

## **PROYECTO DE FIN DE GRADO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD**  
GRADO EN BIOMEDICINA

**Evaluación del impacto de la sobreexpresión del gen *OX40L* en líneas celulares murinas de cáncer de pulmón no microcítico.**

Autora: Carla Navarro López

Villaviciosa de Odón, 23 de mayo  
de 2025.

**Título del trabajo:** Evaluación del impacto de la sobreexpresión del gen *OX40L* en líneas celulares murinas de cáncer de pulmón no microcítico.

El presente Trabajo de fin de Grado (TFG) se ha desarrollado dentro del proyecto "*Local upregulation of tumor cell OX40L using intratumoral delivery of exogenous OX40L mRNA as a candidate therapeutic intervention to increase the efficacy of PD-1 axis blockade in NSCLC*" financiado por Fundación Fero en el grupo de investigación denominado "Microambiente tumoral e Inmunoterapia". Dicho equipo se encuentra en el seno del grupo de Oncología Torácica y Clínico Traslacional del Instituto de Investigación Hospital 12 de octubre (i+12), siendo líder el oncólogo clínico-investigador llamado Dr. Zugazagoitia.



**Tutor académico:** Dra. Beatriz Martín Sánchez (Facultad de Ciencias Biomédicas y de la Salud, UEM).

**Tutores profesionales:** Dr. Zugazagoitia (Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid) y Dra. Estela Sánchez Herrero (Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid).

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>6</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>11</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
<b>6. DISCUSIÓN Y ENFOQUE ODS SOSTENIBILIDAD.....</b>	<b>23</b>
<b>6.1 Discusión.....</b>	<b>23</b>
<b>6.2 Enfoque ODS/ Sostenibilidad.....</b>	<b>26</b>
<b>7. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....</b>	<b>26</b>
<b>7.1 Conclusiones .....</b>	<b>26</b>
<b>7.2 Proyección futura .....</b>	<b>27</b>
<b>8. AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>28</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>29</b>

## ABREVIATURAS

TFG= Trabajo de Fin de Grado  
CPCNP = cáncer de pulmón de células no pequeñas  
CPCP= cáncer de pulmón de células pequeñas  
LUAD= adenocarcinoma de pulmón  
LUSC= carcinoma de células escamosas  
TME= microambiente tumoral  
PD-LI =ligando de muerte programada 1  
CTLA-A= antígeno 4 del linfocito T citotóxico  
LAG-3= gen de activación de linfocitos-3  
bsAb= anticuerpos biespecíficos  
TILs= linfocitos infiltrantes de tumores  
ICP= inhibidores de los puntos de control inmunes  
PBS= tampón fosfato salino  
BSA= tampón de bloqueo de albúmina de suero bovino  
EDTA= ácido etilendiaminotetraacético  
MEM= medio esencial mínimo  
RPMI = medio del instituto Roswell Park  
DMEM= medio Eagle modificado de Dulbecco  
FBS= suero de ternera fetal bovino  
NAA=aminoácidos no esenciales  
DSP= tecnología de segmentación de perfiles espaciales digitales  
Tregs= células T reguladoras  
DC= células dentríticas  
NK= célula natural killer  
TNF= factor necrosis tumoral  
TGF- $\beta$  = factor de crecimiento transformante beta  
SLP= supervivencia libre de progresión  
LLC= Lewis Lung Carcinoma  
PFA= paraformaldehído  
DCIS= carcinoma ductal *in situ*  
IDCa = carcinoma ductal invasivo

## RESUMEN

Una de las principales causas de mortalidad oncológica a nivel mundial es el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCNP). En los últimos años, la inmunoterapia se ha posicionado como punto estratégico en el tratamiento de esta patología debido a la limitada eficacia de las terapias tradicionales y aparición de resistencias. En este contexto, OX40L, perteneciente a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), ha sido reconocido como alternativa prometedora. Sin embargo, su localización espacial y su papel inmunomodulador aún no están caracterizados. Por ello, este estudio valora su papel *in vitro* tras la sobreexpresión del gen *OX40L* en tres líneas celulares murinas de CPCNP (KLN205, Lacun3 y LLC) en procesos de proliferación, migración e invasión celular. Los resultados obtenidos demostraron que OX40L desempeña un rol dual: puede estimular la migración del tumor y, simultáneamente, ser restrictivo en la diseminación metastásica. Esta dualidad funcional destaca la relevancia de utilizar modelos que sean competentes en el sistema inmunológico, considerando el microambiente tumoral, y la exigencia de realizar análisis moleculares de alta resolución para identificar su actividad biológica en el marco de CPCNP.

**Palabras clave:** OX40L, cáncer de pulmón no microcítico, inmunoterapia, proliferación, migración, invasión.

## ABSTRACT

Non-small cell lung cancer (NSCLC) represents one of the primary causes of cancer related deaths globally. In recent years, immunotherapy has gained prominence as a therapeutic strategy for this malignancy, largely due to the limited success of conventional treatments and the development of resistance mechanisms. Within this scenario, OX40L, a member of the TNF ligand superfamily, has been identified as a potentially valuable therapeutic target. Nevertheless, its tissue distribution and immunomodulatory functions remain insufficiently elucidated. This research explores its *in vitro* role by overexpressing the *OX40L* gene in three murine NSCLC cell lines (KLN205, Lacun3, and LLC), evaluating its influence on cell proliferation, migration, and invasion. The results revealed that OX40L exhibits a bifunctional role: it may enhance tumor migration while concurrently limiting metastatic spread. This functional

ambivalence underscores the relevance of employing immunocompetent experimental models that integrate the tumor microenvironment and emphasizes the necessity of conducting high-resolution molecular analyses to better understand its biological role in NSCLC.

**Keywords:** OX40L, non-small cell lung cancer, immunotherapy, proliferation, migration, invasion.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, representando aproximadamente 1,76 millones de fallecimientos anuales, lo que supone un desafío sanitario global. La alta recurrencia y el pobre pronóstico asociado, - especialmente en pacientes con metástasis, donde la tasa de supervivencia a 5 años es de apenas el 4% -, han incrementado la carga global, y por ello, es crucial buscar una transformación en los enfoques de tratamiento y diagnóstico (Lahiri *et al.*, 2023; Thai *et al.*, 2021).

Esta patología oncológica se clasifica de manera histológica en dos tipos: cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) o microcítico y cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) o no microcítico, representando este último el 80-85% de los casos (Zugazagoitia & Paz-Ares *et al.*, 2022).

Dentro del CPCNP, se encuentran tres subtipos:

1. Adenocarcinoma de pulmón (LUAD): es el más común y se origina en las células glandulares alveolares y suele aparecer en regiones periféricas del pulmón, representando el 40% de los casos. No obstante, evoluciona lentamente facilitando su detección temprana (Lahiri *et al.*, 2023).
2. Carcinoma de células escamosas (LUSC): afecta al 25-30% de los casos y se genera en células basales traqueobronquiales (Lahiri *et al.*, 2023).
3. Carcinoma de células grandes: constituye el 5-10% de los casos, carece de diferenciación escamosa o glandular y suele metastatizar de manera muy rápida (Lahiri *et al.*, 2023).

El tratamiento tanto del CPCP como del CPCNP está basado en el estadio, así como en la presencia de las alteraciones genéticas y en la expresión de ligando de muerte programada 1 (PD-L1) (Zugazagoitia & Paz-Ares *et al.*, 2022). En el caso del CPCNP, la primera línea terapéutica incluye el uso de terapias dirigidas si se identifican mutaciones tratables, así como la resección quirúrgica cuando esta es viable. Si no se detectan dichas mutaciones, pero la expresión de PD-L1 es  $\geq 50\%$ , se aboga por la inmunoterapia como tratamiento inicial (Reck *et al.*, 2019). En ausencia de expresión elevada de PD-L1, se emplea quimioterapia basada en compuestos de platino, sola o en combinación con inmunoterapia.

En cuanto al tratamiento de segunda línea, se inicia inmunoterapia si no se utilizó previamente. En los casos de progresión tras una terapia dirigida, se considera el cambio a otra terapia focalizada o quimioterapia basada en platino. Cuando no existen opciones de tratamiento dirigido ni indicación para inmunoterapia, se recurre a esquemas de quimioterapia con agentes variados (Li *et al.*, 2023).

La introducción de inhibidores de PD-1 en estadios avanzados ha demostrado un aumento significativo en la supervivencia global de los pacientes (Zugazagoitia & Paz-Ares *et al.*, 2022). Además, tanto la quimioterapia como la radioterapia son terapias convencionales con una eficacia limitada debido a su carácter inespecífico y al desarrollo de resistencia tras su uso prolongado (Li *et al.*, 2023).

La eficacia de cualquier tratamiento depende en gran medida de la respuesta antitumoral del sistema inmunológico. Sin embargo, las células tumorales presentan baja antigenicidad por su origen autólogo, lo que dificulta el reconocimiento inmunitario de antígenos asociados a tumores y neoantígenos en los estadios iniciales. Asimismo, las células malignas logran el escape inmunológico debido a mecanismos intrínsecos, como la ausencia o baja expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y moléculas coestimuladoras, así como empleando otros procesos internos tales como la regulación negativa de expresión de antígenos tumorales y la alteración del microambiente tumoral (TME), incluyendo células supresoras como macrófagos asociados a tumores o células T reguladoras (Tregs). Estos procesos contribuyen al agotamiento linfocitario manifestando la expresión de moléculas inhibitorias como el

antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), el gen de activación de linfocitos-3 (LAG-3) o PD-1, entre otros. Esta expresión inhibitoria conduce a la reducción de la liberación de citoquinas proinflamatorias y al establecimiento de un estado refractario a la reactivación (Rui *et al.*, 2023).

Ante la necesidad de posicionar a las células del sistema inmunológico como fundamento principal en las estrategias terapéuticas, surgió la inmunoterapia. En las últimas décadas, su uso ha mejorado la supervivencia y calidad de vida de los pacientes (Domnariu *et al.*, 2021). Una de las aproximaciones más destacadas es el uso de inhibidores de puntos de control inmune (ICP), como CTLA-4 y PD-1/PD-L1. Los inhibidores de CTLA-4 activan las células T en etapas tempranas, mientras que los de PD-1/PD-L1 reactivan la respuesta inmune en fases más avanzadas (Oosting *et al.*, 2022).

Sin embargo, el uso individual de estos inhibidores genera resistencia intrínseca, alterando el reconocimiento inmunitario, la señalización celular y la respuesta a daño en el ADN. De igual modo, se promueve la resistencia extrínseca asociada al TME donde la pérdida de homeostasis entre mediadores proinflamatorios e inmunosupresores favorece la infiltración de células inmunosupresoras. Por esta razón, se ha optado por un enfoque sinérgico, bloqueando simultáneamente ambas vías inhibitorias para potenciar la eficacia terapéutica. No obstante, esta estrategia conlleva eventos adversos inmunomediados. En este contexto, los anticuerpos biespecíficos (bsAb) han emergido como una alternativa terapéutica prometedora al dirigirse simultáneamente a dos epítomos diferentes, permitiendo modular el TME, revertir la inmunosupresión y reducir los efectos adversos. Un ejemplo es cadonilimab (AK104), un bsAb dirigido frente a CTLA-4 y PD-1, que bloquea sus respectivas interacciones y posee una mayor afinidad por linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) presentes en el TME. En un estudio multicéntrico en pacientes con CPCP que no respondieron a la primera línea de tratamiento, cadonilimab, solo o combinado con quimioterapia, logró mejorar la supervivencia global (Chen *et al.*, 2024).

La aplicación de la inmunoterapia en la primera línea muestra evidencia de efectividad, pero su empleo en la segunda línea sigue siendo muy limitada, ya que la heterogeneidad intratumoral compromete la eficacia de los tratamientos. La tecnología de

segmentación de perfiles espaciales digitales (DSP) es capaz de analizar diferencias tanto proteómicas como transcriptómicas entre regiones tumorales y estromales, consiguiendo predecir la respuesta a inmunoterapia y explorar nuevas vías implicadas en la resistencia a esta a través de firmas moleculares. Concretamente, en un estudio realizado en pacientes con CPCNP tratados con KN046, bsAb específico contra CTLA-4 y PDL-1, se identificó una firma estromal con alto poder predictivo para estudiar la respuesta a inmunoterapia (AUC=0.838). Dicho avance es clave para mejorar el diseño de los ICP ya existentes y descubrir nuevas dianas terapéuticas, permitiendo así una medicina personalizada basada en evidencia molecular (Cheng *et al.*, 2024).

Otra terapia emergente son las vacunas, que permiten generar una respuesta inmune específica mediante la introducción de antígenos tumorales. Aunque algunas han mostrado resultados prometedores en etapas tempranas, la mayoría no han logrado mejorar la supervivencia de los pacientes en fases clínicas avanzadas (Lahiri *et al.*, 2023), en parte por la limitada infiltración tumoral y la aparición de resistencias. Una posible alternativa son las vacunas multiepitópicas, siempre que se conozcan los mecanismos de evasión inmunitaria. Entre las más destacadas se encuentra CIMAvax-EGF, una vacuna peptídica aprobada en varios países para el CPCNP y que induce una respuesta inmune contra el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Neninger Vinageras *et al.*, 2008). Existen también vacunas vectoriales como TG4010 que expresa MUC1 e interleucina 2, mostrando respuesta radiológica en el 29,5% de pacientes con CPCNP (Rochlitz *et al.*, 2003), actualmente en estudio combinado con nivolumab. Otra estrategia, es la administración intratumoral de vacunas basadas en células dendríticas (DC) modificadas con el gen *CCL21*, que ha demostrado una activación robusta de las células T CD8+ en CPCNP avanzado. Su combinación con pembrolizumab se encuentra en ensayo de fase I, con resultados alentadores en modelos murinos resistentes a anti-PD-1 (Lahiri *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2017). Sin embargo, la vida corta de las DC y su complejidad limitan su aplicación, siendo necesario profundizar acerca de su optimización. Por último, las vacunas alogénicas y de ADN, no han logrado resultados concluyentes en pacientes con CPCNP, debido en cierta medida a la heterogeneidad mutacional (Lahiri *et al.*, 2023).

La inmunoterapia ha identificado nuevas moléculas coestimuladoras que podrían potenciar la respuesta inmune antitumoral. Entre ellas destaca OX40 (TNFRSF4/CD134),

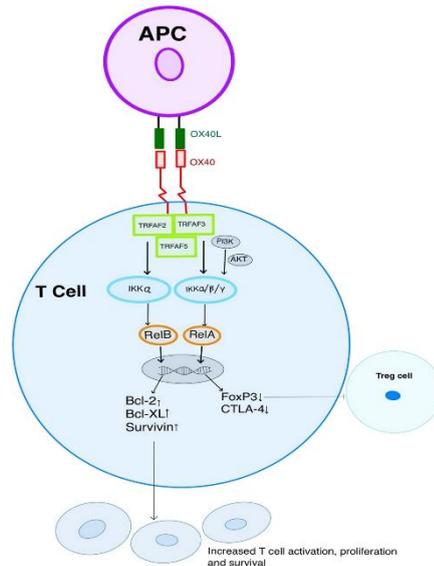
una glucoproteína transmembrana tipo 1 perteneciente a la superfamilia del factor necrosis tumoral (TNF), y su ligando OX40L (TNFSF4/CD252), una glucoproteína transmembrana tipo II expresada como trímero y con estructura similar a otras moléculas de la superfamilia TNF. Ambas juegan un papel crucial en la inmunorregulación. OX40 se expresa principalmente en células T activadas, tanto efectoras como reguladoras, y potencia señales de activación como CD28, IL-2 y su receptor (IL-2R) (Weinberg *et al.*, 2010). Asimismo, se encuentra en células natural killer (NK), macrófagos, neutrófilos, mastocitos y células B. Esta proteína interacciona con OX40L, presente en las células presentadoras de antígeno, activa vías de señalización clave, como NF- $\kappa$ B y PI3K/Akt, promoviendo la expresión de genes antiapoptóticos (como Bcl-2) y favoreciendo la supervivencia, proliferación y función citotóxica de células T. Además, tiene efectos en la producción de citoquinas y con ello, poder sobre la diferenciación de las células T CD4+ hacia Th1, Th2 o Th17. Asimismo, favorece la formación de linfocitos de memoria, fortaleciendo una respuesta adaptativa duradera (Thapa *et al.*, 2024).

No obstante, el efecto inmunorregulador de OX40 varía en función del contexto inmunológico. En el CPCNP, donde las mutaciones en *KRAS* de son frecuentes, la activación de OX40 podría potenciar la eficacia de los inhibidores de MEK, como se ha observado en cáncer de mama triple negativo. Estudios *in vitro* e *in vivo*, muestran que el uso de agonistas de OX40 puede modular la función de Tregs de forma contexto-dependiente. En un TME favorable, esta activación reduce la expresión de FOXP3 a través de vías como AKT-mTOR, disminuyendo la función inmunosupresora de las células Tregs frente células T efectoras, DC y células NK. Esto se asocia con una reducción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), interfiriendo en la diferenciación a Tregs, y promoviendo un aumento en la producción de IL-6, IL-4 e IFN- $\gamma$ , citocinas que fortalecen la respuesta efectora por parte de las células T (Thapa *et al.*, 2024) (Figura 1).

Sin embargo, en ausencia de un entorno de citocínico favorable, OX40 puede promover la supervivencia, expansión y diferenciación de Tregs. En modelos murinos, el bloqueo de IFN- $\gamma$  e IL-4 eliminó el efecto inhibitor de OX40 sobre FOXP3. Además, la activación de OX40 puede inducir la producción de IL-2 por células T CD4+, un factor esencial para la expansión de Tregs, contrarrestando parcialmente la inhibición de su

función reguladora. (Thapa *et al.*, 2024).

Este comportamiento dinámico refleja el objetivo del sistema inmunitario de preservar la homeostasis, regulando el equilibrio entre las células T efectoras y Tregs, fundamental para una respuesta antitumoral eficaz (Thapa *et al.*, 2024).



**Figura 1: Interacción OX40/OX40L y su señalización resultante, promoviendo supervivencia de los linfocitos T efectoras y disminución de la inmunosupresión tumoral al inhibir la función de Tregs.**

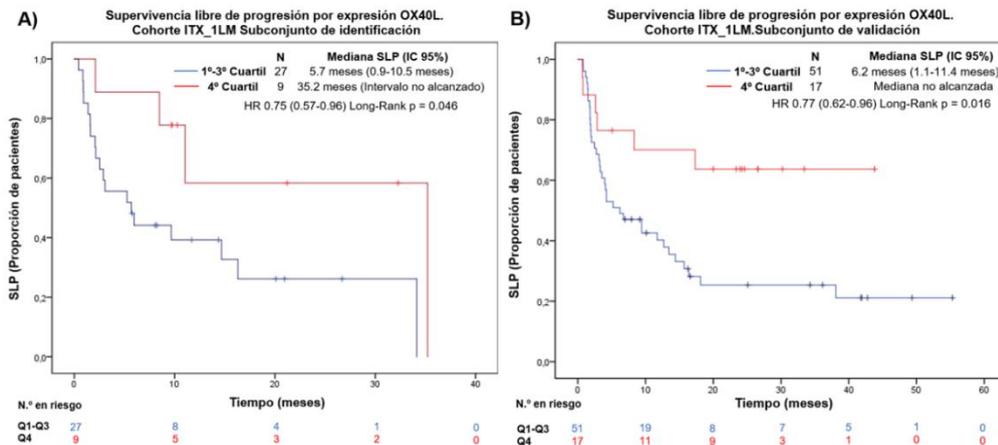
## 2. MARCO TEÓRICO

En este contexto, OX40L se ha identificado como potencial terapéutico, llevando al desarrollo de una vacuna de ARNm encapsulada en nanopartículas lipídicas con resultados prometedores en carcinoma hepatocelular. Se administró vía intratumoral en modelos murinos, demostrando una disminución del volumen tumoral con un perfil de seguridad favorable (Deng *et al.*, 2022).

El primer ensayo clínico de fase I en humanos con agonistas de OX40 se llevó a cabo con MOXR0916, anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado, en pacientes con tumores sólidos avanzados con el objetivo de estimular células inmunitarias agotadas. El tratamiento logró estabilizar la enfermedad en el 33% de los pacientes, con un perfil de toxicidad aceptable. Sin embargo, su aplicación clínica presenta desafíos. Por un lado, MOXR0916 podría eliminar Tregs mediante citotoxicidad celular dependiente de

anticuerpos; por otro, podría aumentar su número al estimular la liberación de IL-2, generando efectos opuestos (Kim *et al.*, 2022). Además, la combinación de agonistas de Dectin-1 y OX40, podría favorecer la activación de DC al desencadenar un aumento de IL-9 y la diferenciación de células T hacia el subtipo Th9, lo que incrementaría la respuesta citotóxica antitumoral (Thapa *et al.*, 2024).

En un estudio previo realizado en el laboratorio (Baena Espinar, 2024), se buscó identificar y validar biomarcadores de respuesta y resistencia a la inmunoterapia anti-PD-1 en pacientes con CPCNP tratados con pembrolizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1. Para ello, se analizaron 144 muestras tumorales fijadas en parafina (cohorte ITX\_1LM) utilizando la tecnología GeoMx® DSP, que permite cuantificar 36 proteínas relacionadas con la respuesta inmune, diferenciando entre los compartimentos tumoral e inmune gracias a su alta resolución espacial. Los resultados revelaron que la expresión de OX40L en el compartimento tumoral se asocia de forma robusta con una mayor supervivencia libre de progresión (SLP), independientemente de los niveles de expresión de PD-L1 (Figura 2). Además, este hallazgo fue validado en tres cohortes externas de pacientes con CPCNP, consolidando a OX40L, particularmente en el compartimento tumoral, como un biomarcador pronóstico favorable y una posible nueva diana terapéutica subsidiaria a estrategias actuales.



**Figura 2: Supervivencia libre de progresión de la cohorte ITX\_1LM de pacientes con CPCNP en función de la expresión de OX40L por subconjuntos. A) Subconjunto de identificación. B) Subconjunto de validación.** Las curvas de SLP fueron calculadas mediante el método Kaplan- Meier dependiendo de la expresión de OX40L (3er cuartil como punto de corte). Los pacientes se agruparon considerando la expresión de OX40L en dos grupos: nivel bajo (1-3er cuartil, visible en azul) y en nivel alto (4°, observable en rojo). Se representa la mediana de supervivencia, al igual que los pacientes vivos en cada marca temporal (Baena Espinar, 2024).

El efecto directo de la expresión de OX40L en células tumorales no ha sido caracterizado con precisión. Por ello, el presente estudio plantea evaluar si la sobreexpresión de OX40L en líneas celulares murinas de CPCNP modifica funciones clave del comportamiento celular en ensayos *in vitro*, contribuyendo a un fenotipo menos agresivo con relación al aumento de supervivencia observada.

### 3. OBJETIVOS

El objetivo general es evaluar el impacto de la sobreexpresión del gen *OX40L* en líneas celulares de CPCNP de origen murino.

Los objetivos específicos son:

- Caracterización funcional de las líneas con y sin sobreexpresión del gen *OX40L*.
  - Determinar la capacidad proliferativa, con el fin de averiguar si dicha proteína influye en el crecimiento *in vitro*.
  - Analizar la capacidad migratoria de células y, por tanto, determinar la influencia en el comportamiento motil de las células tumorales, valorando su implicación en la progresión tumoral y diseminación metastásica.
  - Estudiar el potencial invasivo y con ello, estudiar la capacidad de las células tumorales para atravesar estructuras similares a las del entorno tumoral *in vivo* en presencia de OX40L.

### 4. MATERIAL Y MÉTODOS

#### *Diseño experimental*

Se emplearon tres líneas celulares de CPCNP de origen murino: KLN205, Lacun3 y Lewis Lung Carcinoma (LLC). La línea KLN205 es una línea de cáncer de pulmón que muestra características de un LUSC originado a partir de un tumor espontáneo en un ratón DBA/2. La línea Lacun3 es derivada de un LUAD. Por último, la línea LLC se originó a partir de un LUAD espontáneo en un ratón C57BL/6 (Tabla 1).

Cada línea celular fue cultivada y mantenida con un medio concreto: KLN205 con medio esencial mínimo (MEM; Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU) suplementado con aminoácidos no esenciales (NAA; Thermo Fisher Scientific, NY, EE. UU) + 10% de

suero de ternera fetal bovino (FBS; Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU). Lacun3 con medio del instituto Roswell Park (RPMI) GlutaMAX™ (ThermoFisher Scientific, NY, EE. UU) + 10% de FBS, y LLC con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Merck, Alemania) + 10% de FBS. Además, esta línea es la única en presentar un patrón de crecimiento mixto (adherente y en suspensión), ya que las otras dos líneas restantes crecen de manera adherente (Tabla 1).

Línea celular	Origen	Clasificación histopatológica	Crecimiento	Medio
KLN205	Tumor pulmonar en DBA/2	LUSC	Adherentes	MEM + NAA + 10% FBS
Lacun3	Tumor humano (CPCNP)	LUAD diferenciado	Adherentes	RPMI GlutaMAX™ + 10% FBS
LLC	Tumor pulmonar en C57BL/6	LUAD indiferenciado	Adherentes/En suspensión	DMEM + 10% FBS

Tabla 1. Características de las líneas celulares empleadas y las condiciones de cultivo.

De manera previa al presente trabajo, en el laboratorio se llevó a cabo la producción de lentivirus en células empaquetadoras HEK293T a través de lipofección con el kit Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen, CA, EE. UU). Los plásmidos empleados fueron: pReceiver-LV156 (con o sin el gen de interés *OX40L*), pMD2g (genes de envoltura viral) y psPAX2 (genes de replicación viral). Como resultado, se generaron dos tipos de lentivirus:

- LV156 OX40L, contiene gen *OX40L* además de un gen de resistencia a puromicina.
- LV156 ExNeg, como control negativo, únicamente con el gen de resistencia a puromicina.

Tras la producción viral, se realizó la transducción de las tres líneas celulares mencionadas. Para seleccionar únicamente las células que habían sido transducidas, se llevó a cabo un tratamiento con puromicina, garantizando así la obtención de las poblaciones celulares estables con y sin presencia del gen *OX40L* en el vector. Por último, la expresión del gen *OX40L* se confirmó mediante citometría de flujo (ver siguiente apartado).

### ***Citometría de flujo***

La expresión del gen *OX40L* se evaluó mediante citometría de flujo en las líneas celulares KLN205, Lacun3 y LLC, tanto en las OX40L como en las ExNeg. Además, para establecer los niveles de autofluorescencia, se incluyeron tres controles *unstained*, uno por cada línea celular. En primera instancia, las células fueron lavadas con 1 ml de tampón fosfato salino (PBS; Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU) y se centrifugaron durante 5 minutos a 400g. Tras la aspiración del sobrenadante, las células se resuspendieron en 100  $\mu$ L de una mezcla de bloqueo constituida por 90% de PBS con tampón de bloqueo de albúmina de suero bovino (BSA; Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU) al 1%, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU) 2M y 10% Mouse Fc Blocking Reagent (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU) con el fin de bloquear los receptores Fc y evitar uniones inespecíficas. Las muestras se incubaron a 4°C durante 10 minutos. A continuación, se preparó el anticuerpo contra OX40L (clon RM134L, PE, eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU) a partir de una titulación previamente calculada (1  $\mu$ L/muestra), diluido en PBS con BSA al 1%, EDTA 2M. Por cada muestra, se añadieron 100  $\mu$ L del anticuerpo diluido o de PBS con BSA al 1%, EDTA 2M (*unstained*). Seguidamente, se incubaron 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Tras la incubación, se lavó con 1 ml de PBS y se centrifugaron durante 5 minutos a 400g. Tras eliminar el sobrenadante, las muestras fueron resuspendidas en 300  $\mu$ L de DAPI (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU) diluido 1:3000 en PBS con BSA al 1%, EDTA 2M para las muestras teñidas o 300  $\mu$ L de PBS con BSA al 1%, EDTA 2M para los controles (*unstained*). Por último, 300  $\mu$ L de cada muestra fueron transferidas a tubos FACS sin filtrar, y se mantuvieron en oscuridad hasta su lectura en el citómetro de flujo DxFLEX Flow (Beckman Coulter Life Sciences, IN, EE. UU). El análisis fue llevado a cabo en el programa FlowJo\_V10 (BD Life Sciences, OR, EE. UU).

### ***Ensayo de proliferación MTT***

Para evaluar si la sobreexpresión de *OX40L* podía afectar a la capacidad proliferativa de las líneas celulares *in vitro*, se realizó el ensayo de MTT, empleando el kit de ensayo de viabilidad celular CyQUANT™ MTT (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU), analizando el crecimiento celular a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. El ensayo MTT

es una técnica colorimétrica basada en la capacidad de las enzimas mitocondriales activas en reducir el reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) con color amarillo en formazán, visible en morado. El experimento se llevó a cabo en 5 placas de 96 pocillos, una para cada día, en las cuales se sembraron 10.000 células por pocillo en 100  $\mu$ L del medio adecuado para cada línea, teniendo 5 réplicas por condición (OX40L y ExNeg) de cada línea celular. La placa correspondiente a cada día se centrifugó durante 5 minutos a 400g y se eliminó el medio. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ L de RPMI 1640 sin rojo de fenol (Thermo Fisher Scientific, NY, EE. UU) y 10  $\mu$ L del reactivo MTT por pocillo, a una concentración final de 0,5 mg/ml. Se incubó durante dos horas y media a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Tras ello, se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 400g, se quitaron 80  $\mu$ L de medio y se añadieron 50  $\mu$ L por pocillo de dimetilsulfóxido (DMSO). Por último, se incubó durante 10 minutos a 37 °C y se analizó mediante un espectrofotómetro (VICTOR Nivo™; PerkinElmer, MA, EE. UU) a una absorbancia de 540 nm. Los resultados se analizaron con el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, CA, EE. UU).

### ***Ensayo de herida***

Para analizar si la sobreexpresión de *OX40L* afecta a la capacidad migratoria de las células *in vitro*, se llevó a cabo un ensayo de herida. Para ello, se sembraron 400.000 células por pocillo (confluencia  $\approx$  90%) en placas de 12 pocillos de las tres líneas celulares mencionadas bajo las dos condiciones experimentales (OX40L y ExNeg), realizándose por triplicado cada condición de cada línea. A las 24 horas, con las células en una confluencia  $\approx$  100% se generó la herida usando una punta de pipeta de 200  $\mu$ L. Seguidamente, se cambió el medio para eliminar las células despegadas y se realizaron fotos de las placas en el microscopio Zeiss™ Axio Vert.A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemania) con contraste de fases (objetivo 10x), desde las 0 hasta las 56 horas. Por último, las imágenes fueron analizadas usando el plugin *Wound\_healing\_size\_tool* a través del software Image J (National Institutes of Health – NIH, MD, EE. UU).

### ***Ensayo de transwell Matrigel.***

Con el propósito de determinar si la sobreexpresión del gen *OX40L* influye en la capacidad invasiva de las células en condiciones *in vitro*, se efectuó un ensayo de *transwell* con Matrigel® (Corning Inc., NY, EE. UU) para evaluar la capacitación de las células para atravesar una barrera similar a la matriz extracelular. Cada condición experimental (OX40L y ExNeg) para cada línea celular se realizó por duplicado. En primer lugar, el Matrigel se descongeló en hielo y fue diluido 1:3 en RPMI sin FBS. A continuación, en una placa *Transwell* (Corning Inc., NY, EE. UU) de p24, se añadieron 100 µL de la mezcla en el centro del inserto correspondiente a cada pocillo. Para permitir la gelificación del Matrigel, la placa se incubó a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, se sembraron 500.000 células por inserto, resuspendidas en un volumen de 200 µL del medio correspondiente sin FBS. En la parte inferior de cada cámara, se añadieron 550 µL del medio correspondiente con FBS al 10%, actuando este como quimioatrayente. La placa se incubó 48h para permitir la migración celular hacia el compartimento inferior.

Posteriormente, se descartó el medio de la parte superior de la cámara y las células no invasoras se eliminaron suavemente con el uso de un hisopo humedecido con PBS. La cara inferior de la membrana fue lavada con PBS, y las células invasoras se fijaron con 200 µL de paraformaldehído (PFA; Electron Microscopy Sciences, PA, EE. UU) al 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Se retiró el PFA restante y se realizaron 3 lavados con PBS. Para la tinción, se depositaron 600 µL de cristal violeta al 0.1% en cada pocillo de una nueva placa de p24. Seguidamente, se introdujo cada inserto en cada uno de los pocillos y se realizó una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el exceso de colorante y se realizaron 3 lavados con PBS para su eliminación completa. Los insertos se dejaron secar entre 15-30 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 200 µL de etanol al 100% en el centro de cada inserto. La placa se incubó durante 10-15 minutos con agitación suave a temperatura ambiente, consiguiendo solubilizar el tinte absorbido por parte de las células fijadas. Por último, el contenido eluido se transfirió a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 570 nm, usando etanol como blanco, en el espectrofotómetro (VICTOR Nivo™; PerkinElmer, MA, EE. UU). Finalmente, el análisis cuantitativo se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 8.

### ***Análisis estadístico***

El análisis estadístico realizado en los ensayos funcionales fue ANOVA de dos vías. Estadísticamente, se consideró N1 a la variante de OX40L, y N2 a la condición ExNeg, además el nivel de significancia establecido fue de  $p$  valor = 0.05.

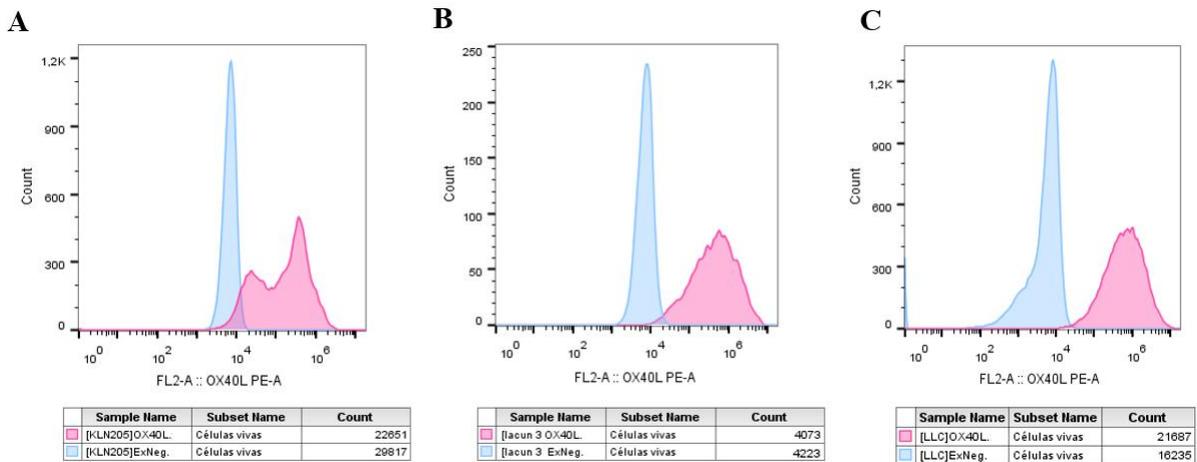
Al existir riesgo de aumentar el error de tipo I (falsos positivos) al realizar múltiples comparaciones, se utilizó la prueba de Sidak en los ensayos. Esta corrección permite ajustar el nivel de significancia para cada comparación individual, preservando la significancia global del análisis.

## **5. RESULTADOS**

### ***Análisis de citometría de flujo: Evaluación de la expresión de OX40L.***

Con el propósito de confirmar la identificación fenotípica (OX40L y ExNeg) de las tres líneas celulares estudiadas, se llevó a cabo una citometría de flujo para evaluar la expresión de OX40L.

En cada una de las tres líneas celulares de origen murino, la variante con sobreexpresión de *OX40L* presenta un aumento de señal de fluorescencia correspondiente al anticuerpo frente a la proteína de OX40L (PE) en comparación con la condición ExNeg, confirmando la expresión de dicha proteína. La variante ExNeg presenta una fluorescencia cercana a la autofluorescencia basal (*unstained*), validando ser un control negativo adecuado para el estudio (Figura 3).



**Figura 3: Evaluación de la sobreexpresión de OX40L mediante citometría de flujo.** Resultados de la evaluación fenotípica mediante citometría de flujo en tres líneas celulares murinas: KLN205 (A), Lacun3 (B) y LLC (C). Los datos se representan en histogramas, donde se muestran las dos variantes experimentales: OX40L (en rosa) y ExNeg (en azul). El eje X indica la intensidad de fluorescencia en el canal FL2-A (OX40L-PE), mientras que el eje Y representa el número de células (conteo).

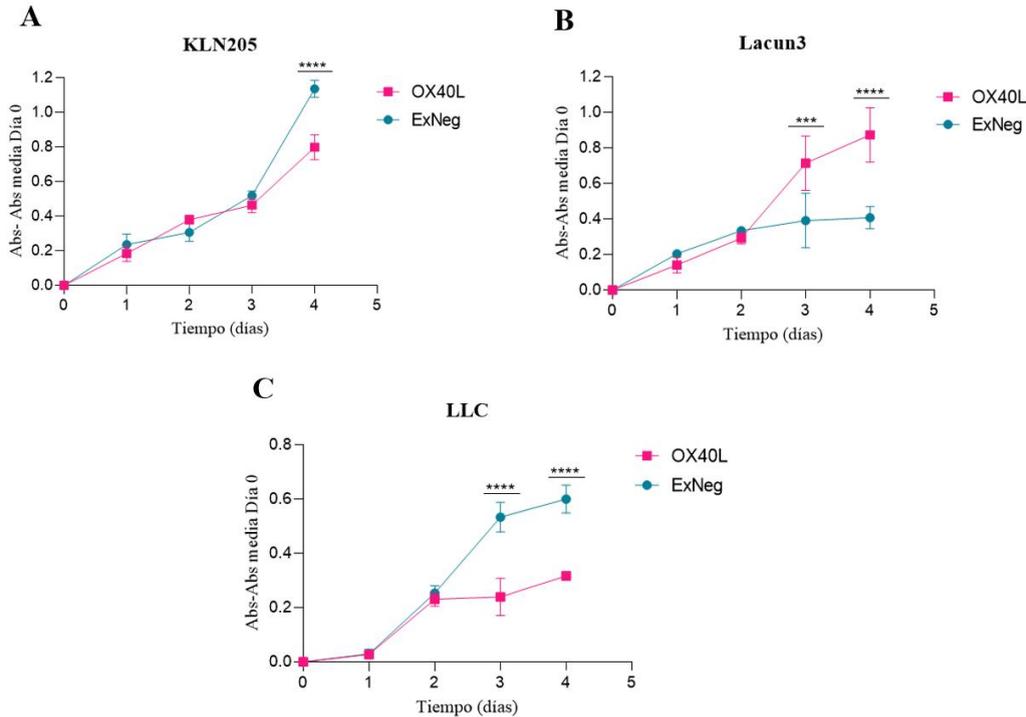
### *Análisis de proliferación celular en células con y sin sobreexpresión de OX40L*

Con el fin de evaluar si la sobreexpresión del gen *OX40L* puede afectar a la capacidad proliferativa de las células tumorales, se llevó a cabo el ensayo de proliferación MTT, durante 96 horas en las tres líneas celulares de ratón.

En el caso de la línea celular KLN205, ambos grupos mostraron un crecimiento similar hasta las 72 horas. Sin embargo, a las 96h se observó un aumento significativo de la viabilidad celular en la condición ExNeg con respecto a OX40L, como se muestra en la Figura 4A. [F (1,23) = 89,58;  $p < 0,0001$ ]. En ese tiempo, el tamaño muestral fue de  $N_1 = 3$  y de  $N_2 = 2$ .

En la línea celular Lacun3, se observó un aumento de la viabilidad en el grupo OX40L con respecto al ExNeg, con diferencias significativas en el tercer y cuarto día, representado en la figura 4B. En el día 3, el tamaño muestral fue de  $N_1 = 4$  y de  $N_2 = 3$  [F (1,27) = 21,48;  $p = 0,0004$ ]. En el día 4, se incluyeron de  $N_1 = 5$  y de  $N_2 = 2$  [F (1,27) = 37,42;  $p < 0,0001$ ].

En la línea celular LLC, al contrario que en la Lacun3, se observó una mayor proliferación celular en la condición ExNeg a las 72 y a las 96 horas [F (1,26) = 121,44 ; p < 0,0001] (Figura 4C). El tamaño muestral fue de N1= 2 y de N2=3, igual en ambos días.



**Figura 4: Ensayo MTT de proliferación celular.** Gráficos de líneas representando los resultados obtenidos del ensayo de MTT en las tres líneas celulares de ratón: KLN205(A), Lacun3(B) y LLC (C). Dentro de cada línea celular se observa la comparación de las dos condiciones experimentales; OX40L en rosa y ExNeg en azul. En todas las gráficas, el eje X representa el tiempo a nivel de días, y en el eje Y se ilustra los valores de absorbancia de los distintos días, restado a la absorbancia media obtenida del día cero correspondiente a cada condición. Se muestran los datos en diagramas de puntos como las medias  $\pm$  desviación estándar. ANOVA de 2 vías: comparando OX40L vs ExNeg (\*; p<0,05), (\*\*; p<0,01), (\*\*\*; p<0,005), (\*\*\*\*; p<0,001).

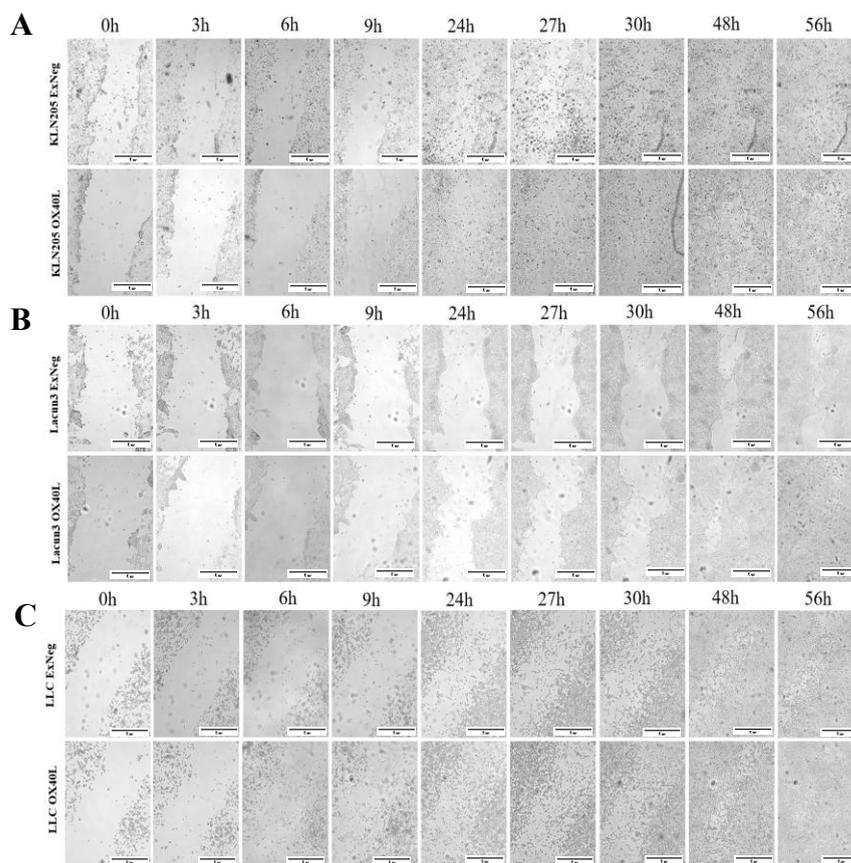
#### *Análisis de cierre de herida: Evaluación de la capacidad migratoria*

Con el objetivo de analizar la capacidad migratoria en base a las condiciones experimentales (OX40L y ExNeg) de cada línea celular, se realizó un ensayo de herida y se obtuvieron las áreas de las mismas, transformadas en porcentaje de cicatrización de las diferentes imágenes tomadas a las distintas horas (Figura 5).

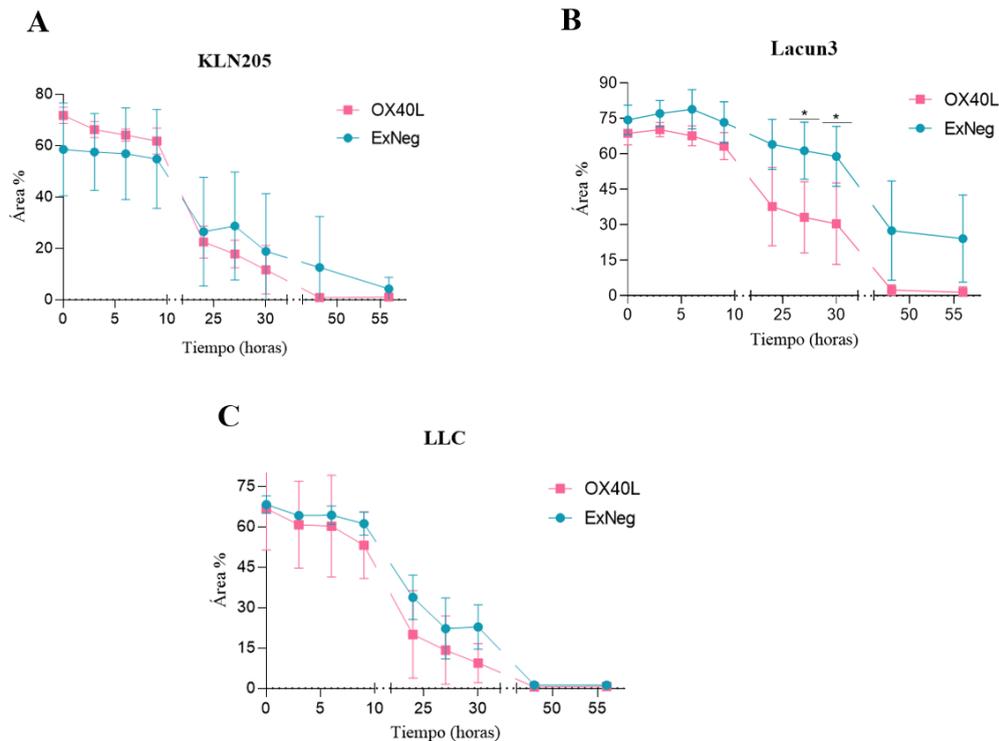
En la línea celular KLN205, la condición OX40L parece migrar más rápidamente, a pesar de presentar una herida con mayor área inicial, cerrando la herida a las 48 horas, mientras que en la condición ExNeg la herida sigue sin estar totalmente cerrada en la última medición (56 horas). Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones (Figura 6A).

En la línea celular Lacun3, el patrón de cierre no es tan uniforme en comparación a las otras líneas. Concretamente, la condición OX40L muestra una mayor eficiencia migratoria con respecto a la ExNeg, siendo significativa entre las 27 [F (1,36) = 9,32 ; p = 0,0376] y las 30 horas [F (1,36) = 9,51 ; p = 0,0346] (Figura 6B).

En la línea celular LLC, la cinética de migración en ambas condiciones es muy similar y convergen los dos grupos de manera veloz hasta el cierre casi por completo de la herida en torno a las 48 horas (Figura 6C).



**Figura 5: Panel de imágenes del ensayo de herida.** Se muestran las fotos realizadas a distintas horas (0, 3, 6, 9, 24, 27, 30, 48 y 56) de las tres líneas celulares de origen murino: KLN205(A), Lacun3 (B) y LLC (C) usando el objetivo 10x y con una barra de escala de 50 µm. Para cada condición, se muestra una imagen representativa de cada triplicado perteneciente a cada línea celular.



**Figura 6: Ensayo de herida.** Gráficos de líneas mostrando los resultados obtenidos del ensayo de herida en tres líneas celulares de ratón: KLN205(A), Lacun3(B) y LLC (C). Dentro de cada línea celular se observa la comparación de dos condiciones experimentales; OX40L en rosa y ExNeg en azul. En todas las gráficas, el eje X representa el tiempo medido en horas y en el eje Y se muestra el porcentaje de área de la herida, siendo la variable dependiente. Se muestran los datos en diagramas de puntos como las medias  $\pm$  desviación estándar. ANOVA de 2 vías: comparando OX40L vs ExNeg (\*;  $p < 0,05$ ), (\*\*;  $p < 0,01$ ), (\*\*\*;  $p < 0,005$ ), (\*\*\*\*;  $p < 0,001$ ).

### *Análisis de invasión transwell con matrigel*

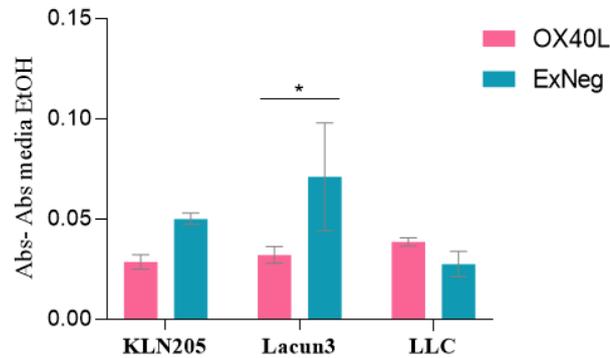
Con la finalidad de averiguar si la sobreexpresión de *OX40L* puede afectar a la capacidad invasiva de las células tumorales, se llevó a cabo el ensayo de *transwell* con matrigel en las tres líneas celulares de ratón.

En la línea celular KLN205, la condición ExNeg muestra una absorbancia mayor que la condición OX40L, reflejando una disminución de la capacidad invasiva de esta última. No obstante, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones (Figura 7).

En la línea celular Lacun3, al igual que en la línea KLN205, las células de la condición ExNeg fueron capaces de invadir el matrigel de manera estadísticamente significativa con respecto a la condición OX40L [ $F(1,6) = 11,33$ ;  $p = 0,0447$ ] (Figura 7),

indicando una mayor propensión a la invasión tumoral.

En la línea celular LLC, la condición OX40L muestra una absorbancia levemente mayor que la ExNeg, sugiriendo una mayor capacidad invasiva. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre ambas condiciones experimentales (Figura 7).



**Figura 7: Ensayo de invasión.** Gráfico de barras representando los resultados del ensayo de *transwell* con matrigel en las tres líneas celulares de origen murino: KLN205, Lacun3, LLC. En el contexto de cada línea, se visualiza la comparación entre ambas condiciones experimentales; OX40L en rosa y ExNeg en azul. En el eje X, se observa las distintas líneas celulares y en el eje Y, se encuentra reflejado los valores de absorbancia restados a la absorbancia media obtenida del blanco (etanol). Se muestran los datos en histogramas como las medias  $\pm$  desviación estándar. ANOVA de 2 vías: comparando OX40L vs ExNeg (\*;  $p < 0,05$ ), (\*\*;  $p < 0,01$ ), (\*\*\*;  $p < 0,005$ ), (\*\*\*\*;  $p < 0,001$ ).

## 6. DISCUSIÓN Y ENFOQUE ODS SOSTENIBILIDAD

### 6.1 Discusión

El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad proliferativa, migratoria e invasiva de líneas celulares de ratón de CPCNP, con y sin sobreexpresión de *OX40L*, para caracterizar dichas líneas *in vitro* y, en un futuro, realizar estudios *in vivo* que permitan valorar el papel de *OX40L* como diana terapéutica emergente.

Hasta la fecha, el papel molecular de *OX40L* en células tumorales no ha sido caracterizado en profundidad. Tal como se observó en estudios previos del grupo de investigación, otras investigaciones han analizado cohortes de pacientes con distintos tipos de tumorales, como glioblastoma (Shibahara *et al.*, 2015) o cáncer de páncreas (Chen *et al.*, 2022), observando una asociación entre la expresión de *OX40L* en células

tumorales y una mayor supervivencia. Así mismo, en un estudio *in vivo* se observó una disminución de Ki67, proteína nuclear que se expresa en las células en proliferación, en los ratones cuyos tumores expresaban OX40L (Deng *et al.*, 2022).

Estos resultados podrían apuntar a una menor proliferación de las células OX40L positivas. Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo mediante el ensayo de MTT, no parecen indicar que la sobreexpresión de *OX40L*, por sí misma, tenga un efecto claro en la capacidad proliferativa *in vitro*. En concreto, las líneas celulares KLN205 y LLC con sobreexpresión de *OX40L* presentan una reducción del crecimiento, mientras que la línea Lacun3 *OX40L* muestra un incremento respecto a la condición ExNeg.

Cabe destacar, que la asociación de los niveles de expresión de OX40L en células tumorales con una mayor supervivencia de los pacientes fue más notable cuando se combinaba con una elevada expresión del receptor OX40 en células inmunitarias infiltrantes (Chen *et al.*, 2022). Esto sugiere que la expresión de OX40L en células tumorales, por sí sola, no basta para afectar su capacidad proliferativa. Es probable que se requiera de la activación del receptor OX40 en las células del sistema inmune para inducir su proliferación (Yan *et al.*, 2013), la liberación de citoquinas (Ohshima *et al.*, 1997) y, en definitiva, generar un microambiente más inmunogénico que limite el crecimiento tumoral. Para confirmar esta hipótesis, es necesario llevar a cabo estudios *in vitro* utilizando organoides derivados de tumores en co-cultivo con células del sistema inmunológico o estudios *in vivo* que ayuden a caracterizar las células tumorales que expresan OX40L empleando tanto modelos de ratón con inmunodeficiencia congénita (*nude*) como con un sistema inmunológico íntegro (singénicos).

Con respecto a la capacidad migratoria e invasiva, la mayoría de los estudios publicados, como se ha mencionado anteriormente, asocian tumores con alta expresión de OX40L con una mayor supervivencia, lo que implicaría que dichas propiedades no se ven aumentadas en estas células tumorales. En el estudio de Xie *et al.*, 2010, se analizó mediante inmunohistoquímica la expresión de OX40 y OX40L en tejidos de carcinoma ductal *in situ* (DCIS) e invasivo (IDCa) de mama. Los resultados mostraron la correlación entre una alta expresión de OX40 y el estado de metástasis en los ganglios linfáticos, lo que sugiere una posible relación con la progresión tumoral. Sin embargo, no se observaron

diferencias significativas entre los niveles de expresión de OX40L entre el grupo de DCIS y el de IDCa.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de herida parecen indicar un ligero aumento de la capacidad migratoria de las células con sobreexpresión de OX40L, aunque solo es significativo en la línea celular Lacun3. La señalización inversa (*reverse signaling*) es un fenómeno de creciente interés, especialmente en el contexto tumoral e inmunológico, que se ha descrito en otros ligandos de la superfamilia TNF como CD70, CD40L, FasL, RANKL. Mediante este proceso, tras la unión del ligando con su receptor, se produce un reordenamiento del ligando en la membrana y con ello la transducción de la señal hacia el interior de la célula portadora del ligando. Esto puede activar vías de señalización intracelulares y promover la migración. Este fenómeno se ha descrito en el ligando FasL, presente en células tumorales de melanoma, activando la vía de señalización de JNL y PI3K/Akt (Malarkannan, *et al.*, 2020), o en el ligando RANKL, donde se demostró un aumento en migración e invasión en células tumorales de mama y próstata. (Casimiro *et al.*, 2013).

En cuanto a la capacidad invasiva, los resultados mostraron que las células tumorales con sobreexpresión de *OX40L* presentan una menor invasividad *in vitro* con respecto a la condición ExNeg. Es importante aclarar que los procesos de migración e invasión están relacionados, pero no son análogos. En el primero se analiza la movilidad celular en una condición bidimensional mientras que en el segundo implica la aparición de una matriz extracelular, degradable tras la activación de mecanismos adicionales (Justus *et al.*, 2014).

Con relación a esta observación, estudios transcriptómicos aplicados a cohortes de pacientes tumorales, demostraron que los tumores que exhiben un perfil de expresión génica asociado a un fenotipo mesenquimal, se encuentran correlacionados con una sobreexpresión de ICP, incluyendo OX40L. Esto puede indicar que OX40L actúa como respuesta compensatoria inmunomoduladora con respecto a fenotipos más agresivos en determinados contextos tumorales (Mak *et al.*, 2016).

Este estudio presenta una serie de limitaciones a tener en cuenta. En primer lugar, el empleo únicamente de modelos *in vitro* sin la presencia de células pertenecientes al sistema inmunitario ni un contexto inmunocompetente, impide comprender el papel inmunomodulador de OX40L. Además, el número de líneas celulares utilizadas fue limitado disminuyendo la representación de la diversidad tumoral de CPCNP, comprometiendo todo ello a la extracción y generalización de conclusiones relevantes.

## **6.2 Enfoque ODS/ Sostenibilidad**

El presente TFG se adapta a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) que han sido establecidos por la Organización de las Naciones Unidas en la Agenda 2030. En particular, cumple con el ODS 3: Salud y Bienestar, teniendo el propósito de asegurar una vida sana para todas las personas independientemente de su edad. Este estudio contribuye al cumplimiento de dicho objetivo al abordar la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la progresión tumoral, teniendo como fin encontrar una nueva diana terapéutica y por ende, conseguir un tratamiento dirigido a pacientes con CPCNP. Esto mejoraría su calidad y supervivencia, además de reducir el coste económico y medioambiental resultante de abordajes terapéuticos menos específicos, favoreciendo una sanidad más eficiente y sostenible (Organización de las Naciones Unidas, 2023).

## **7. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA**

### **7.1 Conclusiones**

- La transducción lentiviral de las líneas celulares de ratón con CPCNP induce una expresión constitutiva de OX40L.
- La sobreexpresión del gen *OX40L* no presenta un efecto consistente sobre la capacidad proliferativa *in vitro*.
- La migración celular *in vitro* aumenta en las líneas celulares con sobreexpresión del gen *OX40L* con respecto a la condición ExNeg, independientemente de la capacidad proliferativa, siendo significativo únicamente en la línea Lacun3.
- La capacidad de invasión *in vitro* no se incrementa con la sobreexpresión de *OX40L*, a pesar del aumento observado en la migración celular.

## 7.2 Proyección futura

Los resultados obtenidos plantean seguir investigando el papel inmunomodulador de OX40L. Una línea prioritaria en el futuro sería evaluar el comportamiento de células tumorales con sobreexpresión de OX40L en presencia de células del sistema inmune, con el objetivo de poder comprender su rol en el TME. Por ello, se propone la utilización de modelos de co-cultivo con linfocitos T y la validación en modelos murinos *in vivo*. Un punto relevante sería la incorporación de análisis transcriptómicos (RNA-seq) e incluso proteómicos facilitando la identificación de vías intracelulares controladas por la sobreexpresión de OX40L. Además, la evaluación exhaustiva mediante técnicas de análisis espacial como DSP y *COSMx Spatial Molecular Imaging*, disponibles en el laboratorio, permitiría identificar con precisión la localización de OX40L, particularmente en células tumorales de CPCNP y las relaciones con otros tipos celulares. Además, su expresión se podría correlacionar con el estado de activación del sistema inmunitario y con otros biomarcadores presentes en el TME. Todo ello, contribuiría a la generación de nuevas estrategias combinadas, consiguiendo un aumento de eficacia terapéutica en los tratamientos aplicados a pacientes con CPCNP.

## 8. AGRADECIMIENTOS

A mi madre y a mi padre, por creer en mí en todo momento y darme la oportunidad de perseguir la carrera de mis sueños. Gracias por ser mi apoyo incondicional. Todo lo que soy es gracias a vosotros.

A mi ángel del cielo, que, aunque no me hayas visto llegar hasta aquí, tu valentía y fortaleza siempre serán mi fuente de inspiración para guiarme en cada paso que doy.

A mi abuela, por cuidarme desde pequeña y siempre vivir mis logros como si fueran tuyos.

A mis compañeros de la Universidad y a mis profesores, por haber hecho de esta etapa una fuente de aprendizaje, risas e ilusión.

A mí misma, por no darme por vencida a pesar de las circunstancias y por el orgullo que me produce mirar ahora hacia atrás y ver mi evolución.

A mi perro, presente a mi lado durante todas mis horas de estudio, gracias por ser mi terapia cuando más lo necesito.

Gracias a todos.

*“El cáncer es una palabra, no una sentencia”  
Jhon Diamon*

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Baena Espinar, J. (2024). *Identification and validation of response biomarkers to first-line treatment with anti-PD-1 (pembrolizumab) monotherapy in patients with non-small cell lung cancer*. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/108459>
- Casimiro, S., Mohammad, K. S., Pires, R., Tato-Costa, J., Alho, I., Teixeira, R., Carvalho, A., Ribeiro, S., Lipton, A., Guise, T. A., & Costa, L. (2013). RANKL/RANK/MMP-1 Molecular Triad Contributes to the Metastatic Phenotype of Breast and Prostate Cancer Cells In Vitro. *PLoS ONE*, 8(5), e63153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063153>
- Chen, C., Chen, M., Bai, Y., Li, Y., Peng, J., Yao, B., Feng, J., Zhou, J.-G., & Ma, H. (2024). A Single-Arm Multi-Center Phase II Clinical Trial of Cadonilimab (anti-PD-1/CTLA-4) in Combination with or without Conventional Second-Line Treatment for Patients with Extensive Stage Small Cell Lung Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 23, 15330338241249690. <https://doi.org/10.1177/15330338241249690>
- Chen, X., Ma, H., Mo, S., Zhang, Y., Lu, Z., Yu, S., & Chen, J. (2022). Analysis of the OX40/OX40L immunoregulatory axis combined with alternative immune checkpoint molecules in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.942154>
- Cheng, W., Kang, K., Zhao, A., & Wu, Y. (2024). Dual blockade immunotherapy targeting PD-1/PD-L1 and CTLA-4 in lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 17(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s13045-024-01581-2>
- Deng, Z., Yang, H., Tian, Y., Liu, Z., Sun, F., & Yang, P. (2022). An OX40L mRNA vaccine inhibits the growth of hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 12, 975408. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.975408>
- Domnariu, P.-A., Noel, N., Hardy-Leger, I., Michot, J.-M., & Lambotte, O. (2021). Long-term impact of immunotherapy on quality of life of surviving patients: A multi-dimensional descriptive clinical study. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 148, 211–214. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.02.018>
- Jon, Z., & Luis, P.-A. (2022). Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer: First-Line and Second-Line Treatment Options. *Journal of Clinical Oncology: Official*

*Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 40(6).  
<https://doi.org/10.1200/JCO.21.01881>

- Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). In vitro cell migration and invasion assays. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 88, 51046. <https://doi.org/10.3791/51046>
- Kim, T. W., Burris, H. A., de Miguel Luken, M. J., Pishvaian, M. J., Bang, Y.-J., Gordon, M., Awada, A., Camidge, D. R., Hodi, F. S., McArthur, G. A., Miller, W. H., Cervantes, A., Chow, L. Q., Lesokhin, A. M., Rutten, A., Sznol, M., Rishipathak, D., Chen, S.-C., Stefanich, E., ... Siu, L. L. (2022). First-In-Human Phase I Study of the OX40 Agonist MOXR0916 in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 28(16), 3452–3463. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-4020>
- Lahiri, A., Maji, A., Potdar, P. D., Singh, N., Parikh, P., Bisht, B., Mukherjee, A., & Paul, M. K. (2023). Lung cancer immunotherapy: Progress, pitfalls, and promises. *Molecular Cancer*, 22(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01740-y>
- Lee, J. M., Lee, M.-H., Garon, E., Goldman, J. W., Salehi-Rad, R., Baratelli, F. E., Schaeue, D., Wang, G., Rosen, F., Yanagawa, J., Walser, T. C., Lin, Y., Park, S. J., Adams, S., Marincola, F. M., Tumei, P. C., Abtin, F., Suh, R., Reckamp, K. L., ... Dubinett, S. M. (2017). Phase I Trial of Intratumoral Injection of CCL21 Gene-Modified Dendritic Cells in Lung Cancer Elicits Tumor-Specific Immune Responses and CD8+ T-cell Infiltration. *Clinical Cancer Research*, 23(16), 4556–4568. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2821>
- Li, Y., Yan, B., & He, S. (2023). Advances and challenges in the treatment of lung cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 169, 115891. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115891>
- Mak, M. P., Tong, P., Diao, L., Cardnell, R. J., Gibbons, D. L., William, W. N., Skoulidis, F., Parra, E. R., Rodriguez-Canales, J., Wistuba, I. I., Heymach, J. V., Weinstein, J. N., Coombes, K. R., Wang, J., & Byers, L. A. (2016). A Patient-Derived, Pan-Cancer EMT Signature Identifies Global Molecular Alterations and Immune Target Enrichment Following Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Clinical Cancer Research*, 22(3), 609–620. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0876>

- Malarkannan, S. (2020). Molecular mechanisms of FasL-mediated ‘reverse-signaling’. *Molecular Immunology*, 127, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.08.010>
- Neninger Vinageras, E., de la Torre, A., Osorio Rodríguez, M., Catalá Ferrer, M., Bravo, I., Mendoza del Pino, M., Abreu Abreu, D., Acosta Brooks, S., Rives, R., del Castillo Carrillo, C., González Dueñas, M., Viada, C., García Verdecia, B., Crombet Ramos, T., González Marinello, G., & Lage Dávila, A. (2008). Phase II randomized controlled trial of an epidermal growth factor vaccine in advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(9), 1452–1458. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.5980>
- Ohshima, Y., Tanaka, Y., Tozawa, H., Takahashi, Y., Maliszewski, C., & Delespesse, G. (1997). Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *Journal of Immunology*, 159(8), 3838–3848.
- Oosting, L. T., Franke, K., Martin, M. V., Kloosterman, W. P., Jamieson, J. A., Glenn, L. A., de Jager, M. W., van Zanten, J., Allersma, D. P., & Gareb, B. (2022). Development of a Personalized Tumor Neoantigen Based Vaccine Formulation (FRAME-001) for Use in a Phase II Trial for the Treatment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Pharmaceutics*, 14(7), 1515. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071515>
- Organization of the United Nations. (2023). *Health – Sustainable Development*. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/health/>
- Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A. G., Hui, R., Csósz, T., Fülöp, A., ... Brahmer, J. R. (2019). Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater. *Journal of Clinical Oncology*, 37(7), 537–546. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00149>
- Rochlitz, C., Figlin, R., Squiban, P., Salzberg, M., Pless, M., Herrmann, R., Tartour, E., Zhao, Y., Bizouarne, N., Baudin, M., & Acres, B. (2003). Phase I immunotherapy with a modified vaccinia virus (MVA) expressing human MUC1 as antigen-specific immunotherapy in patients with MUC1-positive advanced cancer. *The Journal of Gene Medicine*, 5(8), 690–699. <https://doi.org/10.1002/jgm.397>

- Rui, R., Zhou, L., & He, S. (2023). Cancer immunotherapies: Advances and bottlenecks. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1212476. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1212476>
- Shibahara, I., Saito, R., Zhang, R., Chonan, M., Shoji, T., Kanamori, M., ... Tominaga, T. (2015). OX40 ligand expressed in glioblastoma modulates adaptive immunity depending on the microenvironment: A clue for successful immunotherapy. *Molecular Cancer*, *14*, 41. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0307-3>
- Thai, A. A., Solomon, B. J., Sequist, L. V., Gainor, J. F., & Heist, R. S. (2021). Lung cancer. *Lancet*, *398*(10299), 535–554. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00312-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-3)
- Thapa, B., Kato, S., Nishizaki, D., Miyashita, H., Lee, S., Nesline, M. K., ... Kurzrock, R. (2024). OX40/OX40 ligand and its role in precision immune oncology. *Cancer Metastasis Reviews*, *43*(3), 1001–1013. <https://doi.org/10.1007/s10555-024-10184-9>
- Xie, F., Wang, Q., Chen, Y., Gu, Y., Mao, H., Zeng, W., & Zhang, X. (2010). Costimulatory molecule OX40/OX40L expression in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: An immunohistochemistry-based pilot study. *Pathology, Research and Practice*, *206*(11), 735–739. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2010.05.016>
- Yan, J., Su, H., Xu, L., & Wang, C. (2013). OX40-OX40L interaction promotes proliferation and activation of lymphocytes via NFATc1 in ApoE-deficient mice. *PLoS One*, *8*(4), e60854. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060854>