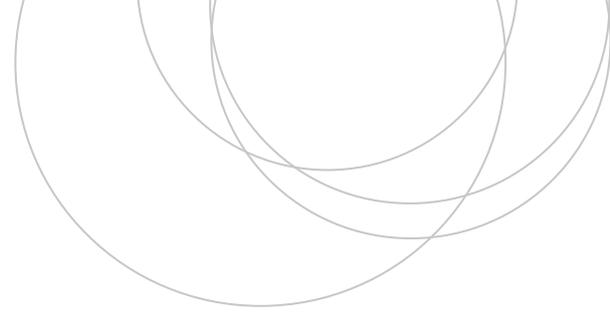




Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

ZIENTZIA  
ETA TEKNOLOGIA  
FAKULTATEA  
FACULTAD  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Trabajo Fin de Grado  
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

# Regulación de la respuesta inmune durante el desarrollo de metástasis hepáticas por las células estrelladas hepáticas

Autora:  
Sandra Cano López  
Directora:  
Beatriz Arteta Ruiz  
Co-Director:  
Aitor Benedicto García

© 2022, Sandra Cano López

Leioa, 24 de junio de 2022

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3.1. Animales de experimentación	3
3.2. Líneas celulares tumorales	4
3.3. Preparación de medios condicionados	4
3.4. Desarrollo experimental de metástasis hepáticas	4
3.5. Aislamiento de LSEC y LIS	5
3.6. Ensayos de viabilidad celular	5
3.7. Análisis inmunohistoquímicos	6
4. RESULTADOS	6
4.1. Estudio del potencial citotóxico de LIS frente a células tumorales	6
4.2. Efecto de la depleción de HSC reactivas	10
5. DISCUSIÓN	12
6. CONCLUSIÓN	13
7. BIBLIOGRAFÍA	14

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer se ha convertido en una de las principales causas de muerte a nivel mundial en las últimas décadas, registrándose 19,3 millones de nuevos casos y 10 millones de defunciones en el año 2020. Se estima que para el año 2040 la incidencia va a verse aumentada en un 49,7% (Ferlay et al., 2020), de modo que es indispensable conocer el funcionamiento de este grupo de enfermedades a nivel celular y molecular con el objetivo de desarrollar nuevas terapias.

La principal causa de morbilidad y mortalidad del cáncer es la metástasis, es decir, la migración de células tumorales desde el tumor primario hacia regiones distales del organismo, donde pasan a denominarse tumores secundarios. Entre los órganos metastatizados, el hígado es uno de los que registra una mayor incidencia de colonización secundaria, siendo estos tumores incluso más comunes que los tumores primarios (Clark et al., 2016; Hess et al., 2006). Se estima que hasta un 50% de pacientes de cáncer va a presentar metástasis hepáticas derivadas de varios tipos de tumores primarios, entre los que destacan el carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de pulmón o melanoma (Tsilimigras et al., 2021). La probabilidad de diseminación de cada tumor así como el desarrollo del mismo depende, en gran medida, del tipo de tumor y del microambiente del órgano o tejido receptor. De hecho, se ha observado que cada tipo de célula tumoral posee uno o varios órganos preferentes, proceso conocido como organotropismo (Mielgo y Schmid, 2020; Tsilimigras et al., 2021). A pesar de que diferentes tipos de cánceres metastaticen en el hígado, las interacciones establecidas y el microambiente tumoral generado pueden discernir dadas las características propias de cada tumor (Hadrup et al., 2013). Es por ello que la realización de estudios comparativos es muy interesante para ayudar en una mejor comprensión del desarrollo metastásico específico de tumor.

La elevada prevalencia de metástasis hepáticas se debe a la compleja estructura del hígado, ya que posee un intrincado sistema de irrigación, una elevada tasa de regeneración celular y una supresión inmune local que permiten la diseminación y establecimiento de poblaciones tumorales (Clark et al., 2016). La unidad funcional del hígado es el lóbulo hepático, que está irrigado por capilares especializados conocidos como sinusoides. El lóbulo está compuesto en un 70% por células parenquimales, comprendidas principalmente por hepatocitos. Por otro lado, aunque las células no parenquimales comprenden únicamente el 30% de las poblaciones hepáticas, desempeñan una gran diversidad de funciones esenciales. Destacan el control de la circulación hepática, la regulación de la composición de la matriz extracelular (MEC) o de las respuestas inflamatorias e inmunológicas. Entre estos tipos celulares se encuentran las células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC, del inglés “liver sinusoidal endothelial cells”) y las células estrelladas hepáticas (HSC, del inglés “hepatic stellate cells”), o células inmunes residentes como las células NK (del inglés “Natural Killer”) o células de Kupffer (CK) (Mielgo y Schmid, 2020).

El hígado es considerado un órgano inmune, que tiene un carácter tolerante en un hígado sano (Yang et al., 2021). No obstante, durante el desarrollo metastásico diferentes poblaciones de células hepáticas desarrollan un microambiente inmunotolerante, desempeñando funciones tanto protumorales como antitumorales en función de las interacciones específicas que se estén produciendo (Brodt et al., 2016). De hecho, los diferentes tipos de células hepáticas tienen la capacidad de ejercer ambas funciones a lo largo del tiempo, influenciando el comportamiento de diferentes células inmunes, tanto directa como indirectamente. Así, esta respuesta inmune local va a ser determinante en la supervivencia de las células tumorales y el establecimiento de tumores secundarios.

La entrada de las células tumorales al hígado ocurre a través de los sinusoides hepáticos, donde las LSECs constituyen la primera barrera que tienen que atravesar. En este proceso suceden una serie de interacciones recíprocas que provocan la liberación de citoquinas y quimioquinas por parte de las LSECs, generando un microambiente proinflamatorio y proangiogénico (Herrero et al., 2021). Estas moléculas promueven la quimiotaxis de diferentes poblaciones de células inmunes, como células NK y células de Kupffer, que van a desempeñar una función tumoricida (Mielgo y Schmid, 2020). En este microambiente metastásico temprano, las LSEC también han demostrado realizar una respuesta protumoral asociada al aumento de células T reguladoras (Treg) FoxP3<sup>+</sup>, que desempeñan una función inmunosupresora sobre las células T efectoras (linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>) tanto *in vitro* como *in vivo* (Yang y Zhang, 2021). Para ello, la activación de las LSECs induce un aumento de la síntesis de factores prometastásicos como IL-1, ICAM-1 (CD54) o ciclooxigenasa-2 (COX-2), además de la expresión del receptor de manosa (RMan). Estas LSEC activadas constituyen un tipo de células presentadoras de antígeno no profesionales moduladoras de la respuesta inmune local hepática mediada principalmente por IL-1 y un aumento en la actividad y expresión del RMan. A través de este receptor los antígenos son procesados y presentados a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, provocando cambios fenotípicos en los mismos que dan lugar a la expresión del factor de transcripción FoxP3, esencial en el control génico de las células Treg (Morikawa et al., 2014; Kaczmarek et al., 2014).

Además de tener una influencia directa sobre diversas células inmunes, al comienzo del desarrollo metastásico las LSECs también aumentan la expresión de moléculas de adhesión, entre las que se encuentran E-selectina (CD62E), VCAM-1 (CD106) o PECAM-1 (CD31). Este aumento de expresión favorece la adhesión y posterior transmigración endotelial de las células tumorales al espacio perisinusoidal, denominado espacio de Disse. El microambiente generado en el espacio de Disse tiene como consecuencia la activación de las HSCs, que van a transdiferenciarse a un tipo miofibroblástico caracterizado por un aumento en la expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA, del inglés “ $\alpha$ -smooth muscle actin”) y un aumento en la

producción de MEC, promoviendo la expansión metastásica (Costa-Silva et al., 2015; Wan et al., 2019). Esta transdiferenciación de HSCs a un fenotipo más contráctil, proliferativo y migratorio es crucial en el desarrollo metastásico debido a su papel angiogénico y fibrótico. Las HSC activadas, además, favorecen la progresión metastásica por otros mecanismos, siendo uno de ellos la regulación del microambiente tumoral mediada por una interacción bidireccional con diversas poblaciones inmunes. En respuesta a señales del microambiente tumoral, las HSC activadas producen mediadores inflamatorios que, a su vez, favorecen el reclutamiento y alteración de las funciones biológicas de diferentes poblaciones inmunes (Xu et al., 2016). Se desconocen las vías exactas por las que llevan a cabo estas funciones, pero se ha sugerido que las HSC activadas tienen un papel más importante en la respuesta inmune local de la que se creía, modulando la función de células T y de células mieloides supresoras (MDSC, del inglés “myeloid-derived suppressor cells”) (Zhao et al., 2014; Weiskirchen y Tacke, 2014).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

En este contexto, se plantea que las HSC activadas por metástasis hepáticas derivadas de carcinoma de colon y de melanoma participan en la modulación de la respuesta inmune local. Por ello, se evalúa si la depleción de las HSC reactivas restaurará esta capacidad antitumoral mediada por diversas poblaciones inmunes, señalando a este tipo celular hepático como una posible diana celular para el tratamiento de metástasis hepáticas.

Por lo tanto, el presente estudio trata de analizar la modulación del sistema inmune local hepático por las HSC reactivas al tumor mediante estudios *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*. Para ello, se desarrollan experimentalmente metástasis hepáticas para alcanzar los siguientes objetivos:

- Cuantificación de la modulación de la capacidad citotóxica de linfocitos intrasinusoidales (LIS) tras la depleción de las HSC reactivas.
- Modulación de la capacidad reguladora de la respuesta inmune por las LSEC tras la depleción de las HSC reactivas.
- Análisis del reclutamiento de diferentes poblaciones inmunes tras la depleción de las HSC reactivas.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Animales de experimentación**

Se utilizaron ratones B6.Cg-Tg(Gfap-Tk)7.1Mvs/J obtenidos de The Jackson Laboratory, que poseen el transgen de la timidina kinasa del virus del herpes simple (HSV-Tk) bajo la regulación del promotor del gen de la proteína ácida fibrilar de la glía (*GFAP*, del inglés “glial fibrillary acidic protein”), expresado en las HSC activadas por el desarrollo metastásico. HSV-Tk es un

enzima que metaboliza el fármaco ganciclovir (GCV) para dar lugar a análogos tóxicos que provocan muerte celular en células activadas y proliferantes. Así, únicamente las HSC proliferativas y activadas por el tumor, que expresan *GFAP*, son susceptibles al tratamiento con ganciclovir (GCV).

El cuidado, manutención y condiciones experimentales de los ratones fueron llevadas a cabo bajo directrices institucionales y la legislación nacional para el cuidado de los animales de experimentación. Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión Ética para la Investigación y Docencia (CEID) de la Universidad del País Vasco.

### **3.2. Líneas celulares tumorales**

Los ensayos fueron realizados con las líneas celulares murinas C26 (ATCC LGC Standards S.L.U.; Barcelona, España) y MCA38 de carcinoma de colon (Kerafast Inc., MA, EE. UU.) y la línea murina B16-F10 de melanoma (ATCC, LGC Standards S.L.U., Barcelona, España), siendo las dos últimas singénicas con la cepa de ratones B6.Cg-Tg(Gfap-Tk)7.1Mvs/J. Las células fueron mantenidas bajo condiciones estándar (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) con medio de cultivo RPMI-1640 (C26 y MCA38) o DMEM (B16-F10) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, del inglés “Fetal Bovine Serum”), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 µg/ml) y anfotericina B (0,25 µg/ml), todo ello adquirido de Gibco™, Thermo Fisher Scientific (MA, EE. UU.), que pasa a denominarse medio completo.

### **3.3. Preparación de medios condicionados**

El medio condicionado (MC) de las células tumorales es el secretoma de dichas células que contiene factores solubles producidos por el tumor. Para su obtención, se cultivaron células tumorales a una concentración de  $1 \times 10^5$  cél/cm<sup>2</sup> en medio suplementado con 1% FBS en placas de cultivo pretratadas con 1 mg/ml de colágeno tipo I (Gibco™, Thermo Fisher Scientific; MA, EE. UU.). Las células fueron incubadas en condiciones estándar durante 24 horas, tras lo que se recogió el MC secretado. Dicho MC fue centrifugado a 2095 xG durante 4 minutos para la eliminación de restos celulares y, finalmente, fue almacenado a -20°C hasta el momento de su utilización.

### **3.4. Desarrollo experimental de metástasis hepáticas**

Para el desarrollo experimental de metástasis hepáticas, las células tumorales se inyectaron en el polo inferior del bazo a una concentración de  $3 \times 10^5$  células/ratón (MCA38) y  $2 \times 10^5$  células/ratón (B16-F10) en 100 µl de medio de cultivo. Tras 14 días, los ratones fueron sacrificados para la recolección de muestras. Los animales fueron divididos en 4 grupos. Grupo I: ratones WT (del inglés “Wild Type”) tratados con vehículo (salino); Grupo II: ratones WT

tratados con dosis intraperitoneales diarias de 100 µg/ratón GCV (MedChemExpress; NJ, EE. UU.); Grupo III: ratones hemicigotos (Hz) tratados con vehículo; y Grupo IV: ratones Hz tratados con GCV.

### **3.5. Aislamiento de LSEC y LIS**

Las LSEC fueron aisladas siguiendo el protocolo descrito por Arteta et al., 2010. Brevemente, 14 días tras la inyección intraesplénica de células tumorales, los hígados se perfundieron y disgregaron con una solución enzimática de colagenasa tipo IV (Sigma-Aldrich; MO, EE. UU.). Tras una centrifugación en un gradiente de Percoll (GE Healthcare; IL, EE. UU.) y la eliminación de las células de Kupffer por adhesión diferencial, las LSECs fueron cultivadas en medio suplementado con 5% FBS en placas de cultivo pretratadas con 1 mg/ml colágeno de tipo I bajo condiciones estándar hasta su utilización.

Los LIS fueron obtenidos siguiendo el protocolo descrito por Arteta et al., 2010. En este procedimiento, de nuevo se extrajeron hígados murinos y se perfundieron por la arteria hepática mediante la introducción de PBS-EDTA 4 mM. Posteriormente, se hizo uso de un tampón de lisis de eritrocitos (802,4 mg/l NaH<sub>4</sub>Cl, 100,1 mg/l KHCO<sub>3</sub>, 37,22 mg/l EDTA) y se realizaron varias centrifugaciones a 453 xG a 4°C para el aislamiento de los LIS. Los linfocitos intrasinusoidales fueron incubados en medio suplementado con 2,5% FBS bajo condiciones estándar y se realizaron los tratamientos pertinentes previos a su adición a cultivos de células tumorales.

### **3.6. Ensayos de viabilidad celular**

Se analizó la viabilidad de las células tumorales C26 o MCA38 mediante el ensayo MTT (Sigma-Aldrich; MO, EE. UU.). MTT es un colorante tetrazoilo que es reducido a un formazán insoluble mediante la acción de oxirreductasas mitocondriales dependientes de NADH o NADPH. Esta transformación se produce junto con un cambio colorimétrico del medio, de modo que mediante este ensayo se mide la actividad mitocondrial por espectrofotometría, parámetro directamente relacionado con la viabilidad celular.

Se cultivaron las células C26 o MCA38 a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml en placas de cultivo pretratadas con 1 mg/ml de colágeno tipo I y se incubaron en condiciones estándar durante 24 horas en RPMI-1640 suplementado con 5% FBS. Las células tumorales fueron cultivadas en presencia de LIS pretratados o no con MC de células tumorales durante 24 horas. En algunos experimentos, los LIS fueron precultivados durante 24 horas con LSEC o fueron incubados en co-cultivo de LSEC y MCA38 (LSEC-MCA38) durante 24 horas. Una vez realizados los tratamientos pertinentes, los LIS fueron recogidos y transferidos a los cultivos de células tumorales en una proporción 1:5, es decir, a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml, y se

incubaron en condiciones estándar durante 48 horas. Se realizó un lavado de los cultivos con RPMI-1640 previo a la adición de 500 µg/ml de MTT. Tras 3-4 horas en condiciones estándar, se añadió DMSO (Sigma-Aldrich; MO, EE. UU.) para la solubilización de los cristales de formazán y se cuantificaron los resultados midiendo la absorbancia a una  $\lambda$  de 570 nm con el lector de microplacas de multidetección Synergy™ HT (BioTek; Madrid, España).

### **3.7. Análisis inmunohistoquímicos**

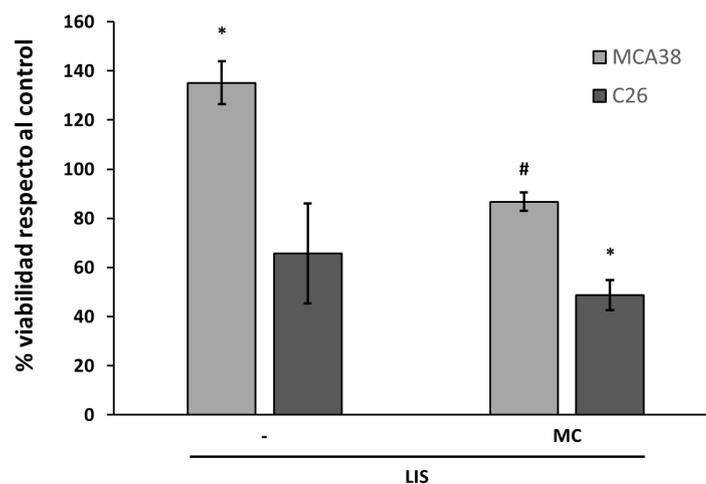
Para los análisis inmunohistoquímicos, se recolectaron hígados 14 días tras la inyección intraesplénica de células tumorales a ratones WT y Hz con o sin tratamiento con GCV. Se realizaron secciones que se incluyeron en OCT (Sakura Finetek; CA, EE. UU.) para su congelación y conservación a -80°C para la cuantificación de diferentes poblaciones celulares hepáticas e inmunes. Se atemperaron las muestras durante 1 minuto, y se procedió a su fijación con acetona 95,5+% (Sigma-Aldrich; MO, EE. UU.) durante 10 minutos a 4°C. Tras la hidratación y bloqueo del tejido con PBS 1X 5% FBS durante 30 minutos a T<sup>a</sup> ambiente, las muestras se incubaron con anticuerpos primarios (1:250) diluidos en PBS 1X 0,05% Tween-20 (Sigma-Aldrich; MO, EE. UU.) durante 18 horas a 4°C. Se emplearon anticuerpos monoclonales anti-CD31 (BD Biosciences; Madrid), anti-CD8 y anti-CD11b (Abcam; Cambridge, UK) o anti-Ly6G (Novus Biologicals; CO, EE. UU.). Pasado este tiempo, se realizaron lavados con PBS 1X 0,05% Tween-20, y se incubaron los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 594 (1:1000) durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente. Para la detección de FoxP3 (Bioss Antibodies; MA, EE. UU.) y CD4 (Thermo Fisher Scientific; CA, EE. UU.), se emplearon anticuerpos conjugados con Alexa Fluor 488, y para la detección de  $\alpha$ -SMA anticuerpos conjugados con Cy3™ (Sigma-Aldrich; MO, EE. UU.). Las muestras fueron montadas con medio de montaje fluoroprotector con DAPI (Abcam; Cambridge, UK) y almacenadas a 4°C en oscuridad hasta su visualización.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Estudio del potencial citotóxico de LIS frente a células tumorales**

Estudios previos han reportado el efecto inmunotolerizante de las células estromales activadas por factores solubles liberados por las células tumorales C26 en el ambiente tumoral sobre el potencial citotóxico de los LIS (Arteta et al., 2010). Por ello, en primer lugar se analizó la influencia del medio condicionado (MC) secretado por células tumorales sin activar sobre la capacidad citotóxica de LIS de ratones WT sin tumor *in vitro*. Para ello, se hizo uso de las líneas celulares de carcinoma de colon C26 y MCA38 para comparar los resultados obtenidos en dos líneas celulares del mismo tipo de cáncer, y se analizó su viabilidad tras 48 horas en presencia de LIS sin tratar o pretratados con medio condicionado de C26 o MCA38 durante 24 horas.

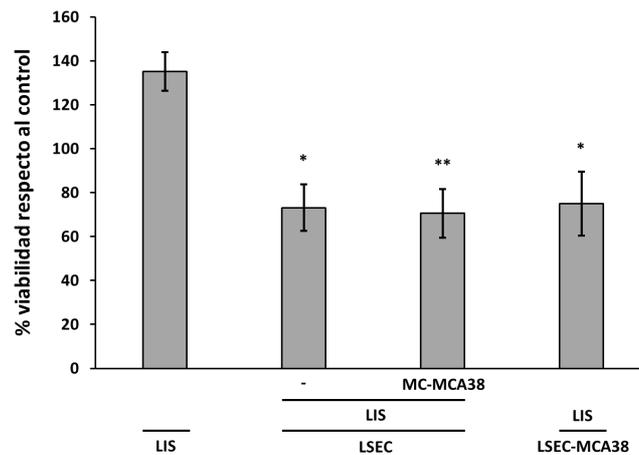
En la línea de células tumorales MCA38, se vió un aumento de la viabilidad de las células tumorales en presencia de LIS sin tratar en comparación con el control, mientras que en C26 se observó una disminución de dicha viabilidad. No obstante, en ambos casos la muerte celular aumentó cuando los LIS habían sido estimulados previamente con MC tumoral (Figura 1).



**Figura 1. Efecto de factores solubles tumorales sobre la citotoxicidad de LIS hacia células de carcinoma de colon MCA38 y C26.** Incubación de células MCA38 o C26 durante 48 horas con LIS sin tratamiento o pretratados con MC-C26 o MC-MCA38 durante 24 horas (LIS procedentes de ratones WT sin tumor). \*  $P < 0,05$  respecto a viabilidad tumoral del control. #  $P < 0,05$  respecto a viabilidad tumoral en presencia de LIS sin pretratar con MC.

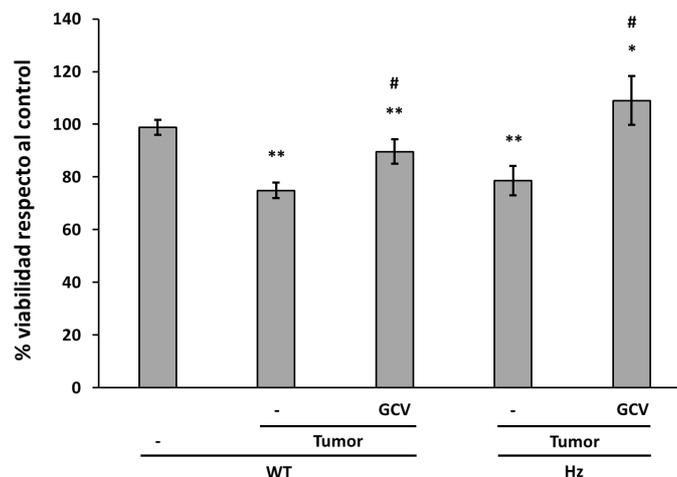
Debido a la abundancia de experimentos ya realizados con la línea celular C26 y al conocimiento actual sobre su mecanismo modulador de la respuesta inmune local, se decidió continuar los posteriores experimentos con la línea celular MCA38, pudiendo así comparar los resultados obtenidos. Además, el modelo murino transgénico empleado es singénico con las células MCA38, de modo que es imperativo utilizar este tipo celular en ensayos *in vivo*.

Seguidamente, se procedió a evaluar el efecto de las LSEC en el potencial citotóxico de los LIS hacia las células tumorales debido a su papel como células presentadoras de antígeno no profesionales (Morikawa et al., 2014). Para ello, se aislaron ambos tipos celulares de ratones WT sin tumor, y se cultivaron según lo especificado en Materiales y Métodos. Independientemente del tratamiento realizado, se registró una disminución en la viabilidad de las células MCA38 que habían sido cultivadas con LIS preincubados con LSEC (aproximadamente del 30% respecto al control). No obstante, no se vieron diferencias significativas en este aumento de citotoxicidad de LIS entre las diferentes condiciones de cultivo. Por otro lado, los LIS que no habían sido preincubados con LSEC mostraron un menor potencial citotóxico hacia las células MCA38 (Figura 2).



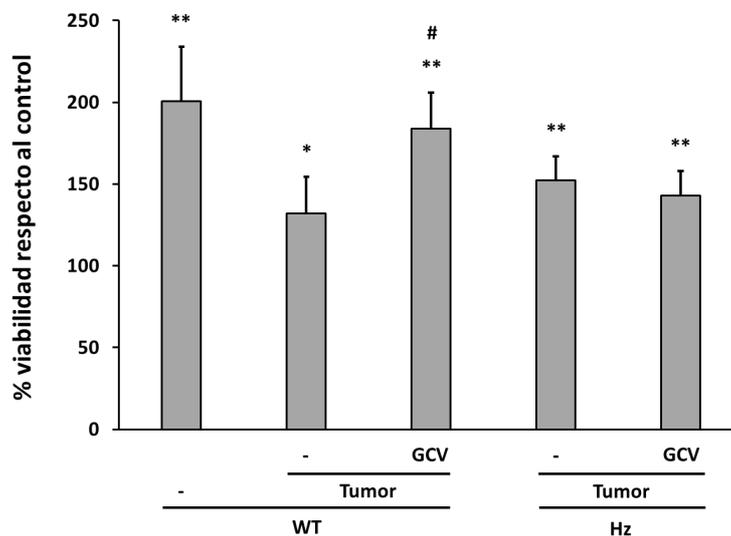
**Figura 2. Efectos de células LSEC activadas por células tumorales sobre la citotoxicidad de LIS hacia células de carcinoma de colon MCA38.** Incubación de células LSEC o co-cultivos de LSEC-MCA38 durante 24 horas con LIS sin tratamiento o pretratados con MC-MCA38 durante 24 horas (LIS y LSEC procedentes de ratones WT sin tumor). Los LIS fueron recolectados y cultivados con células MCA38 durante 48 horas. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,005$  respecto a viabilidad tumoral del control.

Las LSECs interactúan recíprocamente con las HSCs, por lo que podrían estar implicadas en la respuesta inmune local a través de su diálogo con las HSCs. Además, como se ha mencionado anteriormente, las HSC activadas podrían también participar directamente en la respuesta inmune local en el hígado metastásico. Para estudiar esta influencia, se analizó el efecto de su depleción en el potencial citotóxico de los LIS. Para ello, se analizó la viabilidad de células MCA38 tras su cultivo con LIS extraídos de los diferentes grupos de ratones presentados en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos indicaron una disminución significativa de la viabilidad de las células tumorales en presencia de LIS provenientes de ratones WT y Hz con tumor sin GCV, no registrándose diferencias entre la citotoxicidad de ambos tipos de LIS. Sin embargo, se observó que los LIS provenientes de ratones que habían sido tratados con GCV disminuyeron significativamente ( $P < 0,05$ ) su citotoxicidad, especialmente en el caso de los LIS extraídos de ratones Hz (Figura 3).



**Figura 3. Efectos de la depleción de HSC reactivas sobre la citotoxicidad de LIS hacia células de carcinoma de colon MCA38.** Incubación de células MCA38 durante 48 horas con LIS procedentes de ratones WT sin tumor, WT y Hz con tumor sin tratar o tratados con GCV. \* P<0,01 y \*\* P<0,005 respecto a viabilidad tumoral del control. # P<0,05 respecto a viabilidad tumoral en presencia de LIS aislados de ratones con tumor sin tratamiento de GCV.

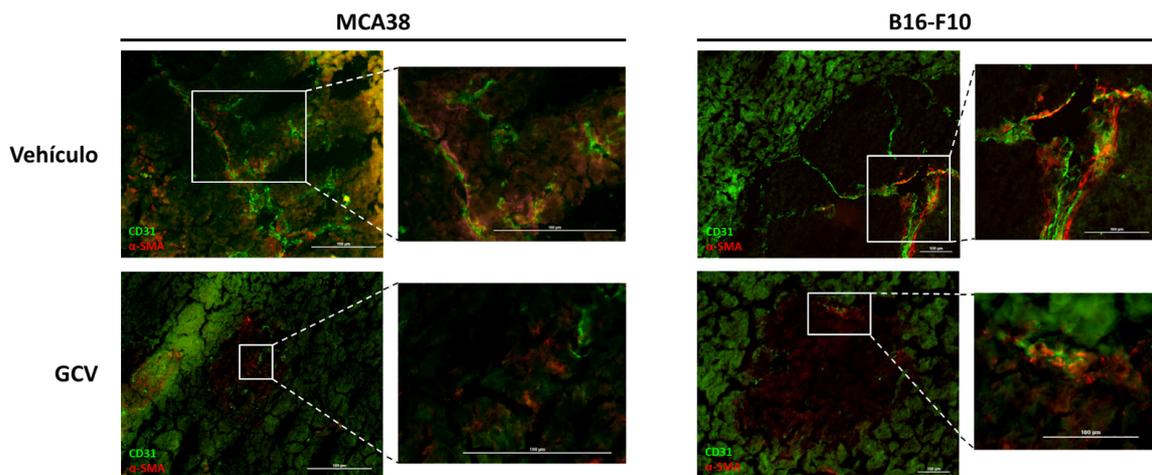
Finalmente, se quiso evaluar *ex vivo* el efecto de las células LSEC activadas por un microambiente metastásico sobre el potencial citotóxico de los LIS hacia el tumor. Para ello, los LIS aislados de ratones WT o Hz con tumor y tratados o no con GCV se estimularon con LSEC aislados de animales sujetos al mismo procedimiento experimental. Como se muestra en la Figura 4, la presencia de tumor hepático activó el potencial estimulador de las células LSEC hacia los LIS, ya que estos mostraron una citotoxicidad mayor en comparación con los LIS extraídos de ratones WT sin tumor. En todos los casos, los LIS preincubados con LSEC demostraron poseer una menor capacidad citotóxica hacia las células tumorales (Figura 4) en comparación con la observada en LIS no preincubados con LSEC (Figura 3). Además, se vió que en ambos experimentos la citotoxicidad de los LIS de ratones WT se redujo significativamente en presencia de GCV. Cuando los LIS fueron extraídos de ratones Hz, independientemente de la presencia o ausencia de las HSC activadas, el potencial citotóxico se vió aumentado en comparación con los LIS de ratones WT sin tumor (Figura 4).



**Figura 4. Efecto de las LSEC reactivas sobre el potencial citotóxico de LIS hacia células de carcinoma de colon MCA38.** Incubación de células LSEC durante 24 horas con LIS, ambos extraídos de ratones WT sin tumor, WT y Hz con tumor sin tratar o tratados con GCV. Los LIS fueron recolectados y cultivados con células MCA38 durante 48 horas. \* P<0,01 y \*\* P<0,005 respecto a viabilidad tumoral del control. # P<0,05 respecto a viabilidad tumoral en presencia de LIS procedentes de ratones con tumor sin tratamiento de GCV.

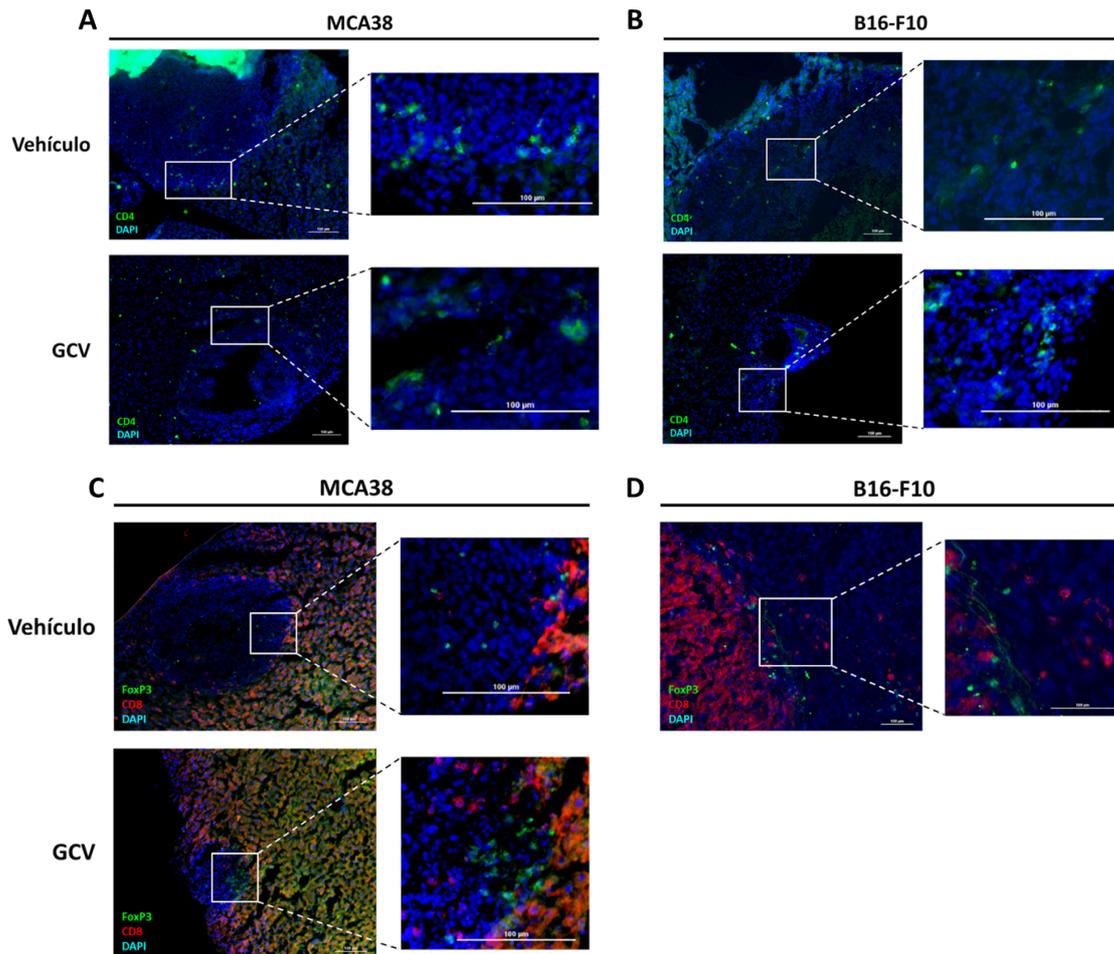
## 4.2. Efecto de la depleción de HSC reactivas

Para observar la influencia directa o indirecta de las HSC activadas sobre el reclutamiento de diferentes poblaciones de células inmunes *in vivo*, se realizaron diversos análisis inmunohistoquímicos. Estudios previos han demostrado el reclutamiento de HSCs y LSECs al interior de focos metastásicos en modelos de metástasis hepáticas, tanto de carcinoma de colon como de melanoma. Por este motivo, se estudió el efecto de la depleción de las HSC reactivas en ambos modelos. En primer lugar, se observó la presencia y localización de células HSC activadas por el tumor, que expresan  $\alpha$ -SMA, y de LSEC activadas por el tumor, que expresan CD31 (Yang y Zhang, 2021). Se produjo una significativa disminución de ambas poblaciones en ambos tipos de tumores cuando se hizo uso de GCV (Figura 5).



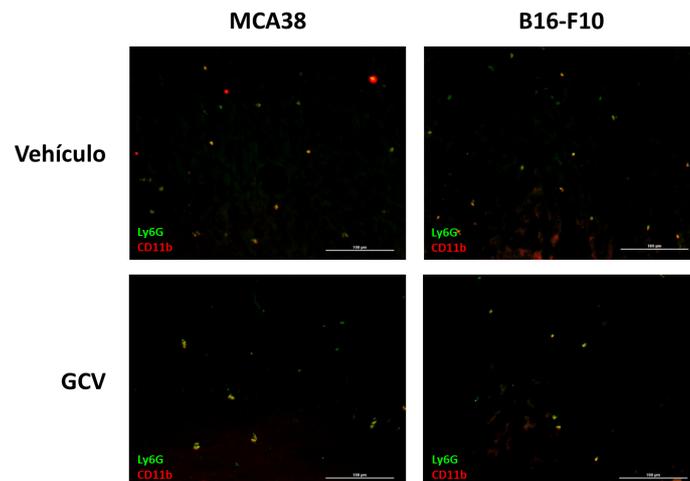
**Figura 5. Influencia de la depleción de HSC reactivas en la distribución de células HSCs y LSECs en focos tumorales de MCA38 y B16-F10.** Se realizaron análisis inmunohistoquímicos para la detección de células  $CD31^+$  y  $\alpha$ -SMA $^+$  en secciones de hígados de ratones Hz sin tratamiento o tratados con GCV.

En cuanto a la distribución de células  $CD4^+$ , tanto en MCA38 como en B16-F10 se observó una menor cantidad de células  $CD4^+$  en el interior de los focos tumorales cuando los ratones habían sido tratados con GCV (Figura 6A, 6B). Además, las células que presentan el marcador FoxP3 mostraron un patrón similar, registrándose una mayor cantidad de células FoxP3 $^+$  en regiones intrasinusoidales tras la depleción de las HSC reactivas. Respecto a las células  $CD8^+$ , no se observó una diferencia significativa en su distribución y cantidad en ausencia o presencia de HSC reactivas para las muestras de MCA38 (Figura 6C). En las muestras con metástasis derivadas de B16-F10, las células  $CD8^+$  muestran la misma tendencia que las muestras de MCA38 en Hz vehículo, pero en las secciones de GCV no se detectaron tumores, de modo que no se representó esta condición (Figura 6D). Por lo tanto, se observó en todos los casos una mayor infiltración celular en ratones no tratados con GCV, mientras que en aquellos con tratamiento los linfocitos  $CD4^+$  y FoxP3 $^+$  se encontraban en zonas intrasinusoidales o periféricas de los focos tumorales.



**Figura 6. Efecto de la depleción de HSC reactivas en la infiltración de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y Foxp3<sup>+</sup> en focos tumorales de (A, C) MCA38 y (B, D) B16-F10.** Se realizaron análisis inmunohistoquímicos para la detección de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> o Foxp3<sup>+</sup> en secciones de hígados de ratones Hz sin tratamiento o tratados con GCV.

Finalmente, se analizó la migración de diversas poblaciones de células MDSCs CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>, observándose una reducción en su reclutamiento hacia los focos tumorales tras la depleción de HSC reactivas tanto en modelos metastásicos de MCA38 como de B16-F10 (Figura 7).



**Figura 7. Influencia de la depleción de HSC reactivas en la migración de células mieloides supresoras (MDSCs) en regiones intratumorales de MCA38 y B16-F10.** Se realizaron análisis inmunohistoquímicos para la detección de células CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> en secciones de hígados de ratones Hz sin tratamiento o tratados con GCV.

## 5. DISCUSIÓN

En la actualidad es ampliamente reconocida la influencia del microambiente tumoral en la progresión metastásica. Estudios previos de este grupo de investigación han mostrado que las HSC reactivas al tumor son reclutadas desde etapas tempranas, y que su depleción provoca una disminución de metástasis hepáticas derivadas de células MCA38 y B16-F10 en modelos murinos (Benedicto et al., 2022). Recientemente se ha sugerido la participación de las HSCs en la respuesta inmune local durante el desarrollo de metástasis hepáticas. Sin embargo, poco se conoce de este aspecto de las HSCs y de los mecanismos por los que podría tener lugar. Por ello, en este trabajo se analizan diferentes poblaciones inmunes profesionales (linfocitos T y MDSCs), o no profesionales (LSECs), que podrían estar afectadas tras la depleción de HSC reactivas.

En ausencia del microambiente tumoral, conformado por las interacciones célula-célula y célula-MEC establecidas entre células tumorales y células hepáticas residentes, como las LSECs o las HSCs, las diferentes células no parenquimales mantienen un fenotipo antitumoral (Apraiz et al., 2020; Clark et al., 2016). En sincronía con estos resultados, se observa que los LIS adquieren un fenotipo más citotóxico cuando interactúan con factores solubles secretados por células MCA38 sin activar. Además, la interacción directa de las LSECs con células MCA38 *in vitro* o incluso con su MC no es suficiente para que ocurra el cambio fenotípico de las LSECs hacia un estado prometastásico. Por lo tanto, se determina que es necesario el establecimiento de un microambiente tumoral para que se ejerza un efecto inmunosupresor sobre los LIS (Arteta et al., 2010). En sistemas *in vivo* en los que se ha desarrollado este ambiente metastásico, se observa que las HSC reactivas no tienen un efecto directo sobre el potencial citotóxico de los LIS. Las HSC activadas interactúan directamente con las LSECs, provocando que refuercen su fenotipo inmunomodulador, adquirido en etapas tempranas de la invasión tumoral del hígado (Arteta et al., 2010; Benedicto et al., 2018). Por lo tanto, la depleción de las HSC reactivas podría modificar dicho fenotipo hacia un estado más antitumoral, además de antiangiogénico, en el que las LSECs establecen un contacto directo con los LIS para que estos recuperen su potencial citotóxico. Dado que los LIS obtenidos en el presente estudio eran linfocitos recolectados de sinusoides hepáticos y no intratumorales, es necesario evaluar si los linfocitos intratumorales estimulados en un ambiente carente de HSC reactivas mantendrían un fenotipo inmunosupresor.

Las diversas poblaciones de LIS presentan una elevada heterogeneidad fenotípica y funcional, tal y como se ve reflejado en los análisis inmunohistoquímicos de las células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y FoxP3<sup>+</sup>.

Estudios previos han observado un aumento en la cantidad de células Treg CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> en tejidos tumorales, que presentan una actividad supresora sobre células efectoras CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> (Tagami et al., 2022). Uno de los parámetros más analizados es el ratio de células FoxP3<sup>+</sup>/células CD8<sup>+</sup>. Nuestros resultados indican que la depleción de HSC reactivas provoca cierta disminución de las células Treg FoxP3<sup>+</sup> en los hígados colonizados por MCA38 y B16-F10, al igual que observaron Zhao et al., 2014; mientras que la proporción de células CD8<sup>+</sup> se mantiene aparentemente estable. Por lo tanto, se observó una disminución del ratio de células FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, lo cual ha mostrado ser un pronóstico positivo para el tratamiento de metástasis en algunos tipos de cáncer (Hadrup et al., 2013; Katz et al., 2013). A pesar de no poder detectar si las células FoxP3<sup>+</sup> observadas se tratan también de células CD4<sup>+</sup>, el hecho de que haya cierta disminución de ambas poblaciones en los focos tumorales sugiere que las células CD4<sup>+</sup> estudiadas se tratan de células Treg y no T efectoras.

Ante estos resultados, se plantea que las HSC reactivas pueden estar implicadas directamente en la inmunosupresión de la respuesta inmune local hepática por una vía más mieloide en la que estén implicadas otras células inmunes como las células de Kupffer o las MDSCs, tal y como se ha observado previamente en modelos de carcinoma hepatocelular (Xu et al., 2016), u otros tipos presentes en mayor proporción en el hígado como son las células NK y las células NKT (Mikulak et al., 2019). Entre estas poblaciones inmunosupresoras, las MDSCs constituyen una población inmune heterogénea, en la que algunas de estas células expresan los marcadores CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>. Las MDSCs, al igual que las células tumorales, en presencia de metástasis hepáticas expresan el receptor CXCR4. Se ha observado que la activación de las LSECs y las HSCs facilita la migración de las células tumorales y de las MDSCs mediada por CXCR4, ya que la inhibición de este receptor con el compuesto AMD3100 ha mostrado disminuir el reclutamiento de dicha población celular (Benedicto et al., 2018). Por lo tanto, aunque se desconoce el mecanismo concreto por el que las HSC activadas inducen la expansión y activación de las MDSCs, la implicación del microambiente tumoral en esta activación es evidente, ya que la depleción de HSC reactivas provoca una disminución de la migración de las MDSCs tanto en MCA38 como en B16-F10. Es interesante mencionar que la expresión de CXCR4<sup>+</sup> en linfocitos FoxP3<sup>+</sup> señala a una población de linfocitos T reguladores con función inmunosupresora en el hígado, al contrario que otras poblaciones FoxP3<sup>-</sup> (Tagami et al., 2022), lo que está en línea con el efecto antitumoral del inhibidor del CXCR4, AMD3100 (Benedicto et al., 2018).

## 6. CONCLUSIÓN

Estos resultados indican la existencia de una población de HSC reactivas potencialmente implicadas en la respuesta inmune local, mediada, principalmente, por la regulación de las

LSECs, que inmunomodulan las células T, y MDSCs. Sin embargo, la gran heterogeneidad fenotípica y funcional tanto de las MDSCs como de los linfocitos FoxP3<sup>+</sup> resalta la necesidad de realizar más estudios que permitan establecer firmemente la participación de otras vías mediadas por diferentes tipos de células inmunes y no inmunes, y que permitan dilucidar los mecanismos celulares y moleculares implicados en la acción protumoral de las HSCs, así como las diferentes subpoblaciones de este tipo celular.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Apraiz, A., Benedicto, A., Marquez, J., Agüera-Lorente, A., Asumendi, A., Olaso, E., & Arteta, B. (2020). Innate Lymphoid Cells in the Malignant Melanoma Microenvironment. *Cancers*, 12(11), E3177. <https://doi.org/10.3390/cancers12113177>
- Arteta, B., Lasuen, N., Lopategi, A., Sveinbjörnsson, B., Smedsrød, B., & Vidal-Vanaclocha, F. (2010). Colon carcinoma cell interaction with liver sinusoidal endothelium inhibits organ-specific antitumor immunity through interleukin-1-induced mannose receptor in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(6), 2172–2182. <https://doi.org/10.1002/hep.23590>
- Benedicto, A., Arteta, B., Friedman, S.L., Boyano, M.D., Olaso, E. (2022). Selective depletion of reactive hepatic stellate cells impairs liver metastasis. 28<sup>TH</sup> congress of the European Association for Cancer Research, EACR. España. <https://www.eacr2022.org/>
- Benedicto, A., Romayor, I., & Arteta, B. (2018). CXCR4 receptor blockage reduces the contribution of tumor and stromal cells to the metastatic growth in the liver. *Oncology reports*, 39(4), 2022–2030. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6254>
- Brod P. (2016). Role of the Microenvironment in Liver Metastasis: From Pre- to Prometastatic Niches. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(24), 5971–5982. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0460>
- Clark, A. M., Ma, B., Taylor, D. L., Griffith, L., & Wells, A. (2016). Liver metastases: Microenvironments and ex-vivo models. *Experimental Biology and Medicine*, 241(15), 1639-1652. <https://doi.org/10.1177/1535370216658144>
- Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M. T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T. M., García-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., ..., Lyden, D. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature cell biology*, 17(6), 816–826. <https://doi.org/10.1038/ncb3169>
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/today>
- Hadrup, S., Donia, M., & Thor Straten, P. (2013). Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenvironment*, 6(2), 123-133. <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0127-6>
- Herrero, A., Benedicto, A., Romayor, I., Olaso, E., & Arteta, B. (2021). Inhibition of COX-2 Impairs Colon Cancer Liver Metastasis through Reduced Stromal Cell Reaction. *Biomolecules & Therapeutics*, 29(3), 342-351. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2020.160>
- Hess, K. R., Varadhachary, G. R., Taylor, S. H., Wei, W., Raber, M. N., Lenzi, R., & Abbruzzese, J. L. (2006). Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer*, 106(7), 1624-1633. <https://doi.org/10.1002/cncr.21778>

- Kaczmarek, J., Homsí, Y., van Üüm, J., Metzger, C., Knolle, P. A., Kolanus, W., Lang, T., & Diehl, L. (2014). Liver Sinusoidal Endothelial Cell-Mediated CD8 T Cell Priming Depends on Co-Inhibitory Signal Integration over Time. *PLoS one*, 9(6), e99574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099574>
- Katz, S. C., Bamboat, Z. M., Maker, A. V., Shia, J., Pillarisetty, V. G., Yopp, A. C., Hedvat, C. V., Gonen, M., Jarnagin, W. R., Fong, Y., D'Angelica, M. I., & DeMatteo, R. P. (2013). Regulatory T cell infiltration predicts outcome following resection of colorectal cancer liver metastases. *Annals of surgical oncology*, 20(3), 946–955.
- Mielgo, A., & Schmid, M. C. (2020). Liver Tropism in Cancer: The Hepatic Metastatic Niche. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(3), a037259. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037259>
- Mikulak, J., Bruni, E., Oriolo, F., Di Vito, C., & Mavilio, D. (2019). Hepatic Natural Killer Cells: Organ-Specific Sentinels of Liver Immune Homeostasis and Physiopathology. *Frontiers in immunology*, 10, 946. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00946>
- Morikawa, H., Ohkura, N., Vandenbon, A., Itoh, M., Nagao-Sato, S., Kawaji, H., Lassmann, T., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Forrest, A. R., Standley, D. M., Date, H., Sakaguchi, S., & FANTOM Consortium (2014). Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 111(14), 5289–5294. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312717110>
- Tagami, M., Kakehashi, A., Katsuyama-Yoshikawa, A., Misawa, N., Sakai, A., Wanibuchi, H., Azumi, A., & Honda, S. (2022). FOXP3 and CXCR4-positive regulatory T cells in the tumor stroma as indicators of tumor immunity in the conjunctival squamous cell carcinoma microenvironment. *PloS one*, 17(3), e0263895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263895>
- Tsilimigras, D. I., Brodt, P., Clavien, P.-A., Muschel, R. J., D'Angelica, M. I., Endo, I., Parks, R. W., Doyle, M., de Santibañes, E., & Pawlik, T. M. (2021). Liver metastases. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00261-6>
- Yang, F., Li, H., Li, Y., Hao, Y., Wang, C., Jia, P., Chen, X., Ma, S., & Xiao, Z. (2021). Crosstalk between hepatic stellate cells and surrounding cells in hepatic fibrosis. *International Immunopharmacology*, 99, 108051. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108051>
- Yang, M., & Zhang, C. (2021). The role of liver sinusoidal endothelial cells in cancer liver metastasis. *American journal of cancer research*, 11(5), 1845–1860.
- Wan, L., Xia, T., Du, Y., Liu, J., Xie, Y., Zhang, Y., Guan, F., Wu, J., Wang, X., & Shi, C. (2019). Exosomes from activated hepatic stellate cells contain GLUT1 and PKM2: a role for exosomes in metabolic switch of liver nonparenchymal cells. *FASEB journal*, 33(7), 8530–8542. <https://doi.org/10.1096/fj.201802675R>
- Weiskirchen, R., & Tacke, F. (2014). Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *HepatoBiliary Surgery and Nutrition*, 3(6), 344–363. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.03>
- Xu, Y., Zhao, W., Xu, J., Li, J., Hong, Z., Yin, Z., & Wang, X. (2016). Activated hepatic stellate cells promote liver cancer by induction of myeloid-derived suppressor cells through cyclooxygenase-2. *Oncotarget*, 7(8), 8866–8878. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6839>
- Zhao, W., Zhang, L., Xu, Y., Zhang, Z., Ren, G., Tang, K., Kuang, P., Yin, Z., & Wang, X. (2014). Hepatic stellate cells promote tumor progression by enhancement of immunosuppressive cells in an orthotopic liver tumor mouse model. *Laboratory investigation*, 94(2), 182–191. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.139>