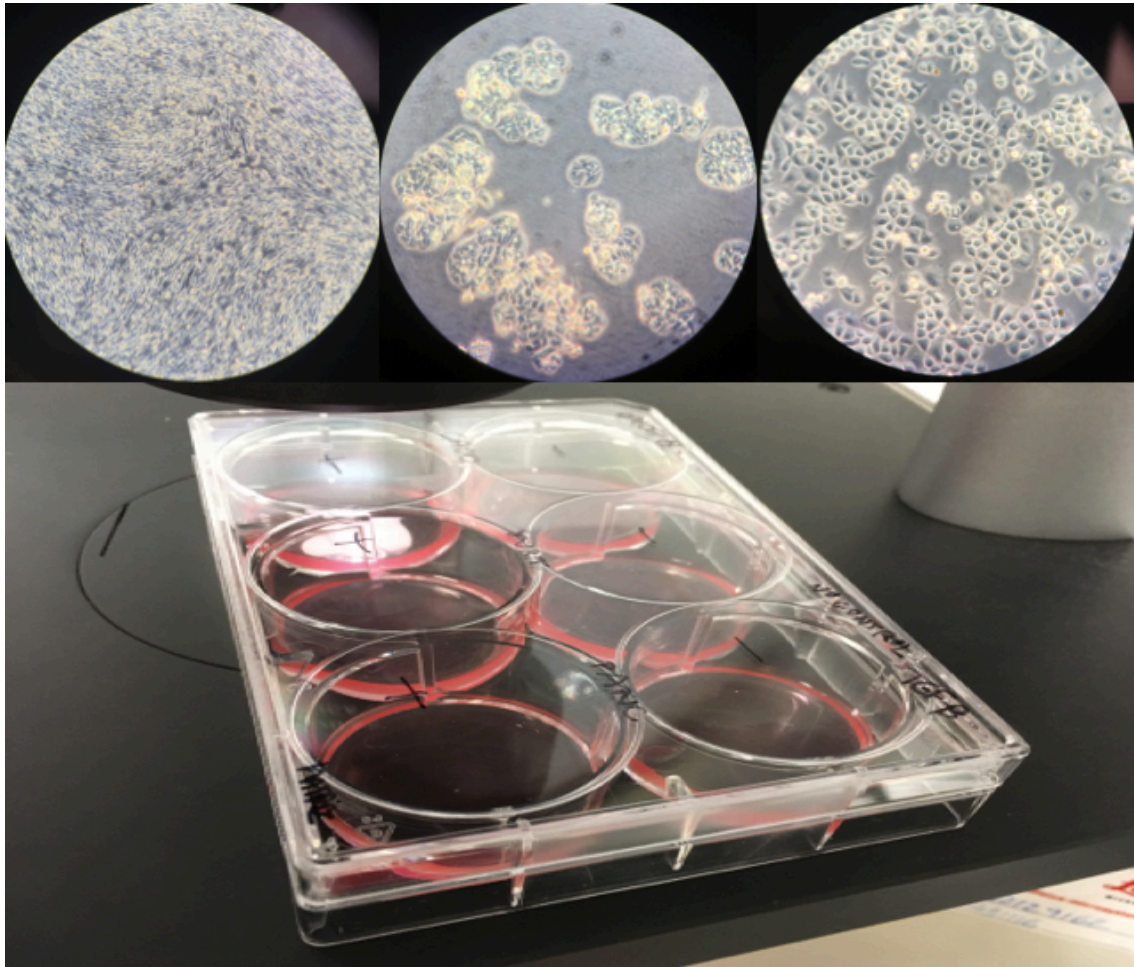


Estudio de poblaciones inmunes, inmunocheckpoints y mediadores solubles como marcadores pronóstico en tumores digestivos



Trabajo de Fin de Grado

EMIGDIO AIRÁN ÁLVAREZ CORRALES

Tutorizado por Ricardo Reyes Rodríguez, Alfredo Prieto Martín y Natalia
Guerra Pérez

Grado en Biología. Septiembre 2018

Índice

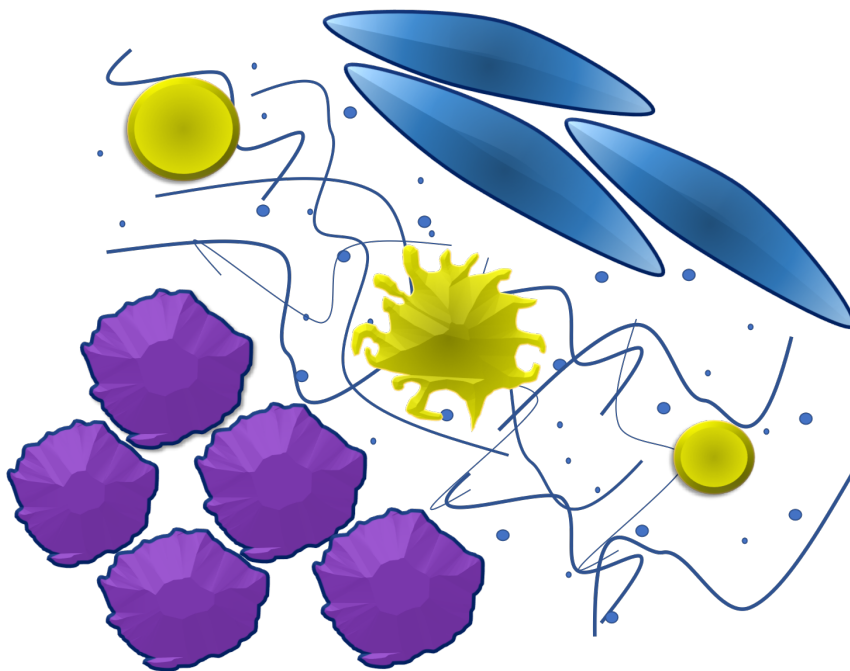
Resumen	1
Introducción	2
1. adenocarcinoma	2
1.1.adenocarcinoma colorrectal	2
1.2.adenocarcinoma ductal pancreático	2
2. El tejido mucoso e implicación del ácido retinoico	3
3. Microambiente tumoral en la mucosa	4
4. El sistema inmune frente al cáncer	4
4.1.Células inmunes en las mucosas intestinales e inmunocheckpoints	4
Hipótesis y objetivos	7
Material y métodos	8
I. Modelo <i>in vivo</i> de caracterización inmune en pacientes	8
1. Procesamiento de muestras	8
II. Modelo <i>in vitro</i> de caracterización de microambiente tumoral	8
1. Cultivos celulares. Preparación de medios de cultivo y mantenimiento	8
1.1.Valoración de la acción del ácido retinoico en línea celular	8
1.2.Formación de matrices tridimensionales derivadas de fibroblastos	9
1.3.Formación de matrices tridimensionales derivadas de fibroblastos	9
1.4.Valoración de la acción del ácido retinoico o PDGF sobre fibroblastos formadores de matriz extracelular y posterior crecimiento de líneas tumorales	10
III. Determinaciones celulares y moleculares	10
1. Extracción de proteínas y lisados celulares.	10
2. Técnicas de separación y análisis de proteínas	11
3. Citometría de flujo	12
4. Inmunoensayo ELISA	13
5. Análisis estadístico	13
Resultados y discusión	14
1. Caracterización sistema inmune en pacientes con tumores gastrointestinales	14
2. Caracterización del microambiente tumoral en un modelo de mucosa	17
Conclusiones	28
Bibliografía	29

Resumen

Tanto el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) como el adenocarcinoma colorrectal (CRC) presentan una alta letalidad en estadios avanzados de diagnóstico, siendo el PDAC la tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial y el CRC la segunda causa de mortalidad en España. Un elemento esencial de estudio actualmente en la promoción o prevención del cáncer, es el microambiente tumoral, en el cual coexisten factores solubles como citoquinas y factores de crecimiento, elementos constitutivos de la matriz extracelular, fibroblastos y células inmunes. El ácido retinoico junto con otras moléculas tales como el factor de crecimiento transformante beta, son resultantes de la actividad de diversos tipos celulares, y pueden modular la respuesta de células del sistema inmunológico como son las células dendríticas y linfocitos T, elementos clave de la respuesta antitumoral. Los estudios llevados a cabo, en este proyecto, pretenden ayudar en la identificación de parámetros clínicos inmunes útiles para el pronóstico y el estudio de la evolución y la respuesta al tratamiento de pacientes con tumores digestivos, a través de la caracterización de poblaciones celulares de sangre periférica. Asimismo, mediante el estudio de marcadores de migración, activación y tolerancia inmune en diversas líneas celulares cultivadas en matrices generadas por fibroblastos activados, se pretende establecer y analizar en un modelo *in vitro*, el microambiente tumoral y la modulación de la tolerancia inmune, que pueda servir como base para el desarrollo de nuevas dianas en inmunoterapia celular.

Both pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and colorectal cancer (CRC) are highly lethal in advance stages of diagnosis, with PDAC representing the third cause of death by cancer worldwide, whereas CRC constitutes the second cause of mortality in Spain. Currently, a key element in the study of cancer promotion or prevention is the tumor microenvironment, inhabited by soluble factors such as cytokines and growth factors, elements that make up the extracellular matrix, fibroblasts and immune cells. Retinoic acid, along with other molecules such as transformant growth factor beta, result from the activity of several cellular types, and can modulate the responses of cells from the immune system, like dendritic cells and T lymphocytes, both of them key elements in the anti-tumor response. The studies carried out in this work aim to shed some light in the identification of immune clinical parameters useful for the prognosis and assessment of evolution and response to treatment in patients with digestive tumors, through the characterization of cell populations from peripheral blood. In addition, migration, activation and immune tolerance markers will be studied in several cell lines cultures in matrices generated by activated fibroblasts, in order to analyze both the tumor microenvironment and the modulation of immune tolerance in an *in vitro* model, that may lay the foundations for the study of new targets in cellular immunotherapy.

INTRODUCCIÓN



1. Adenocarcinoma

Los adenocarcinomas constituyen una clase de tumor maligno originado en epitelios glandulares que pueden desarrollarse en la mucosa gástrica, del colon o de los bronquios, o en glándulas como el páncreas y la mama. Entre los tumores epiteliales digestivos se encuentran el adenocarcinoma colorrectal y el adenocarcinoma ductal pancreático.

1.1. Adenocarcinoma colorrectal

El cáncer colorrectal (CRC, *colorectal cancer*) constituye uno de los tipos de neoplasia más común a nivel mundial, ocupando el segundo puesto dentro de los cánceres más habituales en Europa. En 2012 fue la segunda causa de mortalidad en España, diagnosticándose 19.261 casos en hombres y 12.979 casos en mujeres (Safont y Gil, 2017). Originalmente se trata del tumor intestinal maligno más frecuente en el intestino (Akkoca *et al.*, 2014).

Los adenocarcinomas se presentan en este tipo de cáncer (más del 95% de los CRC), cuando la mucosa de colon contenida en un pólipo adenomatoso displásico evoluciona por diferentes causas hasta convertirse en un tumor maligno (Ballinger y Anggiansah, 2007). El riesgo de padecerlo es mayor en hombres que en mujeres, incrementándose a partir de los 40 años hasta un 99% (Ballinger y Anggiansah, 2007; Akkoca *et al.*, 2014). Por lo tanto, el incremento del CRC en los países desarrollados viene dado mayormente por el envejecimiento de la población seguido por los antecedentes familiares. La sintomatología más habitual del CRC es dolor abdominal, cambio en el curso intestinal, sangrado rectal y anemia (Ballinger y Anggiansah, 2007).

Los pacientes con carcinoma en un estadio inicial tienen un 90% de supervivencia a los 5 años, pero esta se reduce a solo un 5% para el caso de los pacientes en estadio final, por lo tanto, la supervivencia se encuentra íntimamente ligada al momento del diagnóstico (Ballinger y Anggiansah, 2007; Akkoca *et al.*, 2014).

1.2. Adenocarcinoma ductal pancreático

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, *pancreatic ductal adenocarcinoma*) constituye un tipo de tumor agresivo en el páncreas exocrino. Se describe como una neoplasia ductal de origen epitelial/glandular, siendo la forma más común de cáncer de páncreas, y en la mayoría de los casos letal (Carrato *et al.*, 2017; Hidalgo *et al.*, 2017). Se establece como la tercera causa de muerte por cáncer, con 70.000 casos en Europa durante 2008. Asimismo, en la última década la tasa de este tipo de adenocarcinoma ha incrementado su aparición en un 0,8% cada año (Carrato *et al.*, 2017), diagnosticándose en España un promedio de 6,3 hombres y 4,9 mujeres de cada 100.000 habitantes (Mocci *et al.*, 2015).

En cuanto a la dinámica del PDAC, es un cáncer que se disemina precozmente y se

desarrolla además en localizaciones muy distantes a su foco de origen, lo que hace de este cáncer una prioridad en investigación para una mejor prevención, y respuesta al tratamiento (Hidalgo *et al.*, 2017; Mocci *et al.*, 2015). El PDAC generalmente carece de síntomas específicos en estadios tempranos pero la sintomatología más habitual incluye fatiga, pérdida de peso, dolor abdominal y orina oscura (Hidalgo *et al.*, 2017) lo que conduce a que aproximadamente el 80% de los casos tengan un diagnóstico tardío (estadios III y IV); a excepción de la ictericia, signo más evidente y característico de la afectación. Esta situación se ve agravada por la especial agresividad biológica de la patología (Grover y Syngal, 2010; Carrato *et al.*, 2017).

La mayoría de los pacientes tiene una esperanza de vida reducida a pocos meses, de hecho los supervivientes a los 5 años se sitúan en torno al 6% - 7,2% mientras que a los 10 años es incluso aún más reducida, llegando a valores inferiores al 4% de supervivencia (Carrato *et al.*, 2017; Grover y Syngal, 2010; Hidalgo *et al.*, 2017).

2. El tejido mucoso e implicación del ácido retinoico

El tejido mucoso subyacente a las superficies corporales cuenta con una densa población de células inmunes, sobre todo en el tracto gastrointestinal, por ser el lugar con mayor interacción inmune con el exterior que constituye, junto con moléculas inmunes, los GALTs (*gut associated lymphoid tissues*) (MacDonald *et al.*, 2011). Debe existir un equilibrio entre la respuesta rápida frente a agentes extraños, regulación, y tolerancia o ausencia de respuesta frente a antígenos inofensivos o microbios comensales provenientes de la dieta, equilibrio en el cual juega un papel central el ácido retinoico (AR) (Hosomi y Kunisawa, 2017). Esta y otras moléculas como la citoquina TGF β (factor de crecimiento transformante beta), distribuido en muchos tejidos, resultantes de la actividad de diversos tipos de células, como fibroblastos y células endoteliales, pueden llevar a cabo una acción paracrina sobre células próximas y modular la respuesta de linfocitos T y NK. Además de dicha función, el AR también participa en la formación de revestimientos epiteliales externos (piel) e internos (mucosas), en la formación ósea, la reproducción y la organogénesis durante el desarrollo embrionario (Cassani *et al.*, 2012).

El AR es un elemento partícipe de la inmunidad intestinal (Bakdash *et al.*, 2014), que proviene de la vitamina A (retinol) y es sintetizado a través de la enzima aldehído deshidrogenasa retiniana (RADH). Esta enzima se encuentra en enterocitos, fibroblastos, hepatocitos, etc., y en el citoplasma de las células dendríticas que se distribuyen por todo el organismo (Scott *et al.*, 2011).

El AR es liberado en condiciones normales por la mucosa digestiva a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, y por el páncreas. En ésta glándula es característica la presencia en el estroma de un tipo de célula, la célula pancreática estrellada (PaSC), de función desconocida y que presenta en su citoplasma, en condiciones normales, inclusiones lipídicas ricas en vitamina A. Se ha observado que diferentes estímulos inflamatorios tanto agudos como crónicos activan las PaSC, produciendo entre otros efectos, una pérdida de las inclusiones lipídicas, asociado este efecto, a la producción y liberación de AR.

3. Microambiente tumoral en la mucosa

Un tema de interés actualmente es el conocimiento del microambiente tumoral en la mucosa, donde coexisten factores solubles (como citoquinas y factores de crecimiento), elementos que conforman la matriz extracelular, y células que participan en la defensa inmunitaria y que puede promover o prevenir el cáncer. Varios estudios han demostrado que la inflamación crónica y los estímulos derivados de esta situación en el microambiente, predispone a los individuos a varios tipos de cáncer (Rajput y Wilber, 2010). De la misma forma además, la interacción del estroma con las células cancerosas adyacentes puede modificar la topografía y composición molecular de la matriz extracelular, generándose una retroalimentación positiva, que produce importantes cambios bioquímicos en las células cancerosas generados por el estroma alterado (Castelló-Cros y Cukierman, 2009).

4. El sistema inmune frente al cáncer

El sistema inmune (SI), es el sistema encargado de la defensa del organismo. De esta forma y en relación con un proceso tumoral, atacaría repetidamente a las células del tejido defectuosas, y este proceso de daño y remodelación podría llevar a errores durante la reparación que acabaría desembocando en una carcinogénesis. Sin embargo, recientes estudios de ciertos tumores digestivos asocian una disminución en la incidencia en pacientes con CRC y un reducido riesgo de presentar PDAC en individuos que presentan inflamación producida por asma y/o alergias nasales (Tambe *et al.*, 2015; Gomez-Rubio *et al.*, 2017). Estos resultados proporcionan pruebas iniciales de la posible función protectora del SI en procesos inflamatorios y apuntan a la implicación de factores inmunes y/o reguladores ambientales que pueden modular la carcinogénesis y el desarrollo tumoral, lo que justificaría una mayor investigación para comprender los mecanismos moleculares que impulsan esta asociación.

4.1. Células inmunes en las mucosas intestinales e inmunocheckpoints

Las células dendríticas (DC “*dendritic cells*”) presentes las mucosas, cuya función y fenotipo se encuentra en gran medida determinado por el ambiente, juegan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y en el inicio de una adecuada respuesta inmune

(Scott *et al.*, 2011; Y. *et al.*, 2017). Las células epiteliales intestinales y estromales de la lámina propia generan AR que actúa sobre las DC, de origen mielóide, promoviendo DC CD103+ mieloides específicas de la mucosa (Feng *et al.*, 2010). Las DC mieloides o mDCs constituyen, junto con las plasmacitoides o pDCs, los dos subtipos principales de DC en humanos. Las segundas se encargan principalmente de secretar abundantes cantidades de interferón (IFN) participando en la respuesta innata frente a patógenos, mientras que la función de las primeras está más dirigida a la presentación de antígenos a linfocitos T (L-T, CD3+) como parte de la respuesta inmune adaptativa. Las mDCs CD11c+ son centinelas residentes en las superficies de las mucosas que patrullan en busca de agentes extraños. Las CD11c+CD103+, por su parte, presentan una actividad de la que carecen otras DCs, siendo capaces de metabolizar la vitamina A en ácido retinoico y liberarlo al medio externo (Iwata *et al.*, 2004). Las DC CD103+ humanas de mucosa en su conjunto son consideradas DC tolerogénicas o inductoras de tolerancia (DCTol), dado que modulan la expresión de marcadores y por tanto la funcionalidad celular en los linfocitos B(L-B, CD19+) y en los L-T, generando linfocitos T reguladores (Treg). Esta descrito también, que la aparición de Treg promovida por DCTols necesita además de TGFβ en el medio extracelular.

Las DC CD103+ además, inducen la expresión de receptores *homing* intestinales (indicadores de extravasación al intestino), como son CCR9 y la integrina $\alpha 4\beta 7$ en L-T, mediante la activación de señales generadas a raíz del AR liberado (Bakdash *et al.*, 2014) y producido por DC de lugares adyacentes y cercanos a L-T, como son el GALT y los órganos linfoides secundarios. Esta descrito también, que la regulación es cooperativa en receptores *homing*, necesitando a su vez altos niveles de $\alpha 4\beta 7$ para incrementar CCR9 (Jaensson *et al.*, 2008; Amiran *et al.*, 2017). Estudios recientes de migración en L-T indican que las DC CD11c+ dirigen a los L-T citotóxicos (CD8+) a la mucosa del colon, consiguiéndolo a través de la capacidad variable de las DCs para inducir la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en L-T, correlacionándose a su vez con la expresión de diferentes niveles de RADH (Wang *et al.*, 2010; Amiran *et al.*, 2017). Para el movimiento de los L-T hacia el interior de las mucosas o focos inflamatorios, además de requerir la expresión de $\alpha 4\beta 7$ en L-T, se necesita su adhesión de unión MAdCAM-1, en el epitelio adyacente (Guerra-Pérez *et al.*, 2015).

Dentro de las células presentadoras de antígeno (APC), las DCs son las únicas capaces de estimular a los L-T colaboradores (L-Th) naïve CD4+CD25-Foxp3-, tras su migración a los nódulos linfáticos de forma dependiente del receptor de quimiocinas CCR7 (Förster *et al.*, 2008), y conducirlos a un fenotipo Th1 (T-bet+), Th2 (GATA3+), regulador antiinflamatorio

Introducción

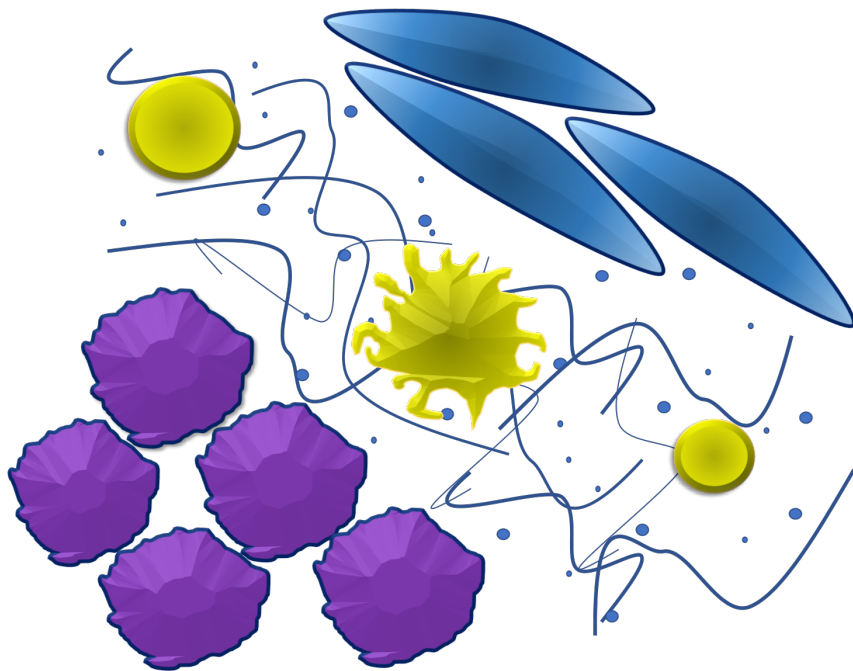
Treg (CD25^hFoxp3⁺) (Mucida *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2010) o proinflamatorio Th17 (ROR γ t⁺) (Guntermann *et al.*, 2017).

Recientes estudios describen que el equilibrio homeostático de la mucosa promueve la tolerancia del huésped a antígenos potencialmente patógenos. Esto está mediado por la inducción de linfocitos iTreg (CD25^hROR γ t⁺Foxp3⁺) que restringen selectivamente a los Th17, lo que indicaría que se requieren iTreg ROR γ t⁺ para mantener la homeostasis intestinal (Xu *et al.*, 2018) y que el microambiente intestinal es capaz de modular este equilibrio. Las Tregs son esenciales para la supresión de las células T autorreactivas en la periferia y en la inhibición de las respuestas inmunes como resultado de una infección. Esta inhibición de la activación y proliferación de los L-T efectores se realiza mediante el secuestro de IL-2 (por ser las Treg CD25^{high}), además secretan citocinas supresoras como IL-10 o TGF- β entre otras, y expresan marcadores inhibidores como la proteína asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y el marcador coestimulador de células T inducible (ICOS), inhibiendo la capacidad de las APC para activar a los L-T y causar la apoptosis de células efectoras mediante la producción de granzima (Vignali *et al.* 2008).

La frecuencia de Tregs circulantes o infiltrantes tumorales se ha asociado con una baja supervivencia del paciente en muchos tipos de cáncer. Recientemente se evidenció que las poblaciones reguladoras son muy heterogéneas, esto es esencial para la función Treg (Feng *et al.*, 2010) y puede afectar a las predicciones de la evolución del paciente. Diversas poblaciones de Treg pueden tener diferentes influencias en los tumores.

Los L-T en un ambiente tumoral y descrito también en infecciones crónicas adquieren un fenotipo agotado o “*exhausted*” (Masugi *et al.*, 2017) promovido por mecanismos tolerogénicos intrínsecos que por ahora se desconocen, y que vendría dado para prevenir el daño tisular. Este fenotipo está caracterizado por la pérdida de moléculas efectoras (IFN- γ , TNF o factor de necrosis tumoral, perforinas) y por la regulación positiva de moléculas inhibitoras como son CTLA4 y el receptor de muerte programada (PD-1) entre otros (Crespo *et al.*, 2013).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El ambiente que rodea el tumor puede influenciar en múltiples aspectos el proceso tumoral, desde la proliferación, supervivencia, y resistencia a la terapia, hasta el escape de las células tumorales del control inmunológico. Uno de los principales elementos en mucosas, en el equilibrio entre inmunidad y tolerancia es el ácido retinoico (AR).

Las células de CRC y PDAC expresan citoquinas anti-inflamatorias que podrían favorecer, junto al AR liberado por células intestinales y PaSC, a un fenotipo DCTol que promueva el escape tumoral al SI mediante promoción de Tregs. Además, la liberación de factores y la expresión de nuevas proteínas en las células tumorales bajo la influencia ambiental de factores solubles y de componentes de la matriz extracelular, podría alterar la expresión de marcadores de membrana de los puntos de control inmunológico o inmunocheckpoint, que modulen la respuesta inmune, así como integrinas de migración que favorezcan además el proceso tumoral y la metástasis.

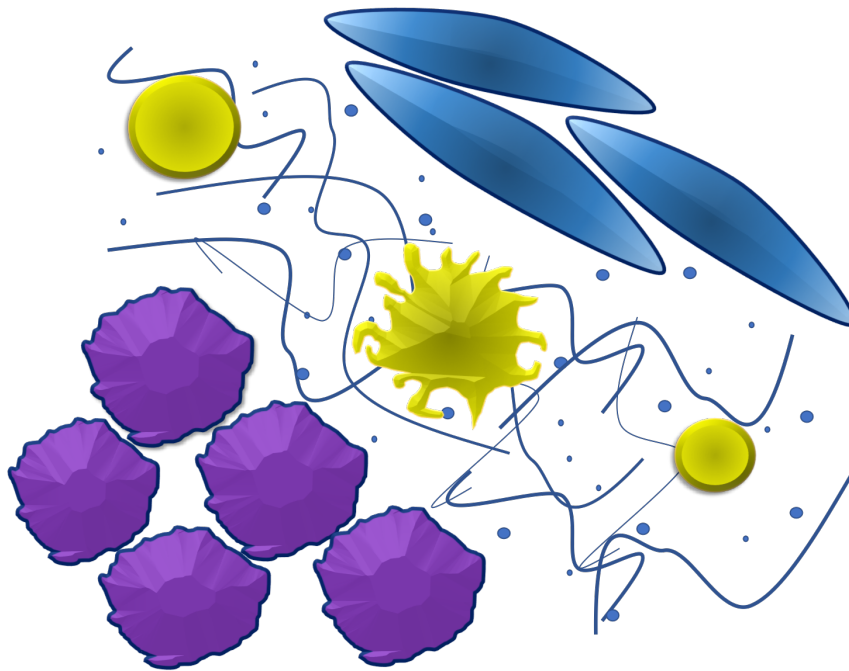
Como objetivos generales se proponen ***caracterizar una combinación de marcadores en pacientes con tumores digestivos***, que incluye poblaciones celulares inmunes DC circulantes, con objeto de identificar parámetros clínicos inmunes de pronóstico, evolución, y respuesta al tratamiento de pacientes. De forma paralela, se propone estudiar mecanismos de ***modulación de tolerancia en el microambiente tumoral de la mucosa del tracto gastrointestinal, como base para el desarrollo de nuevas dianas para inmunoterapia celular***. Para alcanzar estos objetivos se abordarán los siguientes objetivos parciales (específicos):

1. Caracterización de poblaciones celulares (fenotipaje) en sangre periférica, con atención a la expresión de marcadores de migración (integrinas, receptores de quimiocinas), puntos de control inmunológico y tolerancia en DCs circulantes.

2. Caracterización y cuantificación de factores reguladores solubles del sistema inmune en sangre periférica.

3. Construcción, mediante cultivos celulares y matrices celulares en un contexto inmunomodulador, de un modelo in vitro de microambiente tumoral mediante adición de AR. Los elementos del modelo serán, fibroblastos, matrices generadas por fibroblastos activados con AR± y PDGF-BB±, líneas celulares tumorales, y líneas celulares de L-T y células mieloides. Se estudiarán marcadores implicados en migración celular, activación y tolerancia inmune.

MATERIAL Y MÉTODOS



I. Modelo *in vivo* de caracterización inmune en pacientes

1. Procesamiento de muestras

Para el procesado de sangre periférica (SP) de cada paciente o individuo control, se recogen de 3 a 5 ml de sangre total en tubos con EDTA -que evita la formación del coágulo sanguíneo-. Después, se extraen unos 800 µl para las determinaciones por citometría de flujo. El resto del tubo es centrifugado 5 min, 1500 rpm a T^a ambiente, para la obtención de la fracción soluble “plasma” que no contiene células. El plasma es nuevamente centrifugado a 2000 rpm, 10 min para eliminar completamente la fracción celular, y almacenado a -80°C para posteriores determinaciones.

II. Modelo *in vitro* de caracterización de microambiente tumoral

1. Cultivos celulares. Preparación de medios de cultivo y mantenimiento

Se usan medios incompletos, RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) o DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), según el tipo celular a cultivar (Tabla 1).

Línea	Origen	Tipo	Condiciones de cultivo
PANC-1	Células tumorales epiteliales de páncreas humano	Adherente	-Medio de cultivo: DMEM
Jurkat	Linfocitos T de sangre periférica de humano con leucemia aguda	Suspensión	-Medio de cultivo: RPMI -Tiempo de duplicación: aprox. 48 h.
HL-60	Línea mieloide de sangre periférica de humano con leucemia promielocítica	Suspensión	-Medio de cultivo: RPMI -Tiempo de duplicación: entre 20 y 45 h.
CACO-2	Células tumorales epiteliales de colon humano	Adherente	-Medio de cultivo: DMEM
HT-29	Células tumorales epiteliales de colon humano	Adherente	-Medio de cultivo: DMEM con Glutamax.
SUIT-2	Células de adenocarcinoma de páncreas humano	Adherente	-Medio de cultivo: DMEM
BJhTERT	Fibroblastos del prepucio humano	Adherente	-Medio de cultivo: DMEM

Tabla 1. Características generales de las líneas celulares empleadas en el estudio.

Para la obtención de medios completos apropiados para el crecimiento, se procede a añadir distintos componentes: suero (FBS, *fetal bovine serum*) “des-complementado” mediante tratamiento térmico a 56°C durante 1 h, que proporciona nutrientes, factores de crecimiento, etc., y dependiendo de las condiciones de crecimiento se requiere 10% para mantenimiento o 1% para ralentizar las células y situarlas en el mismo ciclo celular; fuente de carbono como glutamina (1%); antibióticos (penicilina y estreptomycin, a una concentración 1%, y normocina, al 0,2%) y antifúngicos (fungizona, a 0,005%). El volumen final estándar para la preparación de un medio es de 500 ml, por lo que los porcentajes de los volúmenes a añadir se ajustan a ese volumen final.

Materiales y Métodos

Es necesario una observación diaria para ver la evolución del crecimiento y/o muerte celular, la confluencia, contaminaciones, realizándose cambios de medio y pases celulares según la confluencia. Todas las incubaciones de las líneas celulares se realizan en un incubador en ambiente saturado de humedad, con 5% de CO₂, 95% de O₂, a 37°C.

Ensayos sobre línea celular y matrices extracelulares

1.2. Valoración de la acción del ácido retinoico en líneas celulares

Se siembran para los diferentes ensayos 250000 células (125000 células/ml) en cada pocillo de placas P6. Varios pocillos son usados como control sin tratamiento, y otros son tratados con distintas concentraciones de AR: 0,1 µM, 1 µM y 10 µM. Para analizar el efecto en el tiempo de estos tratamientos se evalúan a diferentes horas, comprendidas entre 3 y 48 h de acción. En todos los cultivos, a las 24 h de siembra o día 1, se realiza un cambio de medio a medio completo 1% de FBS para estabilizar el crecimiento. El día 2, en medio completo 1%, se añade AR, y transcurrido el tiempo para cada experimento, se procesan los pocillos en frío.

1.3. Formación de matrices tridimensionales derivadas de fibroblastos

La elaboración de matrices extracelulares 3D, generadas a partir de cultivos de fibroblastos de la línea BJ, se llevó a cabo siguiendo el modelo descrito en Castelló-Cros y Cukierman (2009). Primero se añade en cada uno de los pocillos de una placa P6, 2 ml de gelatina en solución 0,2% incubándolo 1 h a 37°C. Posteriormente, se aspira la gelatina sobrante no gelificada y se lava con 2 ml de PBS. Para entrecruzar la gelatina se adiciona glutaraldehído al 1% en PBS y se incuba 30 min a T^a ambiente en reposo. Tras varios lavados de 5 min con PBS, se añade etanolamina 1 M durante 30 min a T^a ambiente, para neutralizar el glutaraldehído residual potencialmente tóxico. Por último, se procede a una nueva serie de lavados con PBS.

Una vez preparado el soporte para la matriz, se siembran fibroblastos a 250000 células/ml por pocillo, y se cambia el medio de cultivo por DMEM con ácido ascórbico 0,1%, que estabiliza las membranas y ± los distintos tratamientos (AR 10 µM o PDGF 20 µM), los días 2, 4, 6 y 8 del cultivo. El día 11 del experimento se procede a la lisis de fibroblastos; para ello, se recoge el medio, se lava con PBS 2 veces, y se trata con un detergente alcalino (Tritón X-100 0,5% (v/v) y 20 mmol/l NH₄OH) durante 10 min a 37°C. Posteriormente, se realizan varios lavados para eliminar los restos celulares lisados y se comprueba por microscopía. A continuación, se bloquean los pocillos con albúmina sérica bovina, BSA 2% durante 1 h a T^a ambiente. Para finalizar, se realizan varios lavados de nuevo que eliminan el resto del BSA.

Materiales y Métodos

1.4. Valoración de la acción del ácido retinoico o PDGF sobre fibroblastos formadores de matriz extracelular y posterior crecimiento de líneas tumorales

Sobre las placas con las matrices originadas con BJ activados o bien con AR o bien con PDGF, se siembran las células correspondientes tumorales a una concentración de 125000 células/ml, día 0. Cada 2 días se cambia el medio para mantener la viabilidad (los días 2 y 4). El día 7 se procede al levantamiento, recogida celular y almacenamiento para posteriores determinaciones proteicas.

1.5. Valoración del ácido retinoico sobre líneas celulares en matrices extracelulares activadas

Sobre las placas con las matrices originadas con BJ activados, se siembran las células correspondientes a una concentración de 125000 células/ml, día 0. Cada dos días, es necesario cambiar el medio por medio completo para mantener la viabilidad, y \pm AR a 10 μ M. Según el tiempo del experimento, se procede al levantamiento, recogida celular y almacenamiento para posteriores determinaciones celulares y moleculares.

III. Determinaciones celulares y moleculares

1. Extracción de proteínas y lisados celulares.

Procedimiento en frío para detener el metabolismo celular y mantener la viabilidad y conformación de las proteínas.

- Células Adherentes: Se retira el medio de los pocillos, y se almacena el sobrenadante a -80°C para posteriores determinaciones de los factores solubles secretados en el cultivo. Las células se lavan con PBS y se adiciona 50 μ l de tampón lisis (tampón RIPA con inhibidores de fosfatasa y proteasas y 5 mM de EDTA). Se incuban las placas 15 min y se recogen las células con raspador de forma mecánica. Mediante centrifugación de 15 min, 13000 rpm a 4°C , se separa la fracción de membranas celulares de la fracción citoplasmática o fracción post-mitocondrial (PMS). Las muestras se almacenan a -80°C hasta su procesamiento.
- Células en suspensión: Se recogen todas las células y se centrifuga en microfuga 5 min, 2000 rpm a 4°C , se guarda el sobrenadante, y se lava con PBS. Al sedimento resultante se le añade un volumen de tampón de lisis (~ 50 μ l) en proporción 1:1 con el peso seco de las células del tubo. Se incuba en frío durante 15 min, se centrifuga a 13000 rpm 15 min y se obtiene el PMS que se almacena a -80°C .
- Células adherentes sobre matrices: Se guarda el sobrenadante y se recogen las células y la matriz con un raspador y con 200 μ l de PBS. Se centrifuga 5 min, 2000 rpm a 4°C .

Materiales y Métodos

Se guarda el sobrenadante, que contiene la matriz, y se almacena a -80°C . El pellet resultante se lava con PBS y se le añade volumen de tampón de lisis apropiado. Se incuba en frío 15 min, se obtiene PMS y se almacena a -80°C .

- Células en suspensión sobre matrices: Se recogen todas las células y se centrifuga 5 min, 2000 rpm a 4°C , se guarda el sobrenadante, y se lava con PBS. Al sedimento resultante se le añade volumen de tampón de lisis, se incuba en frío 15 min, se obtiene PMS y se almacena a -80°C . La matriz que ha quedado en la placa se recoge con 200 μl de PBS, se lava, y se almacena a -80°C .

2. Técnicas de separación y análisis de proteínas

a. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Los PMS del extracto celular se resuelven en geles de poliacrilamida NuPAGE (Invitrogen) con el sistema vertical de proteínas *Mini Gel Tank* (Invitrogen). Se utilizan geles con gradiente de concentración de poliacrilamida (%acrilamida/%bis acrilamida) de 4% al 12% en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE). Las muestras se preparan en el tampón de carga 4X para proteínas en azul de bromofenol 0,025% y se mantienen a 200 V durante 1 h en tampón de electroforesis.

b. Transferencias de proteínas a membrana y detección. *Western blot*.

Las proteínas separadas mediante electroforesis SDS-PAGE se transfieren a membrana de nitrocelulosa mediante el sistema automático iBlot2 (Invitrogen). La transferencia seca se desarrolla a T° ambiente en 7 min a 20 V. Una vez que las proteínas se han transferido, la membrana se bloquea durante 1 h con leche desnatada en polvo al 5% en TBS que proporciona más estabilidad a las proteínas fosforiladas detectadas. Los anticuerpos utilizados se encuentran descritos en la tabla inferior (Tabla 2). Los anticuerpos monoclonales son diluidos en TBS y tween-20 al 1% (que optimiza la resolución de las membranas), y se incuban durante toda la noche a 4°C . Se utiliza TBS y tween-20 al 0,05 % para realizar los lavados. En el revelado se utiliza un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y esta es detectada por el escáner LI-COR® Odyssey de captura de señal. En todas las determinaciones se toman los niveles del anticuerpo β -actina como control de carga. Finalmente, se determina la intensidad de las bandas mediante el software de procesamiento y análisis digital de imagen ImageJ, desarrollado por el NIH. En el análisis se cuantifica el área de las bandas.

Materiales y Métodos

Anticuerpos	Dilución	Origen	MW
α - β -actina	1/1000	Mouse	45
α -NF-Kb p65 (p65)	1/1000	Rabbit	65
α -Phospho-NF-Kb p65 (p65p)	1/1000	Rabbit	65
α -Cleaved caspase-3 (Caspasa 3 <i>cleav.</i>)	1/1000	Rabbit	17/19
α -Ciclina D1	1/1000	Rabbit	36
α -c-Myc	1/1000	Rabbit	57
α -Bcl2	1/1000	Mouse	26

Tabla 2. Características generales y condiciones de empleo de los anticuerpos empleados en el estudio *in vitro*.

3. Citometría de flujo

Para la caracterización y cuantificación de poblaciones celulares, CDs (marcadores de membrana) e inmunocheckpoints (puntos de control inmunológicos) se realizan diversos marcajes con anticuerpos fluorescentes y se adquieren en el citómetro de flujo MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec), con 3 láseres de excitación y 8 detectores. El software de adquisición utilizado es el proporcionado por el aparato, mientras que el análisis se lleva a cabo mediante el programa FlowJo V.8.0.1.

a) Las muestras de SP son pre-tratadas durante 10 min a T^a ambiente, en una proporción 1:100 con la sonda fluorescente Viobility 405/520, que detecta células muertas. Después, se añade el conjunto de anticuerpos definido para cada planilla en proporción 1:50 o 1:25, según lo descrito en la casa comercial, y se incuban a 4°C 15 min. Por último, las muestras son tratadas con tampón de lisis de eritrocitos durante 30 min a T^a ambiente, se lavan con PBS, y se resuspenden en 100 μ l para ser adquiridas en el aparato. Si las muestras no pueden ser adquiridas en el momento, se fijan con una solución al 2% de paraformaldehído.

b) Las muestras procedentes de cultivo se encuentran ya lavadas con PBS, por tanto, se incuban con la sonda y el conjunto de anticuerpo descrito, únicamente.

En todos los casos, la fracción recolectada se reparte en tubos de 5 ml, de los cuales, uno carece de marcaje y sirve para establecer los voltajes o PMT, representando el control negativo frente a la autofluorescencia de las células. A su vez, se procede a realizar la compensación de fluorescencia, para evitar que se produzcan solapamiento entre los espectros de emisión de diferentes fluoróforos. Para ello, se pone una gota de microesferas (negativas y positivas) en cada tubo y se marcan exclusivamente con cada uno de los anticuerpos utilizado en la planilla por separado. El software de adquisición calcula la matriz de compensación de forma automática y esta se carga en la muestra correspondiente.

En SP, los anticuerpos incluidos en el panel humano de DC son: anti-CD3-VioBlue, CD19-VioBlue, CD14-Vioblue, CD16-VioBlue, CD56-VioBlue, CD1c-FITC,

CD103-FITC, CD123-PE, ICOSL-PE, CCR5-PE, CD11c-PE-Vio615, HLA-DR-PE-Vio770, PD1L-APC, PD1-APC, ICAM-APC, CD141-APC-Vio770, CD86-APC-Vio770 y CD83-APC-Vio770. Para las células de cultivo, el panel incluye anticuerpos anti-CD14-VioBlue, CD4-VioBlue, CD44-FITC, ICOSL-PE, ICOS-PE-Vio 770, PD1L-APC, CD86APC-Vio700.

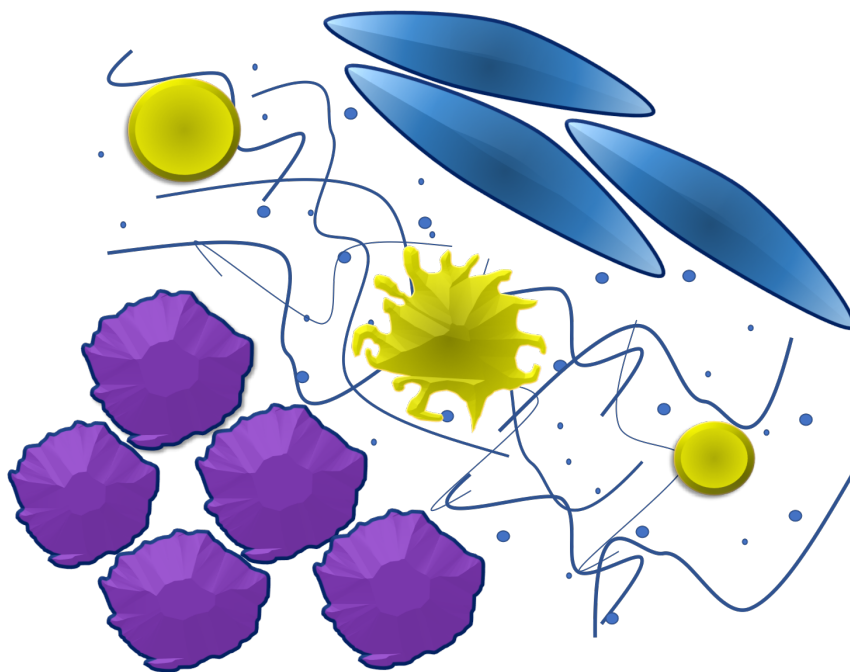
4. Inmunoensayo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Ensayo para la detección del factor soluble inmunológico TGF β -1 en muestra de plasma de pacientes. Se lleva a cabo siguiendo el protocolo descrito en *human TGF β -1 ELISA kit* (Diaclone), donde el anticuerpo anti-TGF β -1 humano se encuentra unido a los micropocillos de una placa P96. Para detectar la molécula es necesaria su activación, para ello se realiza un pretratamiento con HCl, y posterior neutralización con NaOH. Las muestras activadas son incubadas en la placa donde se produce la unión anticuerpo-TGF β -1 soluble. Se realizan lavados con tampón de lavado y se agrega un segundo anticuerpo anti-TGF β -1 humano conjugado con biotina, uniéndose al TGF β -1 capturado por el primer anticuerpo. Seguidamente se añade estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano), que se ensambla al anticuerpo conjugado con biotina. Finalmente se introduce un substrato capaz de reaccionar con HRP, desencadenando la producción de color cuantificable. Se para la reacción, y se mide la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro.

5. Análisis estadístico

Los datos sujetos a análisis estadísticos son presentados como el valor de la media \pm SEM de las medidas independientes en experimentos separados y analizados mediante GraphPad Prism V7.0 para Mac (San Diego, USA). Los diferentes análisis empleados se indican en el texto y en las leyendas de las figuras pertinentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Resultados y Discusión

1. Caracterización del sistema inmune en pacientes con tumores gastrointestinales

Para caracterizar las poblaciones de células dendríticas implicadas en tolerancia y regulación inmunológica, se realizan determinaciones de marcadores de membrana por citometría de flujo. La respuesta y estado inmunológico se evalúan en pacientes con PDAC y CRC, antes y dos meses después del tratamiento, siguiendo el protocolo de seguimiento del Servicio de Oncología Médica. Se analizan células en sangre periférica (SP) de individuos sanos (control) y pacientes enfermos.

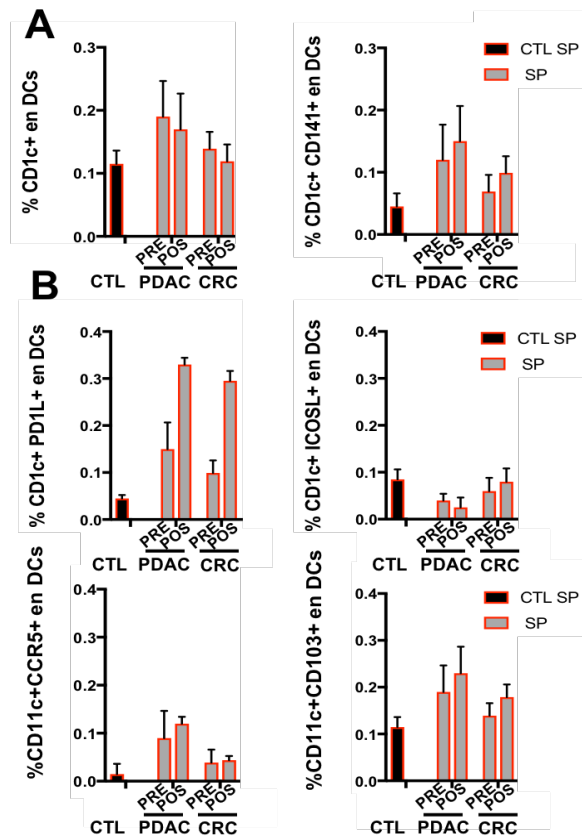


Figura 1. Caracterización de células dendríticas en sangre periférica. Gráficas de porcentajes de marcadores de mDC (CD1c y CD11c) y frente a CD141, PD1L, ICOSL, CCR5 y CD103. Se utilizan pacientes sanos (CTL), con adenocarcinoma pancreático (PDAC) pre-tratamiento (PRE) y post-tratamiento (POS), al igual que pacientes con cáncer colorrectal (CRC) pre y post-tratamiento. Las barras indican la media con la desviación típica.

Se observa una mayor proporción de mDC (CD1c+) en SP de pacientes con PDAC y CRC con respecto a los pacientes sanos, disminuyendo en ambos tras el tratamiento. Una gran proporción mDCs en pacientes con PDAC sin tratar presentan el marcador de senescencia CD141 con respecto a individuos sanos, mientras que en CRC hay un incremento sustancial antes del tratamiento, y en todos, tras el tratamiento, se incrementa la cantidad de mDC CD141+ (Fig. 1A). La presencia de CD141 implica senescencia o proceso iniciado en respuesta al estrés o daño celular, proceso que según nuestros resultados no se re-establece tras el tratamiento. Por otro lado, se observa en las células CD1c+ PD1L+ (unión a PD1 -inhibidor del SI-), una mayor proporción en pacientes con PDAC y CRC, incrementándose en ambos más del doble tras el tratamiento. Por el contrario, estudiando otro punto de control, las células CD1c+ICOSL+ (ligando de ICOS)

Resultados y Discusión

están en menor proporción en pacientes con cáncer que en individuos sanos (Fig. 1B). Estas moléculas reguladoras, PD1L e ICOSL, intervienen en la modulación y activación de los L-T. PD1L (ligando de muerte programada) es ampliamente expresada en múltiples tipos celulares inmunes incluyendo también la superficie de células tumorales. Su expresión puede inhibir la respuesta antitumoral de dos maneras; por un lado, desactivando los L-T citotóxicos en el microambiente tumoral y, por otro, evitando la activación de los L-T en los nódulos linfáticos. Esto ocurre porque se une al receptor PD1 de los L-T reduciendo la producción de citoquinas y la producción de células T (Chen *et al.*, 2012). ICOSL se expresa generalmente en L-B, DC y macrófagos y puede ser inducida en células no hematopoyéticas en respuesta a señales inflamatorias. Media la interacción entre los L-T CD4 (que expresan ICOS) y las DC para la inducción de Treg. Esto puede disminuir la actividad antitumoral, observándose además una relación entre la expresión de ICOS con los puntos de control inmune como PD1 (Zhang *et al.*, 2016). Según nuestros resultados, las DCs modulan la expresión de PD1L, que genera en principio más Treg pero no la expresión de ICOSL, en respuesta a estímulos tumorales, y esta modulación positiva se ve incrementada en respuesta al tratamiento.

Por otro lado, se observa un incremento de CD11c+CCR5+ en pacientes con PDAC, y en CRC en menor proporción, con respecto a los individuos control, sin cambios significativos antes y después del tratamiento, lo que indicaría un incremento de la movilidad de las mDC en la respuesta antitumoral. Finalmente, las CD11c+CD103+ (mDC de mucosa intestinal) aumentan también en ambos tipos de cáncer y el incremento es mayor tras el tratamiento (Fig.1B). Estas células de la mucosa se movilizan hacia nódulos linfáticos para aumentar y dirigir la respuesta inmune, que se vería favorecida por la acción del tratamiento. Las células mDC (CD11c+), al ser las encargadas de presentar los antígenos a los L-T, pueden modular su diferenciación celular en distintos fenotipos, según las moléculas que produzcan e interaccionen con los L-T (Mucida *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2010), condicionando la acción del SI frente al tumor. Las mDC se dividen en mDC de tipo 1 (CD11c+) y 2. Dentro de las de tipo 1 encontramos las DC CD11c+CD103+. Estas, al interaccionar con los L-T en nódulos linfáticos y en los folículos de las mucosas, los llevan a diferenciarse en Treg, lo que se asocia con baja supervivencia de los pacientes con cáncer (Feng *et al.*, 2010), ya que disminuye la respuesta antitumoral mediante la producción de citocinas inhibitoras como IL-10 o TGF β (Vignali *et al.*, 2008).

Resultados y Discusión

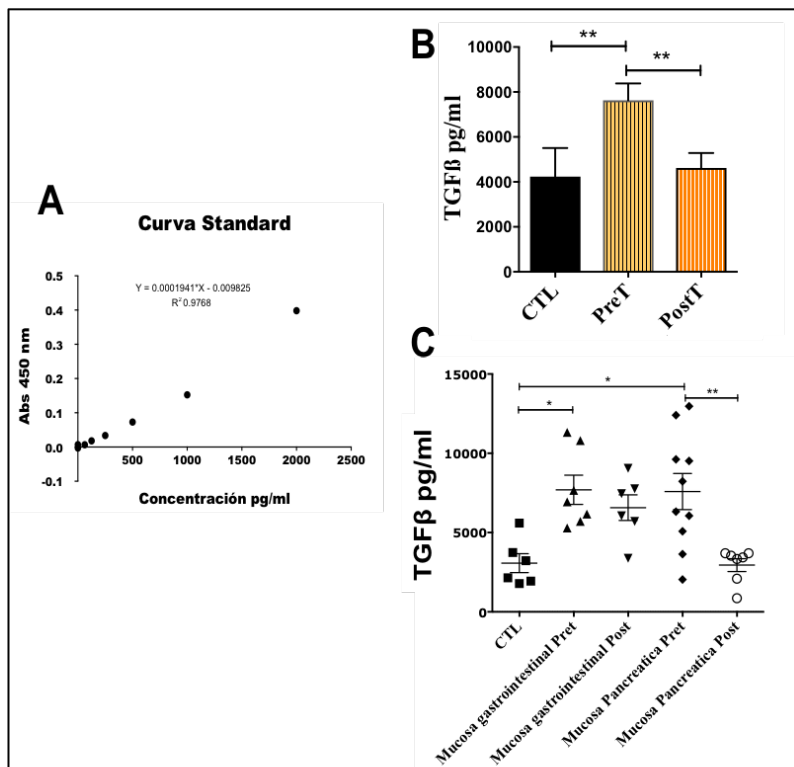


Figura 2. Determinación de los niveles de TGFβ en muestras pre y post-tratamiento mediante ELISA. Curva estándar mostrando la relación entre la absorbancia a 450 nm y la concentración (pg/ml) de TGFβ (A). Representaciones gráficas que reflejan las diferencias de concentración de TGFβ en plasma de pacientes sanos (CTL), y con cáncer digestivo, pre (PreT) y post-tratamiento (PostT) (B), y atendiendo a los tipos de mucosa según localización (C). Los datos fueron analizados mediante una prueba T de student (B) y una prueba ANOVA (C). Las diferencias significativas se indican con asteriscos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Las barras de error hacen referencia a la desviación típica que se distribuye alrededor de un valor central que es el valor medio de cada grupo.

Para caracterizar de forma más completa el nivel de respuesta inmunológica, realizamos test ELISA y valoramos la citoquina antiinflamatoria TGFβ. Los pacientes se evalúan antes y dos meses después del tratamiento, y se comparan con valores base de TGFβ de individuos control. El valor alto de R^2 indica que hay una buena relación lineal entre las variables en la ecuación (Fig. 2A). Se observa mayor concentración de TGFβ en pacientes previo al tratamiento, mientras que no se aprecian grandes cambios en la concentración de los individuos sanos con respecto a los pacientes después del tratamiento (Fig. 2B). Al dividir los grupos pre y post-tratamiento, en los subgrupos correspondientes de mucosa según la localización (gastrointestinal o pancreática), se observa un incremento significativo en mucosa gastrointestinal entre los controles y valores pre-tratamiento, mientras que no se observa gran diferencia en los niveles post-tratamiento con respecto a los pre-tratamiento ni a los controles. En el caso de la mucosa pancreática, se observa también un incremento significativo del valor en muestras pre-tratamiento respecto a niveles control, pero presentando en este caso gran dispersión de valores intra-grupo. En contraposición, los datos post-tratamiento se agrupan en valores muy cercanos a la media, y descienden muy significativamente con respecto a los individuos pre-tratamiento (Fig. 2C). TGFβ se encuentra implicado en regulación de la proliferación, diferenciación celular, y supresión del sistema inmune (Kropf *et al.*, 1997). Nuestros resultados indican que la valoración de TGFβ en el plasma puede ser un buen

Resultados y Discusión

marcador del estado y la respuesta al tratamiento del paciente. Los valores descendentes después del tratamiento indican una mejora en la capacidad de respuesta antitumoral, aunque se debe extender el análisis a todos los tiempos del tratamiento y evaluar más componentes inmunosupresores antes de establecer conclusiones definitivas. Las fluctuaciones de TGF β en pacientes pre-tratamiento en la mucosa pancreática pueden ser debidas a que TGF β , dependiendo de la etapa del tumor, puede actuar como supresor o promotor tumoral en el cáncer de páncreas (Javle *et al.*, 2014), o indicar que en este tipo de tumores donde la matriz es densa y muy compleja, la liberación de este factor responde a diferentes estímulos, pudiendo ser secretado o no por multitud de células.

2. Caracterización del microambiente tumoral en un modelo de mucosa

Caracterización de la expresión en células tumorales de puntos de control inmunológicos bajo la influencia del ácido retinoico ambiental

Para caracterizar y analizar los cambios en la membrana de moléculas implicadas en regulación de respuesta inmune, se evalúan por citometría de flujo diferentes marcadores, en las líneas tumorales de páncreas SUI2-2 y PANC-1, y de colon HT-29, sometidas a AR (1 y 10 μ M) durante 48 h. Para el análisis de células se realiza la selección de células únicas/singletes utilizando el parámetro altura. Tras ello, se selecciona la región negativa de la sonda Viobility para la elección de células vivas.

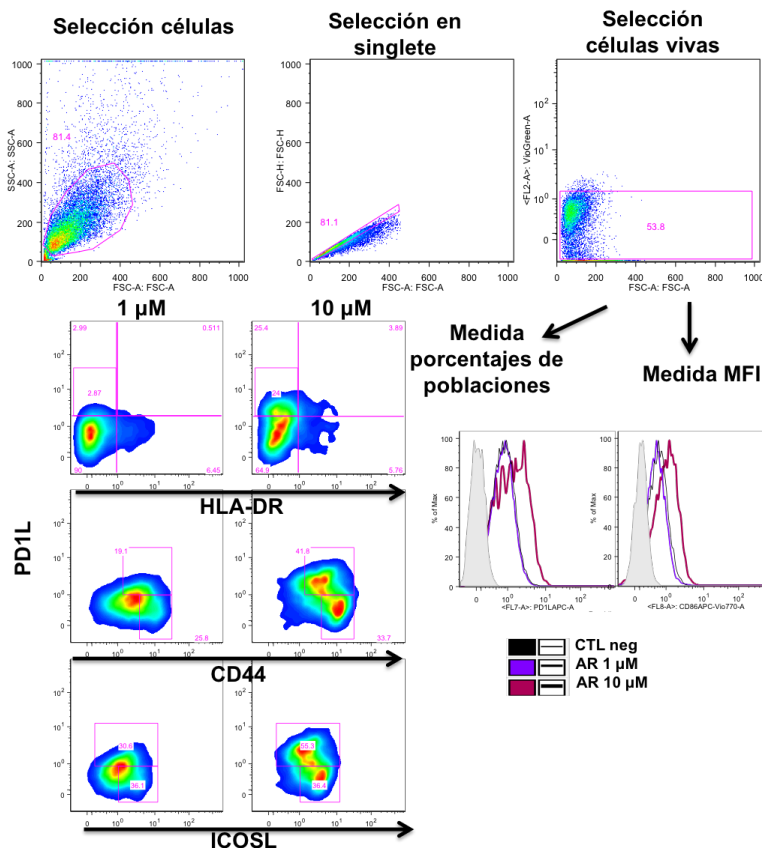


Figura 3. Análisis de poblaciones.

Estrategia de regiones para analizar por citometría de flujo. Primero, *dot plot* (*Forward Scatter vs Side Scatter*) con región/gate de células adquiridas. Sobre esta región, selección de células únicas/singletes, utilizando el parámetro altura (H), y, sobre este, región negativa de sonda Viobility para la selección de células vivas. A continuación, gráficas de medida de porcentajes de poblaciones. La distribución de las células en el diagrama se representa a través de un *density plot*. Se encuentran delimitadas (cuadrado rosa) las fracciones positivas para cada marcador por separado y para los dos marcadores representados en cada *density plot*. En cada caso existe un *density plot* con células tratadas con 1 μ M de AR y otro con células tratadas con 10 μ M. Finalmente, la intensidad media de fluorescencia (MFI), histogramas reflejando la expresión media por células de un único marcador, en la izquierda PD1L y en la derecha CD86, viéndose en células control (CTL) y en células tratadas con AR 1 μ M y 10 μ M.

Resultados y Discusión

Una vez analizados los diversos marcadores con diferentes estrategias de *gate* (Fig. 3), se observa, en primer lugar, que en ninguna de las líneas celulares tumorales estudiadas se detecta expresión del marcador mieloide CD14 ni del marcador del control inmune o inmunocheckpoints ICOS. Sin embargo, tanto en las líneas tumorales pancreáticas como en las tumorales de colon, y bajo la influencia del AR, se observa un aumento en la expresión del modulador negativo PD1L, así como del marcador de coestimulación-coinhibición CD86 (unión a CTLA-4 inhibidor) y, en contraste, muy poca variación en HLA-DR, siendo más acusada en líneas PDAC (Fig. 4).

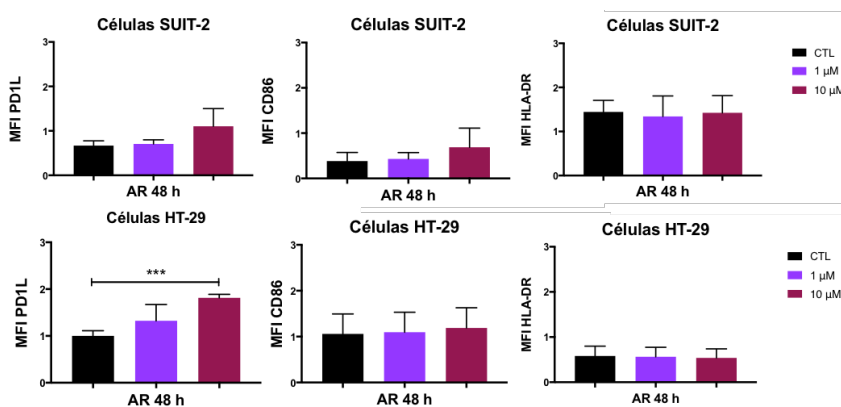


Figura 4. Análisis de expresión de marcadores mediante intensidad media de fluorescencia (MFI). Los datos fueron analizados mediante una prueba T-student de las medias de las 3 réplicas analizadas. Las diferencias significativas (* $p < 0.05$) se indican con asteriscos. Las barras de error hacen referencia a la desviación típica.

También se detectó que la población de células que aumentan su expresión en PD1L, presenta un descenso en la membrana de HLA-DR (PD1L+HLA-DR-), bajo influencia de elevadas concentraciones de AR. Sin embargo, con relación a CD44 (receptor del ácido hialurónico), existen diferencias de expresión tanto en poblaciones con presencia como con ausencia de PD1L, PD1L+CD44^{low}+ y PD1L-CD44+, y es opuesta en ambos grupos de líneas celulares. Por último, detectamos que el marcador ICOSL disminuye su expresión bajo la acción del AR, en células PD1L-, mientras que no se altera en líneas tumorales de colon, y aumenta en líneas tumorales pancreáticas (Fig. 5).

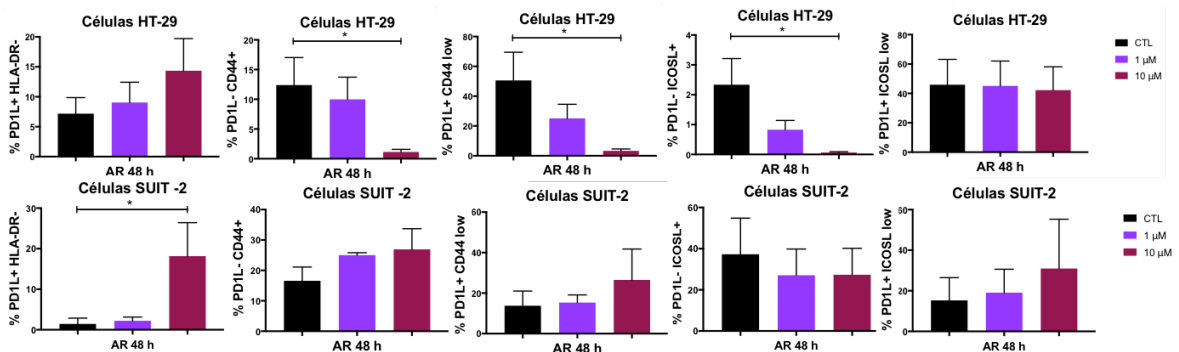


Figura 5. Representación de la expresión de PD1L frente a la de HLA-DR, CD44 e ICOSL. Porcentajes de células positivas y/o negativas para los respectivos marcadores con o sin AR 1 μ M o 10 μ M. Low hace alusión a las células con un nivel bajo de expresión del marcador. Las barras denotan la media resultante de las 3 réplicas analizadas. Los datos fueron analizados mediante una prueba T-student y las diferencias significativas (* $p < 0.05$) se indican con asteriscos. Las barras de error hacen referencia a la desviación típica.

Resultados y Discusión

La evolución y regulación de la expresión de los diversos puntos de control que pueden incidir en la respuesta antitumoral inmune es en la actualidad un campo de estudio muy importante, pues es la base de los nuevos tratamientos de inmunoterapia (anti-PD1L o anti-CTLA-4). HLA-DR se requiere para el reconocimiento de antígenos asociados al tumor por células T CD4+, y su expresión en células cancerosas se relaciona con un mejor pronóstico en pacientes con cáncer colorrectal (Matsushita *et al.*, 2005). Por último, CD44 es una glicoproteína implicada en la interacción entre células, pero sobre todo en la interacción de células con componentes de la matriz extracelular. Se ha relacionado con la invasión y metástasis en cáncer colorrectal, y su sobreexpresión aumenta el crecimiento tumoral y las propiedades antiapoptóticas (Leng, 2018).

Detectamos que, en líneas tumorales, con tratamiento de altas concentraciones de AR, moléculas como PD1L, implicadas en regulación inmune, aumentan su expresión, y que, en estas células PD1L+, detectamos un descenso en marcadores de respuesta tumoral inmune como HLA-DR. Mientras, la expresión variable y condicionada por el AR de marcadores de control inmune como ICOSL, o de unión a matriz extracelular, como CD44, se podría ver afectada, además, por otros factores moleculares propios de cada proceso celular, relacionados con el ambiente tumoral.

Caracterización de la proliferación celular en condiciones de liberación de ácido retinoico al medio extracelular

Los tipos celulares empleados para la determinación de factores de transcripción mediante inmunoblotting incluyeron líneas de PDAC (SUIT-2 y PANC-1), CRC (HT29 y CACO-2), células del SI (Jurkat y HL60), y fibroblastos (BJ), que sintetizan la matriz extracelular, en presencia de concentraciones variables del factor soluble AR.

Comparativamente, se estudian líneas tumorales pancreáticas *versus* líneas tumorales de colon, mostrándose en los resultados una representativa de cada estirpe. Se analiza la adición de AR 1 μ M y 10 μ M a tiempos cortos de tratamiento (3 h) para evaluar qué tipo de respuesta transcripcional se produce (Fig. 6). Se observa, en las PDAC, aumento de p65 conforme aumenta la dosis de AR, al igual que caspasa 3 cleavage (caspasa 3), llegando a ser estadísticamente significativo el incremento con 10 μ M (Fig. 6A), mientras que en la línea de CRC se detecta un descenso gradual de p65 y un descenso aún más pronunciado en el caso de caspasa 3, con la misma concentración de AR (Fig. 6B). En PANC-1 se observa, además, un incremento de p65p, siendo este incremento más notorio a una concentración de 10 μ M de AR (Fig. 6C). Por su parte, en HT-29 se analizan, además, ciclina D1 y bcl-2, evidenciándose en ambos un incremento con 1 μ M

Resultados y Discusión

y un descenso con 10 μM , llegando el incremento a superar el control más de 4 veces en el caso de bcl-2. Los niveles de ciclina D1, por su parte, se incrementan en sólo 2 veces respecto al control (Fig.6D).

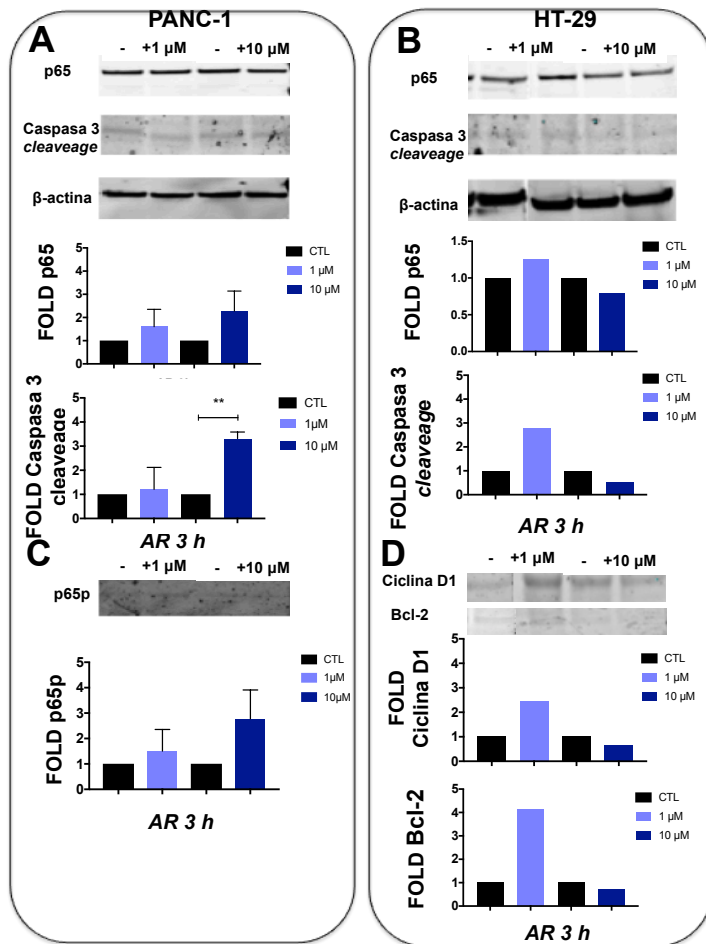


Figura 6. Inmunoblotting de PANC-1 Y HT-29 con exposición a AR 1 μM y 10 μM durante menos de 3h. Resultados relativos al ensayo en la línea PANC-1 y HT-29 tras 3h de tratamiento con AR 1 μM y 10 μM , y sus respectivos controles. Las bandas indican, en el caso de PANC-1, la presencia de p65, caspasa 3 cleavage, y β -actina (como control del porcentaje proteico contenido en cada muestra) (A) y p65p (C); y en el caso de HT-29, presencia de p65, caspasa 3, actina (B), ciclina D1 y bcl-2 (D). Bajo cada membrana se muestran las gráficas en Fold ilustrando la comparativa entre la cantidad relativa de cada proteína, con tratamiento a 1 μM o a 10 μM de AR, frente a sus respectivos controles (CTL). Los datos fueron analizados mediante una prueba T-student. Las diferencias significativas (**p-valor < 0.01) se indican con asteriscos. Las barras de error hacen referencia a la desviación típica.

Para analizar el efecto mantenido a largo plazo del AR, se plantearon experimentos a 48 h de las mismas líneas tumorales (Fig. 7), observándose un incremento de p65p del doble con respecto al control en las líneas de SUIT-2 con tratamiento de 10 μM (Fig. 7A). Sin embargo, en las líneas de HT-29, a la misma concentración, se observa un descenso a la mitad con respecto a los valores de las muestras control. Por otro lado, con respecto a p65, se aprecia un incremento de hasta 4 veces su valor en SUIT-2, mientras que en HT-29 presenta un descenso a la mitad de los valores normales. Por otro lado, se estudió caspasa 3 y ciclina D1 en HT-29, detectándose un descenso en ambas, siendo éste de dos tercios en el caso de caspasa 3, mientras que para ciclina D1, el descenso fue de poco más de la mitad (Fig. 7B).

Resultados y Discusión

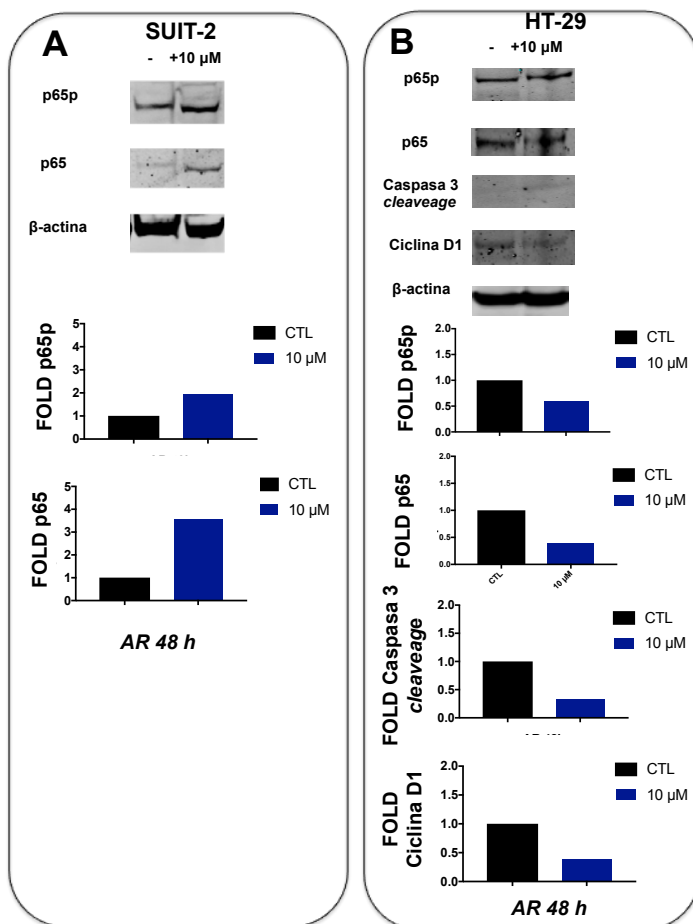


Figura 7. Immunoblotting de SUI-2 y HT-29 con exposición a AR 10 μM durante 48 h. Resultados relativos al ensayo en la línea SUI-2 y HT-29 tras 48 h de tratamiento con AR 10 μM y sus respectivos controles. Las bandas indican, en el caso de SUI-2, la presencia de p65, p65p y β-actina (como control del porcentaje proteico contenido en cada muestra) (A) y en el caso de HT-29, presencia de p65, p65p, caspasa 3, ciclina D1 y β-actina (B). Bajo ellas se muestran las gráficas Fold que recogen la comparativa entre la cantidad relativa de cada proteína, con tratamiento a 10 μM de AR frente a sus respectivos controles (CTL).

Como el objetivo es estudiar el efecto del AR en varios procesos celulares, para evaluar su efecto microambiental, diseñamos los mismos experimentos de acción del AR, pero esta vez sobre fibroblastos de la línea BJ (Fig. 8), y evaluamos su capacidad de activación para la formación de la matriz extracelular. En este caso, no se detecta ni caspasa 3, ni c-myc ni bcl-2, tras 6 y 24 h de tratamiento respectivamente. Sin embargo, se observa una disminución en los niveles de p65p frente a sus controles a 6 h tanto en el tratamiento con 1 μM, como con 10 μM de AR (Fig. 8A). En contraste, a 24 h de exposición se observa un leve incremento con 1μM de AR, aunque de nuevo se produce un descenso con 10 μM, llegando a descender los niveles casi 2 tercios con respecto al control. En el caso de p65, los resultados son muy homogéneos, como también lo son en el caso de ciclina D1. Por último, se hicieron estudios en condiciones fisiológicas de AR (0,1 μM) durante 24 h, detectándose un incremento de p65p del doble, repitiéndose la misma tendencia en p65 y ciclina D1 (Fig. 8B).

En los experimentos descritos anteriormente se evaluó el efecto del AR a diferentes tiempos de exposición sobre la expresión del protooncogen c-myc, viéndose en PANC-1 a tiempos cortos de acción, un aumento de 3 veces la concentración a 1 μM, y aumentando prácticamente 5 veces más que los valores del control a 10 μM (Fig. 9A).

Resultados y Discusión

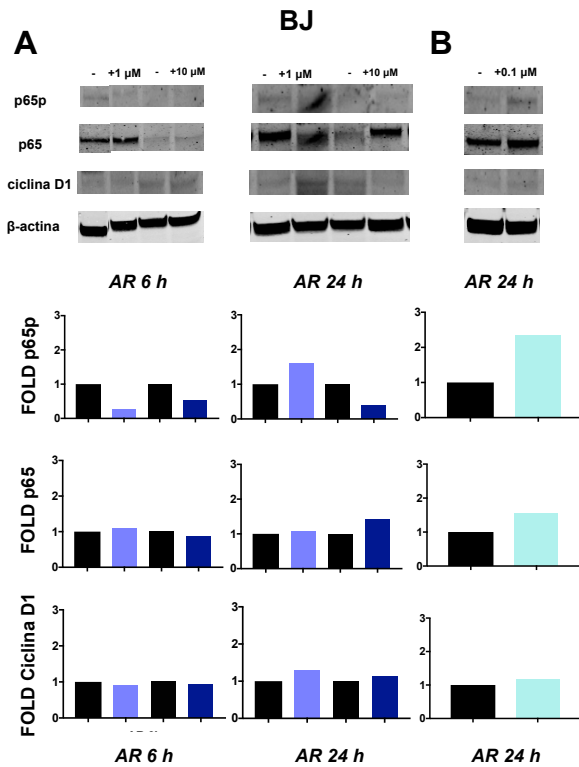


Figura 8. Immunoblotting de BJ con exposición a AR 1 μM y 10 μM durante 6 h y 24 h y con exposición a AR 0,1 μM durante 24h. A). Datos relativos al ensayo en la línea BJ tras 6 h de tratamiento con AR 1 μM y 10 μM, y tras 24 h a 0,1 μM, 1 μM y 10 μM y sus respectivos controles. Las bandas indican la presencia de p65p, p65, ciclina D1 y β-actina (como control del porcentaje proteico contenido en cada muestra). Bajo ellas se muestran las gráficas Fold ilustrando la comparativa entre la cantidad relativa de cada proteína, tras los respectivos tratamientos con AR, frente a sus controles pertinentes (CTL).

Por otro lado, en ensayos con CACO-2 con tratamientos durante 18 h a 1 μM y 10 μM de AR se observa una disminución de c-myc (Fig. 9B). Para comprobar que el efecto es el mismo en otras líneas, realizamos los mismos experimentos a distintos tiempos (cortos y largos) con Jurkat y HL-60, en los cuales no se detecta la presencia de ninguna de las proteínas estudiadas. Solo en HL60, tras 48 h de exposición, se detecta c-myc, con una tendencia muy similar a la de líneas tumorales pancreáticas (Fig. 9C).

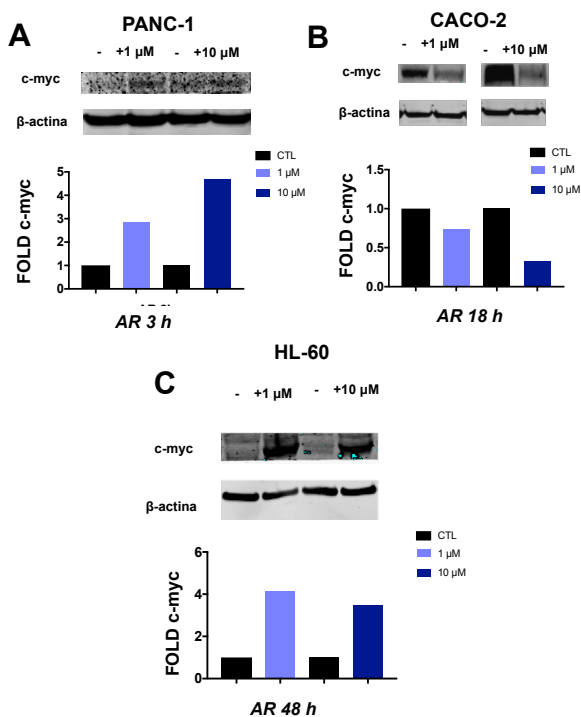


Figura 9. Immunoblotting de c-myc en PANC-1, CACO-2 y HL-60 con exposición a AR 1 μM y 10 μM durante 3h 18h o 48h. A-C) Datos relativos al ensayo en la línea PANC-1 (A) tras 3 h de exposición, CACO-2 (B) tras 18 h de exposición y HL-60 (C) tras 48 h de exposición a AR 1 μM y 10 μM y sus respectivos controles. Las bandas indican la presencia de c-myc y β-actina (como control del porcentaje proteico contenido en cada muestra). Bajo ellas se muestran las gráficas Fold ilustrando la comparativa entre la cantidad relativa de cada proteína, con tratamiento a 1 μM y 10 μM de AR, frente a sus respectivos controles (CTL).

Resultados y Discusión

Existen tres isómeros diferentes del AR, todo-trans (ATRA), 9-cis y 13-cis, y se pueden unir a distintas proteínas de unión cuando viajan en fluidos biológicos, que llevan al AR a diferentes localizaciones y activan diferentes vías de señalización mediante la unión a sus receptores intracelulares, RXR (Connolly *et al.*, 2013). La unión a diferentes receptores y diferentes proteínas adaptadoras del receptor puede regular a diferentes factores transcripcionales como NF- κ B p65 y p65p (p65 fosforilado), bcl-2, caspasa-3, c-myc y ciclina D1, con diferentes funciones biológicas.

Muchos estímulos conducen a la activación de NF- κ B, el cual regula la expresión de gran cantidad de genes implicados en la respuesta inmune, la respuesta al estrés, apoptosis, proliferación, diferenciación y desarrollo (Oeckinghaus y Ghosh, 2009). Algunos estudios han corroborado la acción de isotipos de AR en NF- κ B p65, observándose que el ATRA incrementa los niveles de ARNm de NF- κ B y la actividad de p65 en queratinocitos humanos (Dai *et al.*, 2004). Así, la presencia de p65- p65p (presente en el núcleo) fue usada como control de la actividad celular. Bcl-2 juega un papel integral en la regulación de la muerte celular, controlando la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c al citoplasma, donde puede generar junto con otras proteínas un apoptosoma activo. Este último permite la activación de la caspasa 3, implicada en la apoptosis (Pratt y Niu, 2003). En algunos cánceres se ha visto una inhibición de bcl-2 y consiguiente aumento de caspasa 3 por la acción del AR (Guruvayoorappan *et al.*, 2008). Por su parte, la ciclina D1 interviene en las quinasas dependientes de ciclina (CDK), responsables de la progresión a través de G1. En muchos tipos de tumores se observa una amplificación y/o sobreexpresión del gen ciclina D1 (Pratt y Niu, 2003) y se cree además que actúa de forma sinérgica con c-myc, potenciando el incremento del crecimiento y división celular (Wang *et al.*, 2007).

El aumento observado de p65 y p65p en las líneas de PDAC tanto a etapas tempranas como tardías, sugiere un aumento de la actividad celular, proporcional a la cantidad de AR. Por su parte, en PANC-1, tras tratamiento de 3 h con AR, y sobre todo con 10 μ M, se observa un incremento de caspasa 3, sugiriendo una estimulación de la apoptosis, como ya ha sido descrito (Herrerros-Villanueva *et al.*, 2015). El tratamiento con AR, por su parte, parece tener efectos contrarios en las líneas de CRC, en función de la dosis. El tratamiento con concentraciones bajas de AR conduce a un incremento de la actividad celular medida a través de los niveles de p65 y p65p, acompañado por un aumento también en los niveles de caspasa 3, ciclina D1 y bcl-2. A concentraciones altas de AR, no obstante, el efecto se revierte, tanto a etapas tempranas como tardías. Las

Resultados y Discusión

proteínas estudiadas tienen efectos muy diferentes. Así, el que los niveles de todas ellas varíen siguiendo una misma tendencia puede indicar que el AR posee un amplio espectro de acción, de tal modo que, en una misma célula, sea capaz de desencadenar distintas vías de señalización. Esto ya ha sido recogido en trabajos previos, viéndose que puede unirse a CRABP, conduciendo a la apoptosis e inhibición del crecimiento, o a FABP5, estimulando la proliferación celular (Connolly *et al.*, 2013).

Se sabe que el ATRA produce un incremento de la apoptosis en HT-29 a 10 μ M (Zhang *et al.*, 2012). Sin embargo, los datos aquí obtenidos parecen indicar lo contrario, tanto a etapas tempranas como tardías, lo que podría deberse a la actuación de un isotipo distinto de AR, o a que la interacción de este con otras moléculas celulares pudiese conducir a un efecto final distinto. El descenso en los niveles de proteínas inductoras tanto de apoptosis como de proliferación podría estar implicado en la no-progresión del tumor. Datos previos (Pellegrini *et al.*, 2015) recogen un aumento de la proliferación celular en células BJ tratadas con AR, aunque en nuestros estudios no se observa efecto importante en estas tras tratamiento con altas concentraciones de AR. A concentraciones bajas se observa un cierto incremento de p65p, pero no de otras proteínas implicadas en proliferación (solo un ligero aumento de ciclina D1 tras 24 h). Por último, analizando c-myc, se encuentran diferencias entre las células inmunes, células de CRC y las de PDAC. Tanto en PANC-1 como en HL-60 se registra un aumento notable en los niveles de c-myc tras tratamiento con AR, mientras que en CACO-2 conduce a un descenso de los mismos. Esto podría sugerir que el tratamiento estimula el SI, ayudando a actuar frente a las células tumorales, en especial, según los datos obtenidos, frente al CRC dado que este, a su vez, disminuiría su proliferación.

Evaluación del efecto de matrices extracelulares activadas sobre las líneas celulares tumorales

Para analizar el modelo de mucosa en su conjunto, decidimos estudiar el efecto de la matriz extracelular sobre las líneas tumorales del tracto gastrointestinal. En los experimentos en los que se activaba la formación de matriz con AR, no se observan cambios significativos entre los niveles de las proteínas estudiadas, tanto en las líneas de PDAC como en las de CRC. Esto sugiere que el AR no tiene efecto sobre los fibroblastos, en relación sobre la formación de la matriz, y no han inducido cambios sobre las células tumorales. Por ello, se trató a los fibroblastos con PDGF 20 μ M, que es un factor ya descrito de activación de fibroblastos, y tampoco se observan cambios importantes, aunque en la línea CACO-2 sí se observa incremento de p65, y aún mayor de p65p,

Resultados y Discusión

llegando este a ser más de 3 veces el control. Esto sugiere un incremento en la actividad celular, pero dicha actividad no se produce en las vías de señalización en las que participan las demás proteínas estudiadas (Fig. 10 A, B).

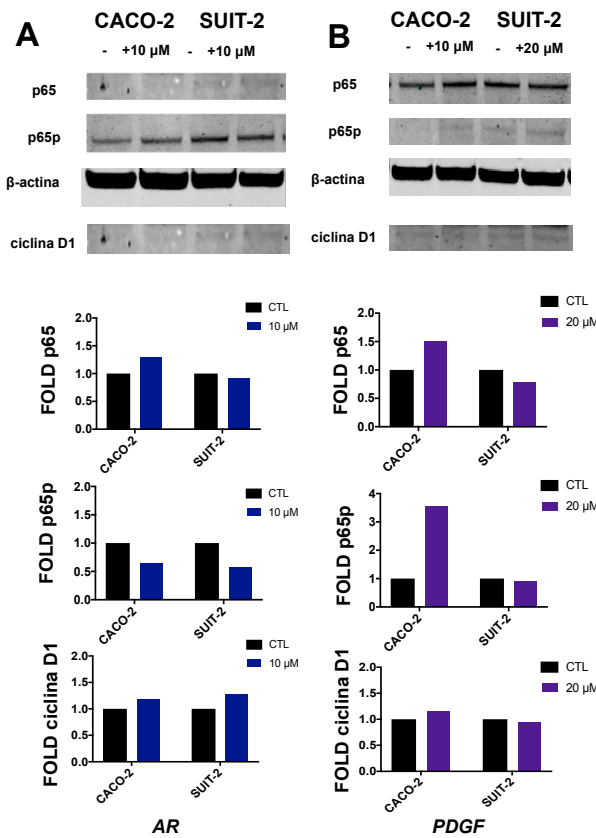


Figura 10. Inmunoblotting de células tumorales cultivadas en matriz tratada con AR a 10 μM y PDGF a 20 μM. A-B) Datos relativos al ensayo en la línea CACO-2 y SUII-2 tras tratamiento con AR 10 μM (A) o tratamiento con PDGF 20 μM (B) sobre la matriz extracelular y sus respectivos controles. Las bandas indican la presencia de p65, p65p, β-actina (como control del porcentaje proteico contenido en cada muestra) y ciclina D1. Bajo ellas se muestran las gráficas Fold ilustrando la comparativa entre la cantidad relativa de cada proteína, con tratamiento a 10 μM de AR o a 20 μM de PDGF, frente a sus respectivos controles (CTL).

Caracterización de la expresión en células tumorales sobre matrices de fibroblastos activadas, de puntos de control inmunológicos de la matriz y del ácido retinoico ambiental.

Tras el establecimiento de matrices activadas, se quiso estudiar la regulación de marcadores de membrana importantes en el control de la respuesta inmune de células tumorales crecidas en ellas, e influenciadas con concentraciones altas de AR a 24 y 48 h, mediante citometría de flujo. En este modelo de microambiente de fibroblastos activados con PDGF y posterior adición de la línea tumoral y AR, se observa un incremento en los marcadores de control inmunológico PD1L (Fig. 11A) y CD86 (Fig. 11B), siendo más acusado a 24 que a 48 h, y de mayor magnitud en líneas tumorales de páncreas, observándose también en estas un incremento de HLA-DR. Respecto a las líneas inmunes Jurkat y HL-60, la activación de fibroblastos para crear matriz extracelular y adición de AR, apenas repercute en la expresión de proteínas de membrana (Fig. 11 B, C). En general, solo se observa un pequeño efecto en CD86 y HLA-DR, indicadoras de activación celular.

Resultados y Discusión

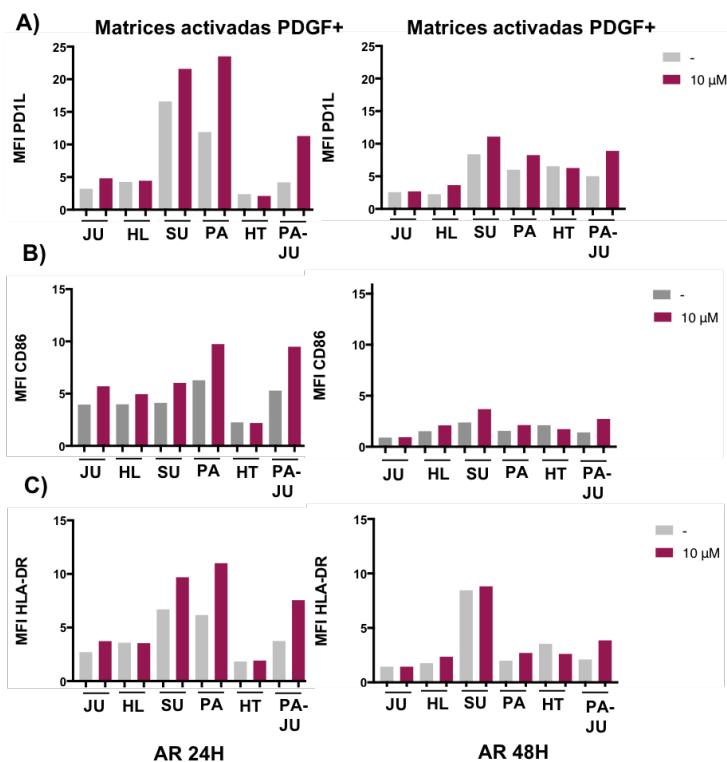


Figura 11. Análisis de expresión de marcadores mediante intensidad media de fluorescencia (MFI) en células cultivadas con AR en matrices tratadas con PDGF. Gráficas representando la intensidad media de fluorescencia obtenida por citometría de flujo. Se muestran los marcadores moleculares de CD86, PD1L y HLA-DR con tratamiento AR 10 µM durante 24 h o 48 h en matrices 3D extracelulares tratadas con PDGF 20 µM. Las células se corresponden en orden con dos líneas del sistema inmune (Jurkat -JU- y HL-60 -HL-), dos de adenocarcinoma pancreático (SUIT-2 -SU- y PANC-2 -PA-), una de adenocarcinoma colorrectal (HT-29 -HT-) y un cultivo doble con una línea linfoide y una tumoral (PANC-2 -PA- y Jurkat -JU-), cada una con su control sin tratamiento (-).

Respecto a las líneas tumorales a las 24 h, se describe un elevado incremento en las líneas pancreáticas de todos los marcadores estudiados, efecto que no se observa en la línea de colon, donde no detectamos ningún cambio en la expresión de marcadores de membrana y solo un ligero descenso en PD1L, CD86 y HLA-DR tras 48 h. Se observa además que, en células CD44+, en las líneas tumorales suele haber expresión de PD1L, aunque en el caso de HT-29, incrementa con el tiempo, pero se detecta un perfil contrario en las líneas inmunes siendo más visual en HL-60, independientemente de la cantidad de AR. Esto pasa igual, pero en mayor magnitud, a 24 h con células ICOSL+ con respecto a la expresión de PD1L, siguiendo el mismo patrón de CD44+ para todos los tipos celulares. En los cultivos combinados de línea tumoral y línea del SI, detectamos incrementos de expresión similares, aunque de menos intensidad que los detectados en las líneas tumorales en cultivo único con la matriz, indicando efectos cooperativos entre el conjunto de elementos de la matriz (Fig.12).

En general, en todas las líneas estudiadas se observan perfiles de respuesta parecidos, según sea el origen de estas. Así, las líneas inmunes responden igual con diferente magnitud a la adición de AR sobre matriz activada, y las líneas pancreáticas presentan también perfiles similares de expresión de marcadores, pero contrario en magnitud o totalmente opuestos a la línea HT-29 de colon. En los cultivos combinados, la respuesta predominante la marca la línea tumoral, pero se ve influenciada o favorecida

Resultados y Discusión

por la presencia de células inmunes. Además, en la mayoría de los casos se observa una disminución de la expresión de los marcadores de membrana en todos los tipos celulares a 48 h, tanto tratados con AR como sin tratar, posiblemente indicativo de que al cabo del tiempo disminuye expresión en las membranas. Únicamente se observa lo contrario en HT-29 en la expresión PD1L+CD44^{low}, que se ve incrementada a 48 h.

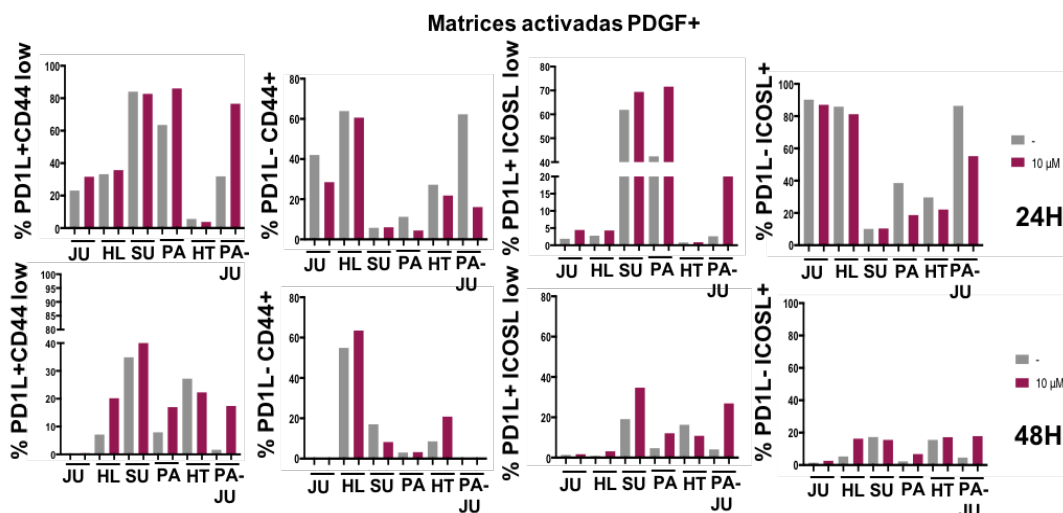
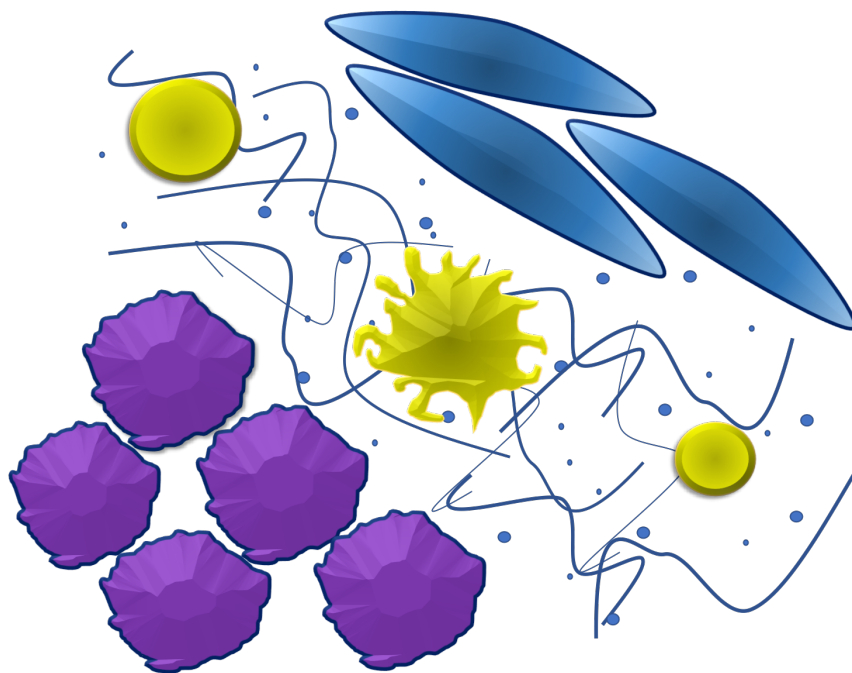


Figura 12. Medida de los porcentajes poblacionales de células cultivadas con AR en matrices tratadas con PDGF. Representación de la expresión de PD1L frente a la de CD44 e ICOSL. Porcentajes de células positivas y/o negativas para los respectivos marcadores con tratamiento AR 10 µM cultivadas en matrices tratadas con PDGF 20µM. Las células se corresponden en orden con dos líneas del sistema inmune (Jurkat -JU- y HL-60 -HL-), dos de PDAC (SUIT-2 -SU- y PANC-2 -PA-), y una de CRC (HT-29 -HT-) y un cultivo doble con una línea linfóide y una tumoral (PANC-2 -PA- y Jurkat -JU-), cada una con su control de células cultivadas sin tratamiento (-).

Por tanto, el microambiente puede condicionar la respuesta antitumoral que induce distintos elementos de control inmunológicos en líneas tumorales. El AR y la presencia de fibroblastos (BJ) activados fomentan la expresión de PD1L, CD86 y HLA-DR. Esto podría indicar un mejor tratamiento del cáncer, sobretodo en PDAC, por incrementar moléculas que se usan como dianas de tratamientos inmunoterapéuticos. Con respecto a las líneas inmunes, no se produce expresión combinada de varios marcadores de control inmunológico. Sin embargo, en el efecto final participan varios elementos que es necesario caracterizar en cada tejido.

CONCLUSIONES

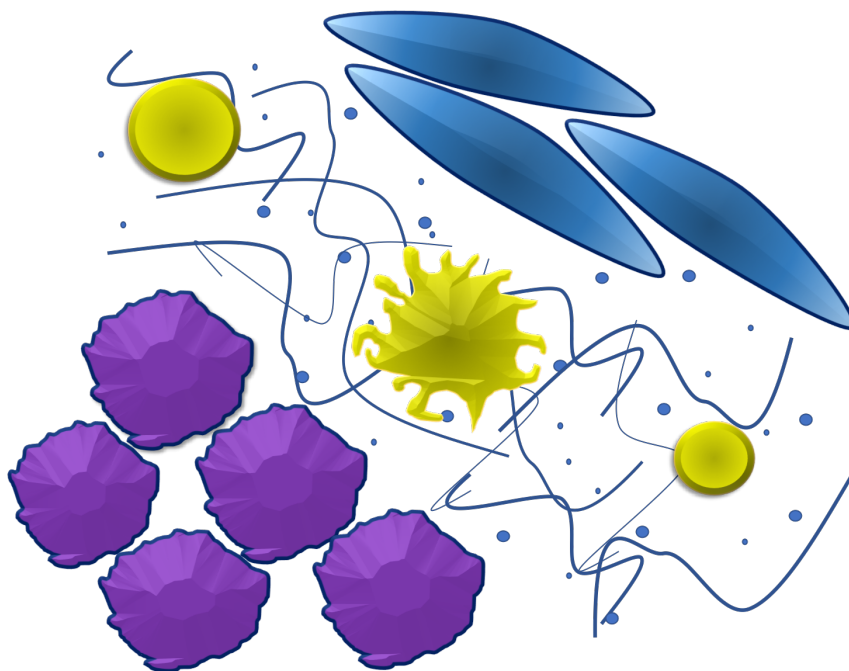


Conclusiones

- 1.- El aumento de los niveles plasmáticos del factor inmunosupresor TGF β confirma una regulación negativa del sistema inmune, observándose cierto re-establecimiento a niveles basales tras los primeros meses de tratamiento, en especial en pacientes con PDAC.
- 2.- En pacientes con CRC y PDAC, se produce un aumento de mDC en sangre periférica que se mantiene después de dos meses de tratamiento. Además, se observa un aumento en la expresión de PD1L en células mDC lo que convierte a este punto de control inmunitario en una potencial diana terapéutica para el tratamiento con inmunoterapia anti-PD1L.
- 3.- El AR liberado al espacio tumoral en matrices activadas, produce un incremento de PD1L y CD86, convirtiéndolas en potenciales dianas terapéuticas con inmunoterapia anti-PD1L y anti-CTLA-4, además de integrinas de migración como CD44, otra potencial diana que favorece la progresión tumoral y la metástasis.
- 4.- El AR produce una inhibición de la actividad celular en líneas tumorales colorrectales, mientras que en las pancreáticas genera activación a través de distintas vías de señalización produciendo apoptosis o bien proliferación, como resultado de la interacción entre diferentes elementos de la matriz extracelular pancreática aún no determinados.
- 5.- Los factores del microambiente que actúan sobre las células tumorales son clave en la progresión del cáncer, y como tales, necesitan ser bien caracterizados para el desarrollo de nuevas terapias que refuercen la respuesta antitumoral del sistema inmune.

- 1.- The increase in the plasma levels of immunosuppressive factor TGF β confirms a downregulation of the immune system, somehow restoring base levels after the first months of treatment, especially in patients with PDAC.
- 2.- Patients with CRC and PDAC show an increase of mDC in peripheral blood that is maintained after two months of treatment. They also show an increase in the expression of PD1L in mDC cells, which makes this immunecheckpoint a potential therapeutic target towards the treatment with anti-PD1L immunotherapy.
- 3.- The RA released into the tumor space in activated matrices produces an increase in PD1L and CD86 levels, turning them into potential therapeutic targets for anti-PD1L and anti-CTLA-4 immunotherapy, as well as in the levels of migration integrins such as CD44, another potential target that promotes tumor progression and metastasis.
- 4.- RA inhibits cellular activity in colorectal tumor lines, whereas in pancreatic lines it generates activation through different signaling pathways producing either apoptosis or proliferation, as a result of the interaction between different elements of the pancreatic extracellular matrix yet to be determined.
- 5.- The microenvironmental factors that act on the tumor cells are key for tumor progression and thus need to be well characterized for the development of new strategies to reinforce the anti-tumoral response of the immune system.

BIBLIOGRAFÍA



1. Akkoca, A.N., Yanik, S., Ozdemir, Z.T., Cihan, F.G., Sayar, S., *et al.* 2014. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* **7**: 2828-2835.
2. Bakdash, G., Vogelpoel, L.T., van Capel, T.M., Kapsenberg, M.L. y de Jong, E.C. 2014. Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells. *Mucosal Immunology* **8**: 265-278.
3. Ballinger, A.B. y Anggiansah, C. 2007. Colorectal cancer. *British Medical Journal* **335**: 715-718.
4. Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D.V.F., Iglesias, M., *et al.* 2012. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven programme in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer cell* **22**: 571-584.
5. Carrato, A., Hidalgo, M., Adeva, J., Alés, I., Álvarez, R., *et al.* 2017. Guía para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de páncreas. Luzán 5, Madrid.
6. Cassani, B., Villablanca, E.J., De Calisto, J., Wang, S. y Mora, J.R. 2012. Vitamin A and immune regulation: Role of retinoic acid in gut-associated dendritic cell education, immune protection and tolerance. *Molecular aspects of medicine* **33**: 63-76.
7. Castelló-Cros, R. y Cukierman, E. 2009. Stromagenesis during tumorigenesis: characterization of tumor-associated fibroblasts and stroma-derived 3D matrices. *Methods in molecular biology* **522**: 275-305.
8. Chen, D.S., Irving, B.A. y Hodi, F.S. 2012. Molecular Pathways: Next-Generation Immunotherapy—Inhibiting Programmed Death-Ligand 1 and Programmed Death-1. *Clinical Cancer Research* **18**: 6580-6587.
9. Connolly, R.M., Nguyen, N.K. y Sukumar, S. 2013. Molecular Pathways: Current Role and Future Directions of the Retinoic Acid Pathway in Cancer Prevention and Treatment. *Clinical Cancer Research* **19**: 1651-1659.
10. Crespo, J., Sun, H., Welling, T.H., Tian, Z. y Zou, W. 2013. T cell anergy, exhaustion, senescence and stemness in the tumor microenvironment. *Current opinion in immunology* **25**: 214-221.
11. Dai, X., Yamasaki, K., Shirakata, Y., Sayama, K. y Hashimoto, K. 2004. All-Trans-Retinoic Acid Induces Interleukin-8 via the Nuclear Factor- κ B and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Normal Human Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **123**: 1078-1085.
12. Dzutsev, A., Hogg, A., Sui, Y., Solaymani-Mohammadi, S., Yu, H., *et al.* 2017. Differential T cell homing to colon vs. small intestine is imprinted by local CD11c⁺ APCs that determine homing receptors. *Journal of Leukocyte Biology* **102**: 1381-1388.
13. Feng, T., Cong, Y., Qin, H., Benveniste, E.N. y Elson, C.O. 2010. Generation of Mucosal Dendritic Cells from Bone Marrow Reveals a Critical Role of Retinoic Acid. *Journal of immunology* **185**: 5915-5925.
14. Förster, R., Davalos-Misslitz, A.C. y Rot, A. 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology* **8**: 362-371.
15. Gomez-Rubio, P., Zock, J.P., Rava, M., Sharp, I., Higaldo, M., *et al.* 2017. Reduced risk of pancreatic cancer associated with asthma and nasal allergies. *Gut* **66**: 314-322.
16. Grover, S. y Syngal, S. 2010. Hereditary Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* **139**: 1076-1080.
17. Guerra-Pérez, N., Frank, I., Veglia, F., Aravantinou, M., Goode, D., *et al.* 2015. *Journal of immunology* **194**: 2415-2423.
18. Guntermann, C., Piaia, A., Hamel, M.L., Theil, D., Rubic-Schneider, T., *et al.* 2017. Retinoic-acid-orphan-receptor-C inhibition suppresses Th17 cells and induces thymic aberrations. *JCI Insight* **2**: e91127.
19. Guruvayoorappan, C., Pradeep, C.R. y Kuttan, G. 2008. 13-cis-Retinoic Acid Induces Apoptosis by Modulating Caspase-3, bcl-2, and p53 Gene Expression and Regulates the Activation of Transcription Factors in B16F-10 Melanoma Cells. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology* **27**: 197-207.
20. Herreros-Villanueva, M., Er, T.K. y Bujanda, L. 2015. Retinoic Acid Reduces Stem Cell-Like Features in Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas* **44**: 918-924.
21. Hidalgo, M., Álvarez, R., Gallego, J., Guillén-Ponce, C., Laquente, B., *et al.* 2017. Consensus guidelines for diagnosis, treatment and follow-up of patients with pancreatic cancer in Spain. *Clinical and Translational Oncology* **19**: 667-681.
22. Hosomi, K. y Kunisawa, J. 2017. The Specific Roles of Vitamins in the Regulation of Immunosurveillance and Maintenance of Immunologic Homeostasis in the Gut. *Immune Network* **17**: 13-19.
23. Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C. *et al.* 2004. Retinoic Acid Imprints Gut-Homing Specificity on T Cells. *Immunity* **21**: 527-538.
24. Jaensson, E., Uronen-Hansson, H., Pabst, O., Eksteen, B., Tian, J., *et al.* 2008. Small intestinal CD103(+) dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *The Journal of Experimental Medicine* **205**: 2139-2149.
25. Javie, M., Li, Y., Tan, D., Dong, X., Chang, P., *et al.* 2014. Biomarkers of TGF- β Signaling Pathway

and Prognosis of Pancreatic Cancer. *PLoS One* **9**: e85942.

26.Kropf, J., Schurek, J.O., Wollner, A. y Gressner, A.M. 1997. Immunological measurement of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) in blood; assay development and comparison. *Clinical Chemistry* **43**: 1965-1974.

27.MacDonald, T.T., Monteleone, I., Fantini, M.C. y Monteleone, G. 2011. Regulation of Homeostasis and Inflammation in the Intestine. *Gastroenterology* **140**: 1768-1775.

28.Masugi, Y., Nishihara, R., Yang, J., Mima, K., da Silva, A., et al. 2017. Tumour CD274 (PD-L1) expression and T cells in colorectal cancer. *Gut* **66**: 1463-1473.

29.Matsushita, K., Takenouchi, T., Shimada, H., Tomonaga, T., Hayashi, H., et al. 2006. Strong HLA-DR antigen expression on cancer cells relates to better prognosis of colorectal cancer patients: Possible involvement of c-myc suppression by interferon- γ in situ. *Cancer Science* **97**: 57-63.

30.Mocci, E., Guillen-Ponce, C., Earl, J., Marquez, M., Solera, J., et al. 2015. PanGen-Fam: Spanish registry of hereditary pancreatic cancer. *European Journal of Cancer* **51**: 1911-1917.

31.Mucida, D., Pino-Lagos, K. Kim, G., Nowak, E., Benson, M.J., et al. 2009. Retinoic Acid Can Directly Promote TGF- β -Mediated Foxp3(+) Treg Cell Conversion of Naive T Cells. *Immunity* **30**: 471-473.

32.Oeckinghaus, A. y Ghosh, S. 2009. The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **1**: a000034.

33.Pellegrini, C., Columbaro, M., Capanni, C., D'Apice, M.R., Cavallo, C., et al. 2015. All-trans retinoic acid and rapamycin normalize Hutchinson Gilford progeria fibroblast phenotype. *Oncotarget* **6**: 29914-29928.

34.Pratt, M.A.C. y Niu, M.Y. 2003. Bcl-2 Controls Caspase Activation Following a p53-dependent Cyclin D1-induced Death Signal. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 14219-14229.

35.Rajput, S. y Wilber, A. 2010. Roles of inflammation in cancer initiation, progression, and metastasis. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* **2**: 176-183.

36.Safont, M. J. y Gil, M. 2017. Primera línea de tratamiento del cáncer colorrectal metastásico, *Revisiones en Cáncer* **31**: 122-130.

37.Scott, C.L., Aumeunier, A.M. y Mowat, A.M. 2011. Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance?. *Trends in Immunology* **32**: 412-419.

38.Tambe, N.A., Wilkens, L.R., Wan, P., Stram, D.O., Gilliland, F., et al. 2015. Atopic Allergic Conditions and Colorectal Cancer Risk in the Multiethnic Cohort Study. *American Journal of Epidemiology* **181**: 889-897.

39.Vignali, D.A., Collison, L.W. y Workman, C.J. 2008. How regulatory T cells work. *Nature reviews Immunology* **8**: 523-532.

40.Wang, C., Kang, S.G., HogenEsch, H., Love, P.E. y Kim, C.H. 2010. Retinoic Acid Determines the Precise Tissue Tropism of Inflammatory Th17 Cells in the Intestine. *The Journal of Immunology* **184**: 5519-5526.

41.Wang, Y., Thakur, A., Sun, Y., Wu, J., Biliran, H., et al. 2007. Synergistic Effect of Cyclin D1 and c-Myc Leads to More Aggressive and Invasive Mammary Tumors in Severe Combined Immunodeficient Mice. *Cancer Research* **67**: 3698.

42.Xu, M., Pokrovskii, M., Ding, Y., Yi, R., Au, C., et al. 2018. c-MAF-dependent regulatory T cells mediate immunological tolerance to a gut pathobiont. *Nature* **554**: 373-377.

43.Qiang, Y., Xu, J., Yan, C., Jin, H., Xiao, T., et al. 2017. Butyrate and retinoic acid imprint mucosal-like dendritic cell development synergistically from bone marrow cells. *Clinical & Experimental Immunology* **189**: 290-297.

44.Zhang, L., Yan, Y., Zhu, D., Yang, W., Wang, W., et al. 2012. Nutlin-1 strengthened anti-proliferation and differentiation-inducing activity of ATRA in ATRA-treated p-glycoprotein deregulated human myelocytic leukemia cells. *Investigational New Drugs* **30**: 37-47.

45.Zhang, Y., Luo, Y., Qin, S.L., Mu, Y.F., Qi, Y., et al. 2016. The clinical impact of ICOS signal in colorectal cancer patients. *Oncoimmunology* **5**: e1141857.

46.Zhu, J., Yamane, H. y Paul, W. E. 2010. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual review of immunology* **28**: 445-489.