente de la concentración de oxígeno.



**Figura 5.-** Muestra de un resultado representativo de cuatro pruebas independientes de western blot en las que se leyó la expresión de CCR9, como proteína de interés, y GAPDH, como proteína control, en las líneas celulares A2780 WT y A2780 Cis para diferentes condiciones, tanto de concentración de oxígeno como de presencia o ausencia de ligando CCL25 en el medio de cultivo.

#### 4.1.2. Efecto de la densidad celular sobre la expresión de CCR9

Con el objetivo de estudiar que efecto tiene la densidad celular sobre la expresión de CCR9 en 4 líneas celulares (A2780 WT, A2780 Cis, HEK293 pCI-neo y HEK293 CCR9), se realizó un western blot (Figura 6). Como se puede observar, la línea celular con menor expresión de CCR9 es la A2780 WT seguida de HEK293 pCI-neo, mientras que en el resto de las líneas no se aprecian diferencias. Con respecto a la densidad celular, en la línea A2780 WT se observa una mayor expresión, aunque muy baja, de CCR9 a mayor densidad celular. En las líneas A2780 Cis y HEK293 pCI-neo se observa una clara mayor expresión de CCR9 a mayor densidad celular. En último lugar, en la línea HEK293 CCR9 no se observa una clara diferencia en la expresión de CCR9 a diferente densidad celular.

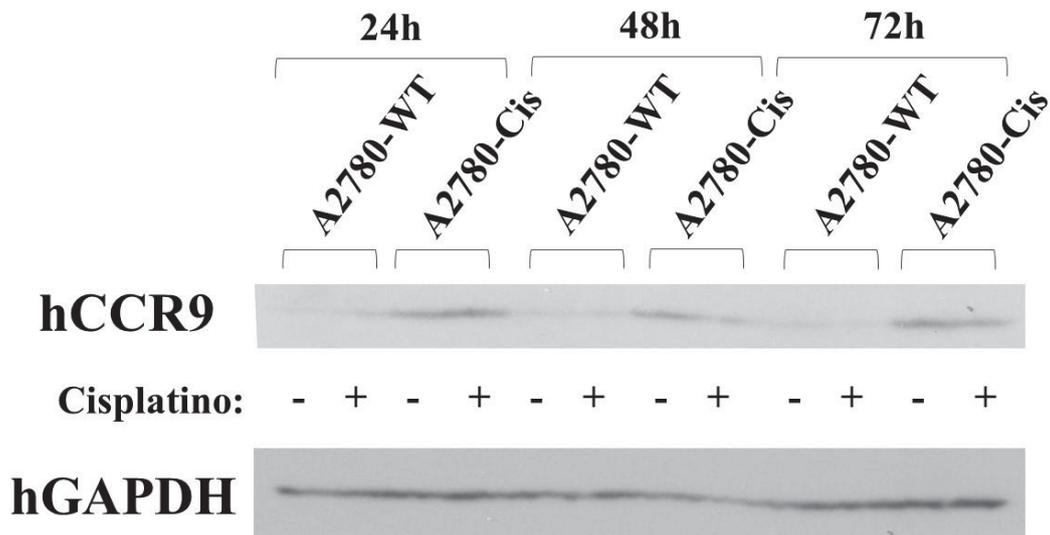


**Figura 6.-** Muestra de un resultado representativo de tres pruebas independientes de western blot en las que se leyó la expresión de CCR9, como proteína de interés, y GAPDH, como proteína control, en las líneas celulares A2780 WT, A2780 Cis, HEK293 pCI-neo y HEK293 CCR9 para diferentes concentraciones celulares, 10<sup>6</sup> células/mL y 0,2 x 10<sup>6</sup> células/mL.

#### 4.1.3. Efecto de la presencia de cisplatino sobre la expresión de CCR9

Con el objetivo de estudiar el efecto que tiene la presencia de cisplatino sobre la expresión de CCR9 en dos líneas celulares de cáncer de ovario (A2780 WT y A2780 Cis), se realizaron un western blot (Figura 7). Como se puede observar, en todas las condiciones la línea A2780 Cis presenta una mayor expresión de CCR9 que la línea A2780 WT. Los

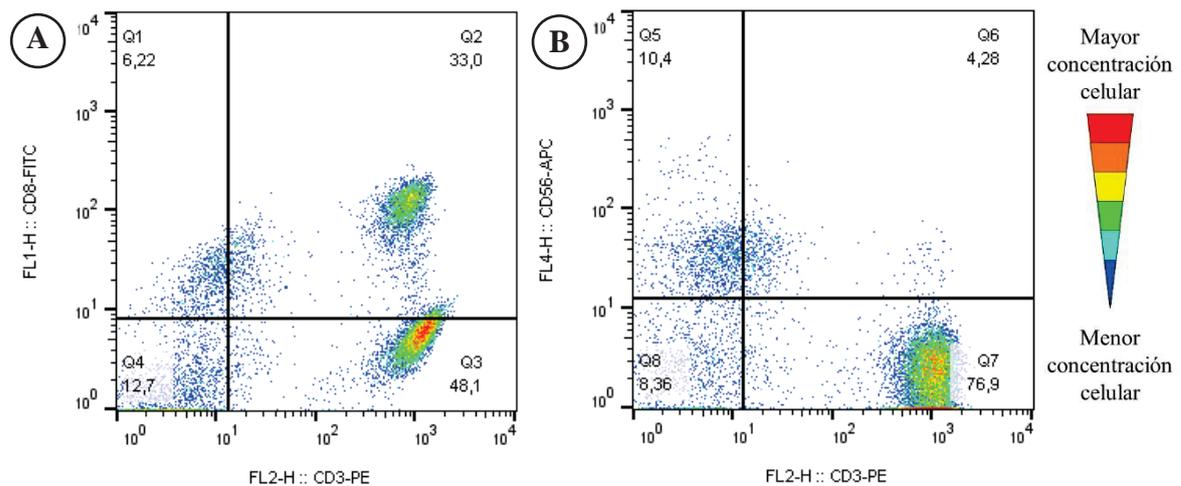
resultados obtenidos de analizar la expresión de CCR9 en presencia de cisplatino en el medio, son que no se observa ninguna diferencia en ninguna de las líneas con respecto a la ausencia del quimioterapéutico, independientemente de la duración del tratamiento.



**Figura 7.-** Muestra de un resultado representativo de tres pruebas independientes de western blot en las que se leyó la expresión de CCR9, como proteína de interés, y GAPDH, como proteína control, en las líneas celulares A2780 WT y A2780 Cis para las condiciones de presencia o ausencia de cisplatino en el medio durante 24/48/72 horas.

#### 4.2. Pureza del aislamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>

Con el objetivo de analizar la eficacia del sistema de aislamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> mediante selección negativa del kit comercial de la marca “Miltenyi Biotec”, con el propósito de emplearlo en futuros experimentos, se realizó un análisis por citometría de un cultivo enriquecido en linfocitos T CD8<sup>+</sup> a los dos días de su obtención con este kit. Como podemos observar en la figura 8, las tinciones fueron realizadas con anticuerpos anti-CD3, anti-CD8 y anti-CD56, de los cuales solo los dos primeros se unirán a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. En la figura 8 A, podemos observar que 33 % de las células son positivas para CD3 y CD8 (Cuadrante 2), mientras que en la figura 8 B, se ve que del 81,18 % de células son positivas para CD3 (Cuadrantes 6 y 7) el 76,9 % son negativas a CD56 (Cuadrante 7). Con la extrapolación de estos resultados obtenemos que el porcentaje de células positivas para CD8 y CD3 y a su vez negativas para CD56, el cual se corresponde con los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, equivale a un 31,26 % de las células en la muestra.

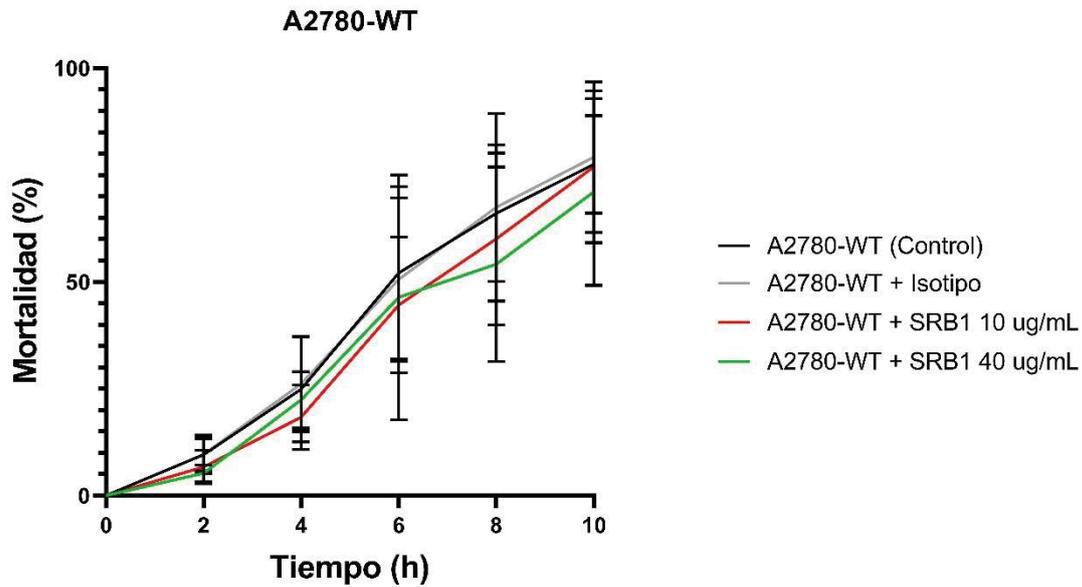


**Figura 8.-** Resultado de un análisis por citometría de un cultivo enriquecido de linfocitos T CD8<sup>+</sup> o citotóxicos obtenidos mediante selección negativa en células mononucleares de la sangre periférica separada de la sangre de donantes sanos, realizado con el programa “FlowJo”. (A) Se representó la distribución de las células vivas (7-AAD negativas) en función de la fluorescencia emitida por PE conjugada con el anticuerpo específico anti-CD3 y la fluorescencia emitida por FITC conjugada con el anticuerpo específico anti-CD8, siendo las células situadas en los cuadrantes Q2 y Q3 positivas en CD3 y las situadas en los cuadrantes Q1 y Q2 positivas en CD8. (B) Se representó la distribución de las células vivas (7-AAD negativas) en función de la fluorescencia emitida por PE conjugada con el anticuerpo específico anti-CD8 y la fluorescencia emitida por APC conjugada con el anticuerpo específico anti-CD56, siendo las células situadas en los cuadrantes Q6 y Q7 positivas en CD3 y las situadas en los cuadrantes Q5 y Q6 positivas en CD56. En ambas gráficas aparece indicado el porcentaje de células que se encuentran en cada cuadrante.

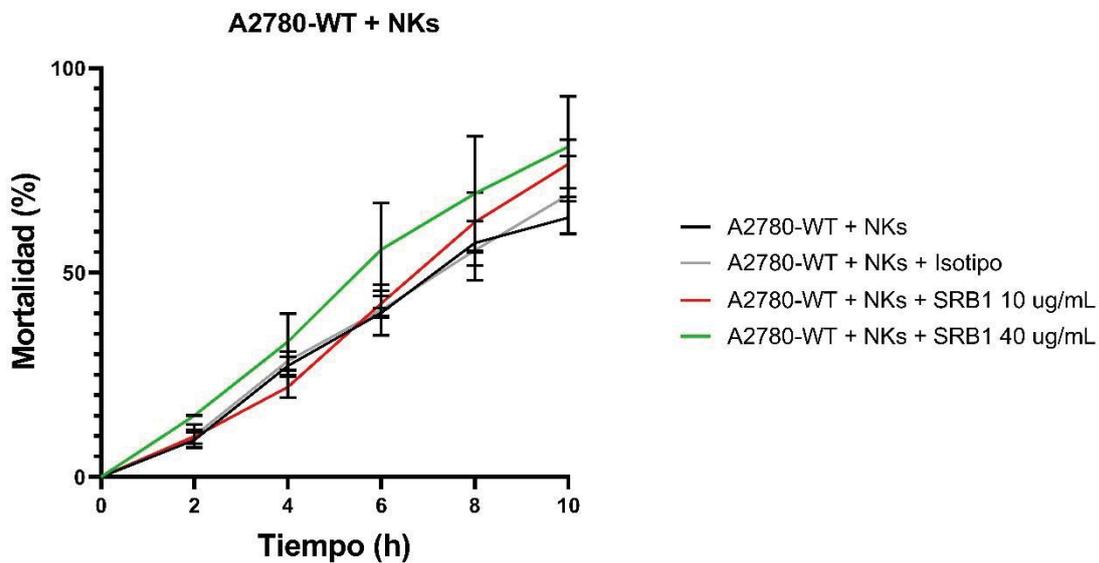
### 4.3. Efecto inmunoterapéutico de SRB1

Con el objetivo de analizar la eficacia del anticuerpo anti CCR9, SRB1 como inmunoterapéutico, se realizaron 3 experimentos con las líneas celulares A2780 WT y A2780 Cis. En estos experimentos se cultivaron las células tumorales con y sin NKs sometiénolas a diferentes concentraciones del anticuerpo SRB1 y a un isotipo del mismo (Figuras 9, 10, 11 y 12), con el fin de determinar la existencia de un efecto sinérgico entre este anticuerpo y el efecto de las NKs, además de poder comparar como varia este efecto entre ambas líneas celulares.

#### 4.3.1. Efecto inmunoterapéutico de SRB1 sobre la línea A2780 WT



**Figura 9.-** Mortalidad en función del tiempo, expresada en porcentaje, promediada de tres experimentos con la línea celular de cáncer de ovario A2780 WT. Se representa en negro el cultivo de la línea A2780 WT sin tratamiento, en gris este cultivo con un isotipo de SRB1, en rojo con SRB1 a la concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y en verde cuando la concentración es de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Error estándar representado como medida de dispersión.

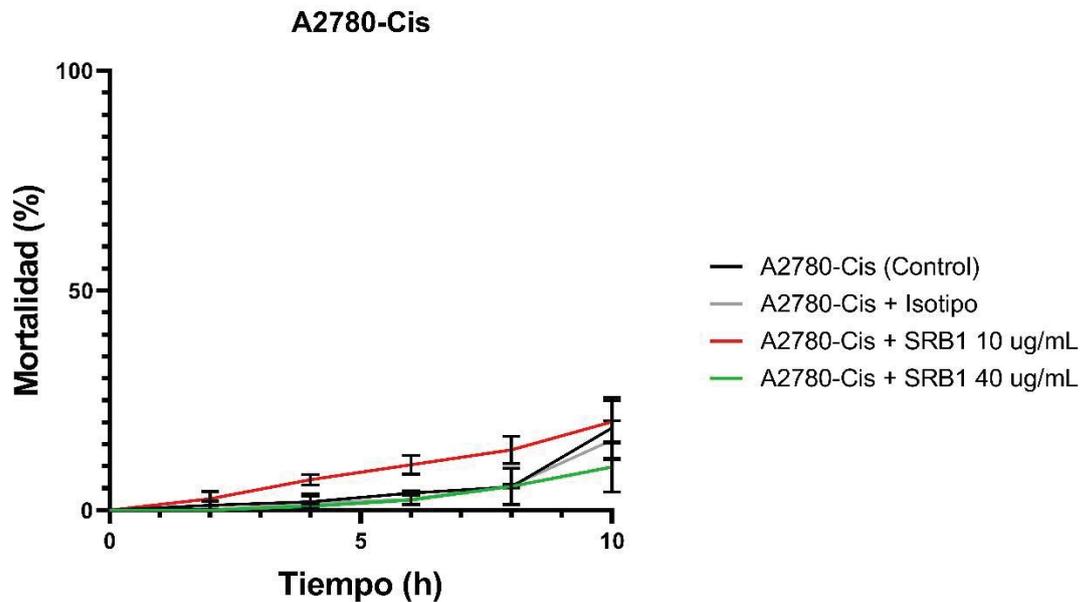


**Figura 10.-** Mortalidad en función del tiempo, expresada en porcentaje, promediada de tres experimentos con el co-cultivo de la línea celular de cáncer de ovario A2780 WT y NKs. Se representa en negro el co-cultivo de la línea A2780 WT con NKs, en gris este co-cultivo con un isotipo de SRB1, en rojo con SRB1 a la concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y en verde cuando la concentración es de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Error estándar representado como medida de dispersión.

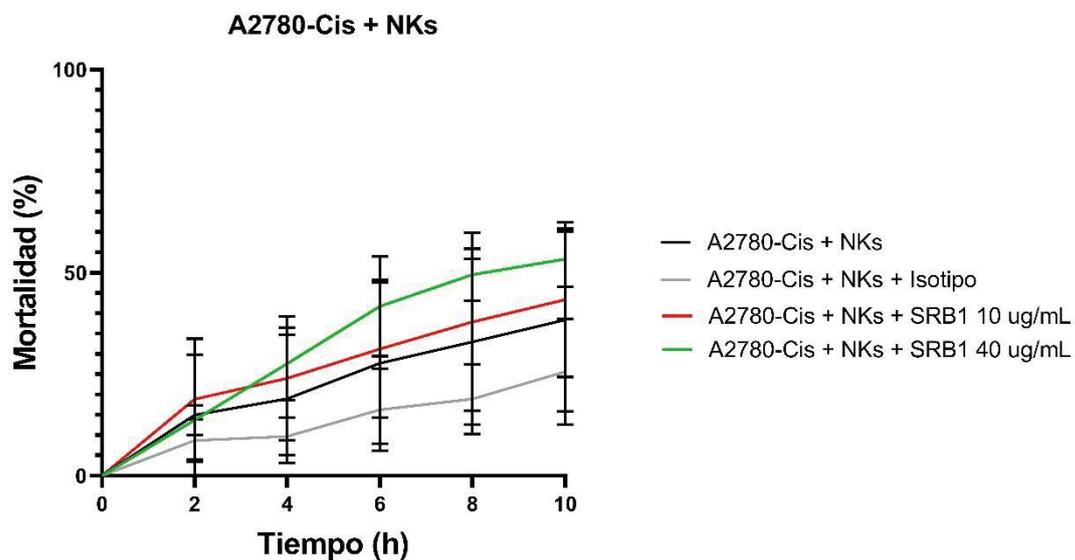
Del análisis de los resultados obtenidos para los cultivos de la línea A2780 WT (Figura 9) y A2780 WT con NKs (Figura 10), se obtuvo que:

- Mediante una prueba “ANOVA” se comprobó que el incremento de la mortalidad con el paso del tiempo es estadísticamente significativo para todos los cultivos ( $p$ -valor < 0,001).
- Mediante una prueba “Tukey” se comprobó, mediante comparaciones dos a dos, que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos cultivos.
- Mediante una regresión lineal se obtuvo la pendiente de la recta de mortalidad en función del tiempo, con esta se calcularon los efectos de los distintos tratamientos:
  - Resultados regresión lineal: Control ( $Y = 8,345 * X - 3,375$ ;  $R^2 = 0,7081$ ), NKs ( $Y = 6,782 * X - 1,058$ ;  $R^2 = 0,9548$ ), isotipo ( $Y = 8,486 * X - 3,602$ ;  $R^2 = 0,6538$ ), SRB1 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $Y = 8,158 * X - 6,351$ ;  $R^2 = 0,6779$ ), SRB1 40  $\mu\text{g/mL}$  ( $Y = 7,516 * X - 4,381$ ;  $R^2 = 0,6687$ ), NKs con isotipo ( $Y = 7,051 * X - 1,290$ ;  $R^2 = 0,8970$ ), NKs con SRB1 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $Y = 8,008 * X - 4,499$ ;  $R^2 = 0,9410$ ) y NKs con SRB1 40  $\mu\text{g/mL}$  ( $Y = 8,422 * X + 0,2108$ ;  $R^2 = 0,8973$ ).
  - Mortalidad en función del tiempo en el control: 8,345 % de células muertas por hora (%/h).
  - Efecto del tratamiento con NKs (-1,563 %/h), isotipo (0,141 %/h), SRB1 10  $\mu\text{g/mL}$  (-0,187 %/h) y SRB1 40  $\mu\text{g/mL}$  (-0,829 %/h).
  - Efecto sinérgico de NKs con isotipo (0,128 %/h), NKs con SRB1 10  $\mu\text{g/mL}$  (1,413 %/h) y NKs con SRB1 40  $\mu\text{g/mL}$  (2,469 %/h).

#### 4.3.2. Efecto inmunoterapéutico de SRB1 sobre la línea A2780 Cis



**Figura 11.-** Mortalidad en función del tiempo, expresada en porcentaje, promediada de tres experimentos con la línea celular de cáncer de ovario A2780 Cis. Se representa en negro el cultivo de la línea A2780 Cis sin tratamiento, en gris este cultivo con un isotipo de SRB1, en rojo con SRB1 a la concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y en verde cuando la concentración es de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Error estándar representado como medida de dispersión.



**Figura 12.-** Mortalidad en función del tiempo, expresada en porcentaje, promediada de tres experimentos con el co-cultivo de la línea celular de cáncer de ovario A2780 Cis y NKs. Se representa en negro el co-cultivo de la línea A2780 Cis con NKs, en gris este co-cultivo con un isotipo de SRB1, en rojo con SRB1 a la concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y en verde cuando la concentración es de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Error estándar representado como medida de dispersión.

Del análisis de los resultados obtenidos para los cultivos de la línea A2780 Cis (Figura 11) y A2780 Cis con NKs (Figura 12), se obtuvo que:

- Mediante una prueba “ANOVA” se comprobó que el incremento de la mortalidad con el paso del tiempo es estadísticamente significativo para todos los cultivos ( $p$ -valor  $< 0,01$ ).
- Mediante una prueba “Tukey” se comprobó, a través de comparaciones dos a dos, que solo existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con y sin NKs tratados con SRB1 40  $\mu\text{g/mL}$  a las 8h ( $p$ -valor = 0,035) y 10 h ( $p$ -valor  $< 0,039$ ).
- Mediante una regresión lineal se obtuvo la pendiente de la recta de mortalidad en función del tiempo, con esta se calcularon los efectos de los distintos tratamientos:
  - Resultados regresión lineal: Control ( $Y = 1,545 * X - 2,537$ ;  $R^2 = 0,5740$ ), NKs ( $Y = 3,638 * X + 3,950$ ;  $R^2 = 0,3373$ ), isotipo ( $Y = 1,390 * X - 2,642$ ;  $R^2 = 0,6512$ ), SRB1 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $Y = 1,963 * X - 0,8390$ ;  $R^2 = 0,8522$ ), SRB1 40  $\mu\text{g/mL}$  ( $Y = 0,9573 * X - 1,688$ ;  $R^2 = 0,5072$ ), NKs con isotipo ( $Y = 2,365 * X + 1,366$ ;  $R^2 = 0,4895$ ), NKs con SRB1 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $Y = 4,014 * X + 5,785$ ;  $R^2 = 0,4045$ ) y NKs con SRB1 40  $\mu\text{g/mL}$  ( $Y = 5,544 * X + 3,252$ ;  $R^2 = 0,8412$ ).
  - Mortalidad en función del tiempo en el control: 1,545 %/h.
  - Efecto del tratamiento con NKs (2,093 %/h), isotipo (-0,155 %/h), SRB1 10  $\mu\text{g/mL}$  (0,418 %/h) y SRB1 40  $\mu\text{g/mL}$  (-0,588 %/h).
  - Efecto sinérgico de NKs con isotipo (-1,118 %/h), NKs con SRB1 10  $\mu\text{g/mL}$  (-0,042 %/h) y NKs con SRB1 40  $\mu\text{g/mL}$  (2,494 %/h).

## **5. Discusión**

### **5.1. Eficacia del aislamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>**

Los linfocitos T son producidos en el timo, y sometidos a una selección por las células presentadoras de antígeno, para cerciorarse de que sus anticuerpos no reconocen epítomos propios, antes de poder circular por la sangre (Male *et al.*, 2006). Es por esto que los linfocitos no sobreviven mucho tiempo, de forma natural, en un cultivo, ya que no tienden a replicarse.

Los resultados obtenidos sobre el aislamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> indicarían, con un 31,26 % de linfocitos T CD8<sup>+</sup> presentes en la muestra, que el kit comercial, basado en selección negativa, proporcionado por la marca “Miltenyi Biotec”, no es lo suficientemente específico. Imposibilitando la garantía de que, de emplearse en un experimento, la respuesta observada sea mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> y no por otro tipo célula mononuclear de la sangre periférica.

Este resultado ha podido verse influenciado por mantener las células en cultivo durante dos días, habiéndose replicado en el cultivo las células que no fueron bien reconocidas por la selección negativa. Esto sumado a la incapacidad de replicarse sin la presencia de un agente mitótico que los linfocitos T presentan cuando se intentan cultivar (Rodríguez *et al.*, 2003), explicaría un porcentaje tan bajo de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la muestra. En contraposición con los obtenidos en otros estudios, llegando a marcar una pureza de linfocitos T CD8<sup>+</sup> superior al 95 % (Finney *et al.*, 2004).

### **5.2. Efecto del microambiente sobre la expresión de CCR9**

El crecimiento descontrolado de los tumores sólidos provoca una mala y baja angiogénesis, esto da lugar a una heterogeneidad en el reparto de oxígeno del tumor. Es común que las células situadas en el centro de un tumor sólido se encuentren en condiciones de hipóxicas (Pogue *et al.*, 2001). Bajo esta premisa y con la intención de emular las condiciones naturales de un tumor de ovario, se sometió a las líneas celulares A2780 WT y A2780 Cis a condiciones de hipoxia durante 24h. Tras esto, se pudo observar como en la línea A2780 Cis aumentaba la expresión de CCR9 (Figura 5). Lo cual apunta a que en los tumores sólidos de cáncer de ovario resistente a cisplatino la concentración de CCR9 es mayor en las zonas más internas del tumor.

Con la misma intención de simular las condiciones naturales en las que se encontraría un tumor, se midió la cantidad de CCR9 expresada a diferentes densidades celulares por las líneas A2780 WT, A2780 Cis, HEK293 pCI-neo y HEK CCR9. Bajo la premisa de que la densidad celular aumenta al aumentar el tamaño del tumor, siendo su zona interna la más densa. Esta prueba mostro que, todas las líneas celulares tenían mayor expresión a mayor densidad celular, salvo HEK CCR9 que presento la misma expresión independientemente de la densidad celular (Figura 6), lo cual puede estar relacionado con que sean células transfectadas para sobreexpresar este receptor. Esto indica que los tumores de ovario de mayor tamaño y sobre todo en la zona interna, especialmente en los resistentes a cisplatino, presenta una mayor expresión de CCR9.

Tras someter las líneas celulares A2780 WT y A2780 Cis a un cultivo con la quimiocina CCL25, el ligando específico de CCR9 (Chen *et al.*, 2020), se observó que la estimulación de CCR9 no media en ningún mecanismo celular que induzca su expresión (Figura 5).

La interacción CCL25/CCR9 se ha demostrado que está relacionada con la resistencia tumoral al cisplatino (Johnson *et al.*, 2010). Esto explica la evidencia de que la línea celular A2780 resistente al cisplatino exprese no solo una mayor cantidad de CCR9 que la línea A2780 WT (Figuras 5, 6 y 7) sino que exprese CCR9 en la misma concentración que HEK293 CCR9, en condiciones óptimas (Figura 6), una línea celular transfectada para expresar cantidades relativamente altas de CCR9 (Chamorro *et al.*, 2014). Esto indicaría que la mayor concentración de CCR9 en el cáncer de ovario resistente a cisplatino ejerce un papel importante en su capacidad de tolerar el quimioterapéutico. Por otra parte, que el cultivo de las líneas A2780 WT y A2780 Cis con cisplatino no haga aumentar la expresión de CCR9 (Figura 7) parece indicar que no hay ningún mecanismo implicado en la expresión de CCR9 que se vea estimulado por la presencia de cisplatino en el medio. Por último, que la expresión de CCR9 no aumentase en la línea A2780 WT tras tres días de exposición a cisplatino nos indica que no es tiempo suficiente para que una línea celular adquiriera resistencia, siendo el método habitual de conseguirlo, el cultivo intermitente con concentraciones cada vez mayores de cisplatino (Godwin *et al.*, 1992).

### 5.3. Efecto inmunoterapéutico de SRB1

La interacción CCL25/CCR9 ha sido descrita como un mecanismo celular que facilita la proliferación en tumores malignos (Xu *et al.*, 2020), como un estimulante de la expresión de proteínas antiapoptóticas y un inhibidor de la expresión de proteínas apoptóticas, reduciendo la muerte celular en el cáncer de pulmón CCR9<sup>+</sup> (Li *et al.*, 2015) y como un agente que genera resistencia al cisplatino, por medio de la inhibición de la apoptosis inducida por el quimioterapéutico, en el cáncer de ovario (Johnson *et al.*, 2010).

La capacidad de CCR9 de inhibir la actividad citotóxica mediada por los linfocitos T fue descrita por primera vez por Khandelwal *et al.*, (2015), avalando a CCR9 como una buena diana inmunoterapéutica. Junto con las pruebas realizadas por Chamorro *et al.* (2014) y por Somovilla-Crespo *et al.* (2018), que demostraron que los anticuerpos monoclonales 91R y 92R, respectivamente, son eficaces para el tratamiento de tumores leucémicos humanos injertados en ratón, dieron pie a la creación del anticuerpo monoclonal SRB1 como inmunoterapéutico para el cáncer de ovario CCR9<sup>+</sup>.

Los resultados obtenidos de la prueba *in vitro* del inmunoterapéutico SRB1, sobre las líneas de cultivo de cáncer de ovario A2780 WT y A2780 Cis, indican un efecto dosis dependiente que es estadísticamente significativo cuando las células A2780 Cis son tratadas con dosis altas de anticuerpo (40 µg/mL). Al ser el único resultado estadísticamente significativo del experimento, corroboraría la hipótesis de que este inmunoterapéutico presenta un mayor efecto en cánceres con mayor concentración de CCR9.

Los datos positivos para el efecto sinérgico de NKs y SRB1, a altas concentraciones, no son estadísticamente significativos comparados con el control. Sin embargo, experimentos similares, como los realizados por Chamorro *et al.* (2014) y por Somovilla-Crespo *et al.* (2018), prueban la eficacia de inmunoterapéuticos similares en tumores leucémicos humanos injertados en ratón, lo que parece indicar que la falta de resultados estadísticamente significativos del presente estudio se deba al poco poder estadístico obtenido con el bajo número de datos que se pudieron recoger. Los resultados del experimento de Chamorro *et al.* (2014) se basan en el análisis de 5 experimentos de citometría y los del experimento de Somovilla-Crespo *et al.* (2018) en 3 experimentos de citometría. La cantidad de células que pueden analizarse por citometría es inalcanzable mediante microscopia y conteo manual, pero se optó por este enfoque por la capacidad de

análisis temporal que ofrece. Por lo que sería recomendable realizar más experimentos para validar los resultados.

Por último, quiero mencionar que, el efecto negativo que parece tener la presencia de NKs sobre la muerte de las células cancerígenas de la línea A2780 WT, reduciendo su mortalidad, podría deberse a la ya alta mortalidad que esta línea presenta al exponerse a los láseres que emplea el microscopio para estimular los fluoróforos. La presencia de NKs reduciría la mortalidad al absorber parte de esta luz, reduciendo su incidencia sobre las células tumorales.

## 6. Conclusiones

Tras el análisis y discusión de los datos recadados en el presente Trabajo Fin de Máster se han podido obtener las siguientes conclusiones:

**1.-** Son necesarios más experimentos para determinar la eficacia del kit de aislamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de la marca “Miltenyi Biotec”.

**2.-** La expresión de CCR9 en cáncer de ovario es mayor en modelos de resistencia a cisplatino, siendo además esta independiente de la presencia del quimioterápico.

**3.-** Condiciones como la elevada densidad celular y la hipoxia, indicadores del microambiente tumoral presente en el cáncer de ovario, están directamente relacionadas con la sobreexpresión del receptor CCR9.

**4.-** Los datos preliminares obtenidos en este trabajo apuntan a que, el inmunoterapéutico SRB1 media en la vía citotóxica dependiente de anticuerpo de las NKs, aumentando la mortalidad de las células tumorales *in vitro*.

## 7. Bibliografía

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science.
- Andonegui, M. E. (2006). Relevancia de la Investigación en Cáncer. *Cancerología*. 1: 226-227.
- Araya, A. O. y Paizano, G. V. (2021). Cáncer de ovario. *Revista Médica Sinergia*. 6 (7): e690.
- Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). (2021). Causas del cáncer. Recuperado el 22 de enero de 2022 de: <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/que-es-cancer/factores-riesgo>
- Chabner, B. A. (2010). Barnett Rosenberg: In Memoriam (1924–2009). *Cancer Research*. 70: 428.
- Chamorro, S., Vela, M., Franco-Villanueva, A., Carramolino, L., Gutiérrez, J., Gómez, L., Lozano, M., Salvador, B., García-Gallo, M., Martínez-A, C., Kremer, L. (2014). Antitumor effects of a monoclonal antibody to human CCR9 in leukemia cell xenografts. *MAbs*. 6 (4): 1000-1012.
- Chen, H., Cong, X., Wu, C., Wu, X., Wang, J., Mao, K., Li, J., Zhu, G., Liu, F., Meng, X., Song, J., Sun, X., Wang, X., Liu, S., Zhang, S., Yang, X., Song, Y., Yang, Y., Sun, T. (2020). Intratumoral delivery of CCL25 enhances immunotherapy against triple-negative breast cancer by recruiting CCR9<sup>+</sup> T cells. *Science advances*. 6(5): 4690.
- Crabb, E. y Moore, E. (2010). Metal and life. Recuperado el 22 de enero del 2022 de: <https://prospect.rsc.org/metalsandlife/>
- Finney, H. M., Akbar, A. N., Lawson, A. D. (2004). Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR $\zeta$  chain. *The Journal of Immunology*. 172(1): 104-113.
- Garcell, A. J. B., Gámez, N. B. S., Ginés, R. T., Montero, M. D. L. Á. L., Coronel, A. A. N. (2019). *Cancer Biology*. *Correo Científico Médico de Holguín*. 23(4).
- Godwin, A. K., Meister, A., O'Dwyer, P. J., Huang, C. S., Hamilton, T. C., Anderson, M. E. (1992). High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89(7): 3070-3074.
- Instituto Nacional del Cáncer. (2015). Quimioterapia para tratar el cáncer. Recuperado el 22 de enero de 2022 de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia>
- Jacquelot, N., Enot, D. P., Flament, C., Vimond, N., Blattner, C., Pitt, J. M., Yamazaki, T., Roberti, M. P., Daillère, R., Vétizou, M., Poirier-Colame, V., Semeraro, M., Caignard, A., Slingluff Jr., C. L., Sallusto, F., Rusakiewicz, S., Weide, B., Marabelle, A., Kohrt, H., Dalle, S., Cavalcanti, A., Kroemer, G., Di Giacomo, A. M., Maio, M., Wong, P., Yuan, J., Wolchok, J., Umansky, V., Eggermont, A., Zitvogel, L. (2016). Chemokine receptor patterns in lymphocytes mirror metastatic spreading in melanoma. *The Journal of clinical investigation*. 126(3): 921-937.
- Jasin, M. (2002). Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection. *Oncogene*. 21: 8981-93.
- Johnson, E. L., Singh, R., Singh, S., Johnson-Holiday, C. M., Grizzle, W. E., Partridge, E. E., Lillard, J. W., Jr. (2010). CCL25-CCR9 interaction modulates ovarian cancer cell migration, metalloproteinase expression, and invasion. *World Journal of Surgical Oncology*. 8: 62.
- Khandelwal, N., Breinig, M., Speck, T., Michels, T., Kreutzer, C., Sorrentino, A., Kumar, A. S., Umansky, L., Conrad, H., Poschke, I., Offringa, R., Köning, R., Bernhard, H., Machlenkin, A., Boutros, M., Beckhove, P. (2015). A high-throughput RNAi screen for detection of immune-checkpoint molecules that mediate tumor resistance to cytotoxic T lymphocytes. *EMBO Molecular Medicine*. 7: 450–463.
- Li, B., Wang, Z., Zhong, Y., Lan, J., Li, X., Lin, H. (2015). CCR9-CCL25 interaction suppresses apoptosis of lung cancer cells by activating the PI3K/Akt pathway. *Medical Oncology*. 32: 66.
- Mahmood, T. y Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*. 4(9): 429.

- Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B., Roitt, I. (2006). Immunology. Canada: Elsevier.
- Miltenyi Biotec. (2020). CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit. Recuperado el 2 de enero de 2022 de: <https://www.miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0001984.PDF>
- Ministerio de Trabajo, Migraciones y Seguridad Social. (2017). Base de datos de sustancias tóxicas y peligrosas RISCTOX. Cancerígenos y mutágenos. Recuperado el 22 de enero de 2022.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2021). Cáncer. Recuperado el 22 de enero del 2022 de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 12(4): 252-264.
- Pogue, B. W., O'Hara, J. A., Wilmot, C. M., Paulsen, K. D., Swartz, H. M. (2001). Estimation of oxygen distribution in RIF-1 tumors by diffusion model-based interpretation of pimonidazole hypoxia and Eppendorf measurements. *Radiation research*. 155(1): 15-25.
- Reid, B. M., Permuth, J. B., Sellers, T. A. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer biology & medicine*. 14(1): 9.
- Rodríguez, P. A., Ortiz, M. L., Bueno, M. L. (2003). Agentes mitogénicos para cultivos de linfocitos en quelonios. *Orinoquia*. 7(1-2): 47-49.
- Rosenberg, B., Van Camp, L., Krigas, T. (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*. 205(4972): 698-699.
- Schulz, O., Hammerschmidt, S. I., Moschovakis, G. L., Forster, R. (2016). Chemokines and chemokine receptors in lymphoid tissue dynamics. *Annual Review of Immunology*. 34: 203–242.
- SIGMA-ALDRICH. (2012). PKH67 Fluorescent Cell Linker Kits. Recuperado el 3 de enero de 2022 de: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/559/859/midi67bul.pdf>
- Sociedad española de oncología médica (SEOM). (2022). Las cifras del cáncer en España 2022. Recuperado el 8 de febrero de 2022 de: [https://seom.org/images/LAS\\_CIFRAS\\_DEL\\_CANCER\\_EN\\_ESPANA\\_2022.pdf](https://seom.org/images/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESPANA_2022.pdf)
- Somovilla-Crespo, B., Martín Monzón, M. T., Vela, M., Corraliza-Gorjón, I., Santamaria, S., Garcia-Sanz, J. A., Kremer, L. (2018). 92R Monoclonal antibody inhibits human CCR9<sup>+</sup> leukemia cells growth in NSG mice xenografts. *Frontiers in immunology*. 9: 77.
- SunRock Biopharma. (2020). CCR9. Recuperado el 25 de enero de 2022 de: <https://www.sunrockbiopharma.com/es/ccr9/>
- Taylor, S. C. y Posch, A. (2014). The design of a quantitative western blot experiment. *BioMed research international*. 2014: 1-8.
- Tolosa González, J. Á. (2016). Estudio fisicoquímico y biológico de una serie de complejos metálicos con ligandos bioactivos contra *Trypanosoma cruzi* y células neoplásicas.
- Tu, Z., Xiao, R., Xiong, J., Tembo, K. M., Deng, X., Xiong, M., Liu, P., Wang, M., Zhang, Q. (2016). CCR9 in cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Journal of hematology & oncology*. 9(1): 1-9.
- U.S. Food and Drug Administration. (2022). Drugs@FDA. recuperado el día 25 de enero de 2022 de: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>
- Xu, B., Deng, C., Wu, X., Ji, T., Zhao, L., Han, Y., Yang, W., Qi, Y., Wang, Z., Yang, Z., Yang, Y. (2020). CCR9 and CCL25: A review of their roles in tumor promotion. *Journal of cellular physiology*. 235(12): 9121-9132.
- Youn, B. S., Kim, Y. J., Mantel, C., Yu, K. Y., Broxmeyer, H. E. (2001). Blocking of c-FLIP(L)-independent cycloheximide-induced apoptosis or Fas-mediated apoptosis by the CC chemokine receptor 9/TECK interaction. *Blood*. 98: 925–933.

- Zabel, B. A., Agace, W. W., Campbell, J. J., Heath, H. M., Parent, D., Roberts, A. I., Ebert, C. E., Kassam, N., Qin, S., Zovko, M., LaRosa, G. J., Yang, L., Soler, L., Butcher, E. C., Ponath, P. D., Parker, C. M., Andrew, D. P. (1999). Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *The Journal of experimental medicine*. 190(9): 1241-1256.
- Zhang, L., Shin, V. Y., Chai, X., Zhang, A., Chan, T. L., Ma, E. S., Rebbeck, T. R., Chen, J., Kwong, A. (2018). Breast and ovarian cancer penetrance of BRCA1/2 mutations among Hong Kong women. *Oncotarget*. 9: 25025-25033.