



Facultad de Medicina  
**Universidad** Zaragoza



## Trabajo Fin de Grado

### **Valor pronóstico de la recuperación de células NK en pacientes con leucemia infantil durante el tratamiento con quimioterapia**

### **Prognostic value of NK cell recovery in patients with childhood leukemia during chemotherapy treatment**

Autor

Daniel Montoya Sánchez

Directores

Dr. Julián Pardo Jimeno

Dr. Ariel Ramírez Labrada



**Universidad**  
Zaragoza

1542

# ÍNDICE

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>2</b>
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
2.1. Leucemias infantiles en la actualidad .....	6
2.1.1. Leucemias agudas linfoblásticas (LLA).....	7
2.1.2. Leucemias agudas mieloblásticas (LAM).....	7
2.2. Células Natural Killer (NK).....	9
2.2.1. Subtipos celulares de células NK.....	9
2.2.2. Receptores de las células NK .....	11
2.2.3. Activación e inhibición de las células NK .....	12
<b>3. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
3.1. Antecedentes e hipótesis.....	13
3.2. Objetivos.....	15
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
4.1 Motor de búsqueda .....	15
4.2 Aislamiento de PBMCs.....	19
4.3 Marcaje con anticuerpos y citometría de flujo.....	19
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
5.1. Revisión bibliográfica.....	20
5.1.1 Haplotipos de los receptores KIR .....	21
5.1.2 Otros receptores de superficie de las células NK .....	22
5.1.3 “Educación o licenciatura” de células NK.....	23
5.2. Análisis de células NK .....	24
5.3. Diseño de un posible estudio futuro .....	27
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>31</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>32</b>

## **ABREVIATURAS**

- Alo-TPH= Trasplante Progenitores Hematopoyéticos Alogénico.
- CAR-T= Receptores de antígenos quiméricos de células T (Chimeric Antigen Receptor T-Cell)
- CD= Cúmulo de diferenciación (Cluster of differentiation)
- Células NK= Células Natural Killer.
- CIBA= Centro Investigación Biomédica de Aragón.
- FasL= Fas ligando
- G-CSF= Factores de Crecimiento de Colonias Granulocíticas.
- GzmB= Granzima B.
- HLA= Antígeno leucocitario humano (Human leukocyte antigen).
- IFN= Interferón.
- ITAM= motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina (Immunoreceptors Tyrosin-based Activating Motifs).
- ITIM= motivo de inhibición inmunorreceptor basado en tirosina (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs).
- KIR= Receptores asesinos de inmunoglobulina (Killer cell immunoglobulin like receptor).
- KIRL= Receptores asesinos de inmunoglobulina (Killer Immunoglobulin-like Receptors).
- KLRG= Receptor G tipo lecitina de células asesinas (Killer Cell lecitin-like receptor G).
- LAIR= Receptor tipo inmunoglobulina asociado a leucocitos (Leukocyte Associated immunoglobulin-like Receptor).
- LLA= Leucemia Linfoblástica Aguda.
- LMA = Leucemia Mieloblástica Aguda.
- MACS<sup>TM</sup> = Miltenyi Biotec.
- MHC= Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
- MRD= Enfermedad mínima residual
- NCR= Receptores de citotoxicidad natural (Natural Cytotoxicity Receptors).
- NPM= Nucleofosmina.
- PBMCs= Célula Mononuclear de Sangre Periférica.
- PBS= Tampón de fosfato salino.
- PFA= Paraformaldehído.
- SEOM = Sociedad Española Oncología Médica.
- SFB= Suero Fetal Bovino.
- TFG= Trabajo Final de Grado.
- TNF= Factor de Necrosis Tumoral.
- WOS= Web Of Science.

## **1. RESUMEN**

La inmunología en los últimos años está adquiriendo un importante papel a la hora de combatir enfermedades como el cáncer. La complejidad del sistema inmune excede nuestro conocimiento y no debemos olvidar que los tratamientos actuales farmacológicos (quimioterapia) consiguen aumentar la supervivencia en un pequeño porcentaje de pacientes con varios efectos tóxicos. Esto es más acentuado en cáncer infantil donde además la inmunoterapia no ha tenido resultados tan buenos como en adultos.

En esta revisión bibliográfica se estudia el papel que desarrollan las células NK (Natural Killer) tanto en el desarrollo como en el valor pronóstico de las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) y en las leucemias mieloblásticas agudas (LMA) en niños. Todavía se desconoce en detalle si su presencia y sus diferentes tipos influye en los tratamientos que se están aplicando actualmente y el pronóstico que puede plantear en el paciente.

En este trabajo nos hemos centrado en los diferentes receptores de superficie que presentan las células NK y el posible significado que tiene a la hora de valorar el pronóstico y la recuperación en pacientes con leucemia infantil durante su tratamiento con quimioterapia.

La literatura revisada apoya que las propiedades que presentan las células NK pueden poner en el punto de mira a estas como un posible tratamiento futuro de algunos tumores. Según los receptores de activación e inhibición que sean estimulados por diversas señales se podría obtener una señal beneficiosa para la evolución de la enfermedad del paciente en busca de su remisión. Aún falta consenso entre la literatura actual ya que se han encontrado artículos que señalan en todas las direcciones. Por tanto, cabe destacar la necesidad de seguir realizando estudios para poder entender mejor el comportamiento y el significado de los datos obtenidos hasta el momento. Por lo tanto, hay que desarrollar un estudio científico que aclare de mejor forma todos los datos estudiados obteniendo un objetivo común y así poder diseñar ensayos experimentales clínicos que aporten datos relevantes en este sentido.

**Palabras clave:** Células NK, leucemia infantil, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, quimioterapia, complejo histocompatibilidad I, pronóstico, inmunología.

### **Abstract**

Nowadays Immunology is becoming a really interesting alternative for some treatments in different diseases such as cancer. Although immune system is pretty complex and we don't completely understand yet all its mechanisms it can help us develop new therapies with higher overall survival and lower side effect which would be a great difference compared to actual chemotherapy treatments.

This review's main purpose is to study the role of NK cells in development and prognosis of LLA and LMA in childhood. It is already unknown if these cells and their

different subtypes can make a difference in patients' response to current treatment and future prognosis. Therefore, this final project analyses NK cells surface receptor and the meaning of their expression in childhood leukemia patient's prognosis and recovery after chemotherapy treatment.

Papers included in this project support that NK cells are a really promising future therapy in some of these cancers. Moreover, they highlight that the expression of activating and inhibitory receptors in these cells can play a major role in their response to cancer. However, most of these papers don't agree in their conclusions and sometimes they have opposing outcomes. Therefore, it is necessary to continue working in NK cells research and design new studies that clarify NK cells role in cancer and their possible use as target in immunotherapy.

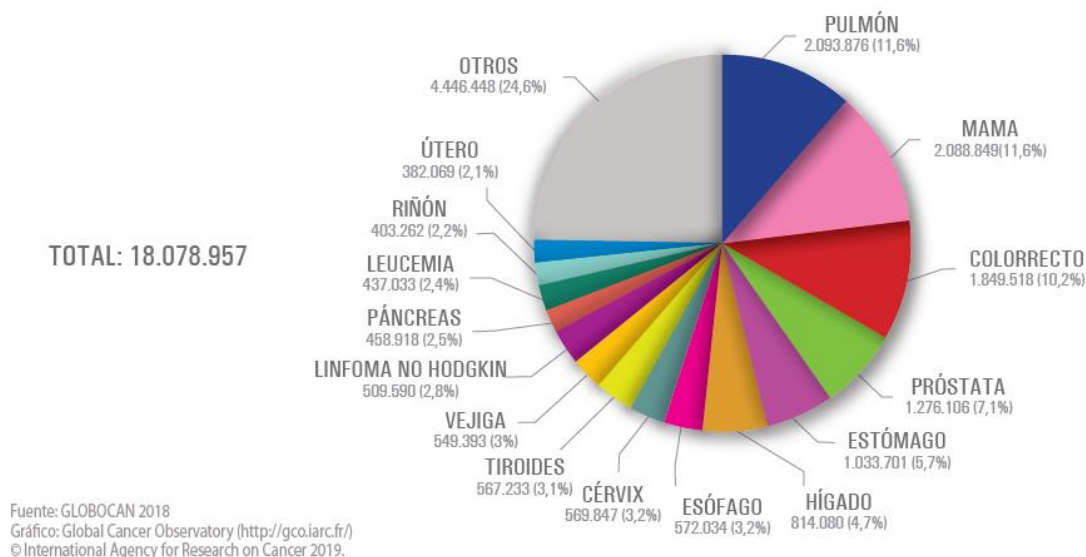
**Key words:** Natural killer cells, leukemia, precursor cell lymphoblastic leukemia-lymphoma, immunology, histocompatibility antigens class I.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las leucemias son un tipo de proliferación neoplásica maligna de células sanguíneas inmaduras que invaden en primer lugar la médula ósea, pudiendo posteriormente pasar al torrente sanguíneo y metastatizar finalmente al resto de órganos (1).

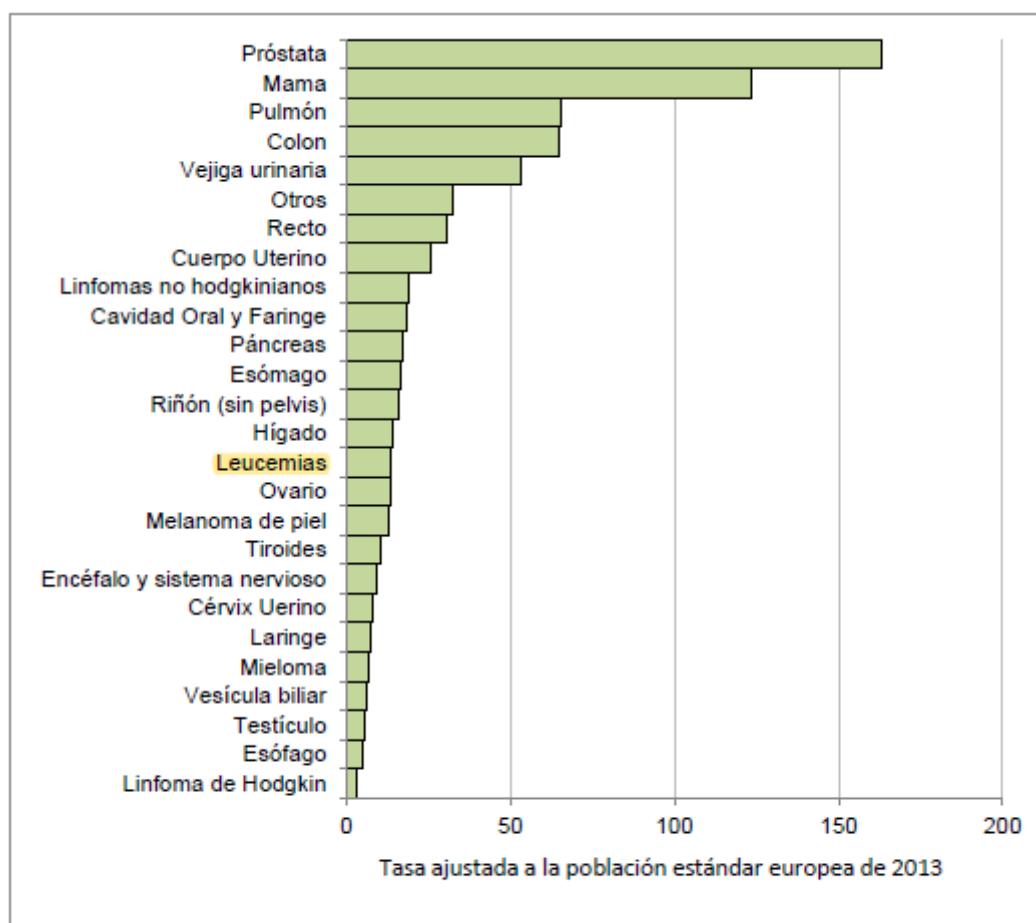
Las leucemias tuvieron según la SEOM (Sociedad Española Oncología Médica) una incidencia mundial de 437.000 pacientes en el año 2018 suponiendo un 2,4 % del total de pacientes diagnosticados de cáncer en ambos sexos en ese mismo año (2).

Figura 1. Estimación de los tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo en el año 2018 (3).



Además, si repasamos los datos en nuestro país encontramos que las leucemias suponen el 15º cáncer más frecuente comparando las tasas estimadas de incidencia ajustadas por edad a la población.

Figura 2. Tasas estimadas de incidencia de cáncer ajustada por edad y tipo tumoral en España en 2019 (2).



Fuente: Red Española de Registros de Cáncer

Aunque existen leucemias agudas y crónicas, en este trabajo nos vamos a centrar en las leucemias agudas, principalmente en la LMA (leucemia mieloblástica aguda) y la LLA (leucemia linfoblástica aguda), dado que como se explica a continuación son los que más incidencia tienen en la población infantil.

Estas leucemias agudas se caracterizan por presentar una invasión de la médula ósea de más de un 20% de blastos (células inmaduras) que produce en la práctica clínica una situación de insuficiencia medular que es la responsable de los síntomas principales de estas enfermedades: síndrome anémico, infecciones y hemorragias. Se conocen como agudas ya que la clínica se instaura de manera brusca y evoluciona en un periodo corto de tiempo (inferior a 3 meses habitualmente) (4).

Además, nos gustaría centrarnos más específicamente en cómo evolucionan estos tipos de cáncer en la edad pediátrica, así como resumir su tratamiento y sus factores pronósticos más importantes.

## 2.1. Leucemias infantiles en la actualidad

### • Epidemiología

De acuerdo con el estudio RETI-SEHOP, que registra los casos de cáncer infantil entre 1990 y 2017, existen 22.265 pacientes diagnosticados de cáncer en nuestro país entre los 0 y los 14 años. De esta cifra, 6.085 (lo que supone un 27,3 % del total de casos) fueron pacientes diagnosticados con leucemias, enfermedades mieloproliferativas o mielodisplásicas. Esto quiere decir que las leucemias y las enfermedades mieloproliferativas son el cáncer infantil más frecuente. Dentro de este grupo 4.813 pacientes tenían LLA (79,1% de las leucemias) y 1002 LMA (16,5 % de las leucemias). Estos datos reflejan la importancia de nuestro trabajo, en el que intentamos encontrar un nuevo valor pronóstico para el cáncer infantil más frecuente en nuestro país.

Figura 3. Casos registrados según grupo diagnóstico, subgrupo y subclasificación entre 0 y 14 años entre 1990 y 2017.

Grupos diagnósticos	N	%	Grupos de edad			
			0	1-4	5-9	10-14
<b>TODOS LOS TUMORES</b>	<b>22.265</b>	<b>100,0</b>	<b>2.508</b>	<b>7.751</b>	<b>6.124</b>	<b>5.882</b>
<b>I Leucemias, enf mielopro y mielodisp</b>	<b>6.085</b>	<b>27,3</b>	<b>354</b>	<b>2.710</b>	<b>1.772</b>	<b>1.249</b>
<b>Ia L linfoblásticas agudas (LLA)</b>	<b>4.813</b>	<b>79,1</b>	<b>184</b>	<b>2.302</b>	<b>1.449</b>	<b>878</b>
Ia1 LLA cél precursoras	4.683	97,3	182	2.256	1.391	854
Ia2 LLA cél B maduras	129	2,7	2	46	58	23
Ia3 LLA cél T maduras y NK	1	0,02	0	0	0	1
Ia4 L linfoides NOS	0	0,0	0	0	0	0
<b>Ib L mieloides agudas (LMA)</b>	<b>1.002</b>	<b>16,5</b>	<b>123</b>	<b>334</b>	<b>255</b>	<b>290</b>
Ic Enf crónicas mielopro	92	1,5	8	14	27	43
Id Síndrome mielodisp y otras mielopro	101	1,7	28	38	18	17
Ie Leucemias no esp y otras	77	1,3	11	22	23	21

### • Tratamiento

El objetivo buscado al instaurar un tratamiento es destruir las células neoplásicas, alcanzando así la remisión completa, disminuyendo las posibilidades de recidiva de la enfermedad y evitando en la medida de lo posible los efectos tóxicos. Además, la disminución de la toxicidad es un aspecto de vital importancia en niños ya que cuando son diagnosticados de esta enfermedad se encuentran todavía en su etapa de desarrollo y la toxicidad en este momento puede generar consecuencias en su futuro.

### **2.1..1. Leucemias agudas linfoblásticas (LLA)**

Dentro de las LLA existen hasta 4 vías de tratamiento disponibles actualmente, consistiendo el más importante en:

- Tratamiento de inducción con vincristina, prednisona, L-asparaginasa.
- Tratamiento de postinducción. Este tratamiento incluye consolidación, intensificación y mantenimiento usando quimioterapia durante 2-3 años y empleando alo-transplantes de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH). Además, como este tipo de leucemia puede afectar al SNC se realizará una profilaxis intratecal con metrotexato, Ara-C y esteroides. De esta forma se obtiene una reducción del 50% al 5% de las recidivas meníngeas.

En los últimos años se están usando también nuevos tratamientos como el blinatumumab (un anticuerpo monoclonal anti-CD19) y CAR-T (Células T que expresan un receptor quimérico de antígenos frente a CD19) células entre otros.

### **2.1..2. Leucemias agudas mieloblásticas (LAM)**

El esquema de tratamiento es similar a las anteriores, aunque podemos encontrar algunos cambios.

- Tratamiento de inducción basado en Antraciclinas.
- Tratamiento de postinducción pudiendo usar quimioterapia o alo-TPH una vez alcanzada la remisión completa.

El tratamiento de soporte lo podremos realizar mediante transfusiones de hematíes si el principal síntoma es el síndrome anémico; plaquetas en caso de plaquetopenia y hemorragias graves; antibioterapia en caso de infección y factores de crecimiento de colonias granulocíticas (G-CSF) si presentan neutropenia severa.

Las recidivas de esta enfermedad presentan una localización más frecuente en el sistema nervioso central (mediante meningitis leucémica) teniendo mal pronóstico.

- **Factores pronósticos**

El factor pronóstico más importante de ambas enfermedades es la obtención de una remisión completa después del tratamiento. Además, tanto la LLA como la LMA tienen factores pronósticos específicos.



Tabla 1. Factores pronósticos de LMA.

LMA	
Mal pronóstico	Buen pronóstico
LAM secundaria	LAM primaria
Leucocitos >50.000	Leucocitos normales
LMA indiferenciada (M0); monocítica (M5b); eritroide (M6); megacarioblástica (M7)	LMA promielocítica (M3) y eosinofílica (M4Eo)
Anomalías 3q, 5, 7 o 11 q Cariotipo complejo Reordenamientos MLL Duplicación gen FTL3	t(8,21); t(15,17); inv(16)
CD7+, CD34+	CD2+, CD19+
>20 % de blastos en médula ósea después de un ciclo de quimioterapia (QT)	NPM (nucleofosmina)

Tabla 2. Factores pronósticos LLA.

LLA	
Mal pronóstico	Buen pronóstico
Niños < 1 año	Niños entre 1 y 9 años
Sexo masculino	Sexo femenino
Leucocitos >100.000	Leucocitos <50.000
ProT, ProB CALLA -	Fenotipo PreB CALLA +
Hipodiploidía t (9,22) (BCR/ABL) t (4,11)	Hiperdiploidía
Mala respuesta al tratamiento Enfermedad residual alta	Buena respuesta al tratamiento Baja enfermedad residual

Con esta revisión sistemática sobre las leucemias en niños que se están llevando a cabo en el CIBA (Centro Investigación Biomédica de Aragón) y en la que se basa este TFG (Trabajo Final de Grado), se pretende estudiar el valor pronóstico de la recuperación de células NK en niños que padecen leucemia y cómo afecta a su posterior respuesta al

tratamiento. Por lo tanto, partimos de la hipótesis de que la recuperación temprana de células NK puede resultar un marcador de buen pronóstico en leucemia infantil.

De esta manera, se va a realizar una breve introducción sobre las células NK y sus principales funciones en la inmunidad humana para terminar de orientar esta parte del TFG.

## **2.2. Células Natural Killer (NK)**

Las células NK son linfocitos grandes granulares que poseen la capacidad de reconocer y eliminar células previamente infectadas por virus o células tumorales (5)(6). Para ello, las células NK tienen capacidad lítica pudiendo inducir citotoxicidad celular pero también son capaces de producir citoquinas y quimiocinas que atraen a otras estirpes celulares encargadas de dicha destrucción (7)(8). La capacidad citotóxica de las células NK se basa principalmente en la vía de los ligandos de muerte y la de exocitosis granular. La primera de ellas consiste en la unión de los ligandos de muerte entre ellos TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral), FasL y TRAIL a sus receptores (TNFR, Fas y DR4/DR5) que se localizan en las células diana. Esta unión desencadena la vía extrínseca de la apoptosis con su cascada de caspasas que conlleva la muerte celular. La segunda de estas vías se produce a través de gránulos citotóxicos de las células NK que contienen entre otros perforina (proteína que induce la formación de poros en la membrana de las células diana) y granzimas que acceden al citoplasma de las células diana y producen la lisis de distintos sustratos produciendo la muerte celular (9).

Además, las células NK también tienen una función reguladora participando en la activación y maduración de DCs, macrófagos y linfocitos T(10).

Estas células suponen entre un 5-15 % de la población total de linfocitos de sangre periférica, siendo el tercer subtipo de linfocitos después de las células T y B (11).

### **2.2.1 Subtipos celulares de células NK.**

Las células NK, al igual que el resto de células del sistema inmune, sufren un proceso de maduración en el cual, en este caso concreto, van recibiendo de forma gradual receptores específicos según su respuesta al contacto con la interleucina-15 (IL-15) (12) (13). En esta etapa de maduración celular las células van adquiriendo diferentes marcadores según su grado de diferenciación. Así, las células NK inmaduras expresan CD56 y CD 16, pero carecen de algunos de los marcadores más conocidos de las células NK diferenciadas como los receptores KIR, CD94/NKG2 y NKp46.

Una vez maduras diferenciamos dos tipos de poblaciones de células NK. Por un lado, encontramos las **CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup>**, las cuales son más abundantes en tejidos fetales o cordón umbilical y su función principal es la síntesis de citoquinas.

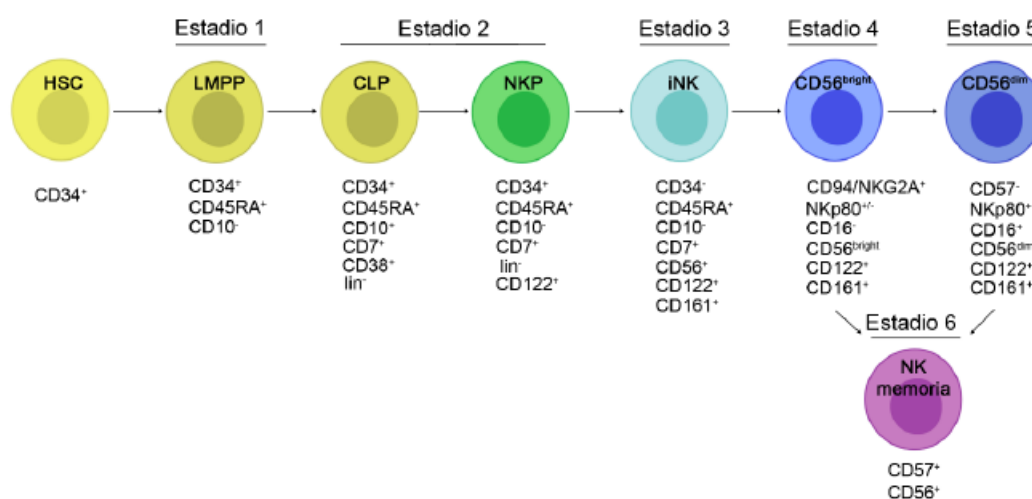
Por otro lado, encontramos las **CD56<sup>dim</sup>/CD 16<sup>+</sup>** que son más abundantes en sangre periférica y tienen capacidad citotóxica directa frente a células tumorales o infectadas (14).

En general se considera que las células NK **CD56<sup>bright</sup>** son precursoras de las **CD56<sup>dim</sup>** existiendo también poblaciones intermedias entre estos dos subtipos celulares (14). El hecho de que durante la maduración celular las células se vayan diferenciando hacia **CD56<sup>dim</sup>** y disminuya la población de células NK **CD56<sup>bright</sup>** supone un aumento de la actividad citotóxica pero también una disminución de la capacidad de proliferar ante los estímulos de diversas IL (15).

Así mismo, existen células NK de memoria que podemos considerar el estadio final de ambos tipos celulares. Estas también se conocen como **células NK adaptativas** y actuarían ante un segundo encuentro frente a una célula diana formando parte de la respuesta secundaria inmunológica (16).

Por último, destacar la existencia de un subgrupo celular presente en enfermedades crónicas interesantes desde el punto de vista de la inmunoterapia y la inmunidad antitumoral. Estas se conocen como células NK “exhaustas” que se caracterizan por presentar en su superficie una disminución de los receptores de activación (CD-16 y NKG2D entre otros) y un aumento de los receptores de inhibición como NKG2A (17) (18) (19).

Figura 4. Modelo de maduración de las células NK.



## **2.2.2 Receptores de las células NK**

### **2.2.2.1 Receptores de inhibición**

Mediante la expresión de estos receptores en la superficie de la célula NK se produce una disminución de la actividad funcional de la célula NK. Estos receptores presentan un dominio ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs) que se activa mediante la fosforilación produciendo así la reducción de la actividad de la célula NK. Estos receptores se ven disminuidos en el estado de activación (20). A continuación, describiremos algunos:

- KIRL (Killer Immunoglobulin-like Receptors): presentan gran polimorfismo y producen la inactivación de la célula NK al reconocer las moléculas de HLA-I (HLA A, B y C), lo que supone uno de los mecanismos de tolerancia a nuestras propias células (16) (21).
- NKG2A (CD94): desarrollan una función similar a los receptores KIR favoreciendo la tolerancia a las moléculas de HLA-I (HLA-E) (22).
- LIRB1/ILT2: reconocen las moléculas de HLA-I (HLA-G) y producen la inactivación de las células NK.
- Existen receptores que no están unidos a la molécula de HLA-I, tales como LAIR 1 (Leukocyte-Associated Immunoglobulin-like Receptor-1) o KLRG-1 (Killer Cell lectin-like receptor G1) (23).

### **2.2.2.2 Receptores de activación y moduladores**

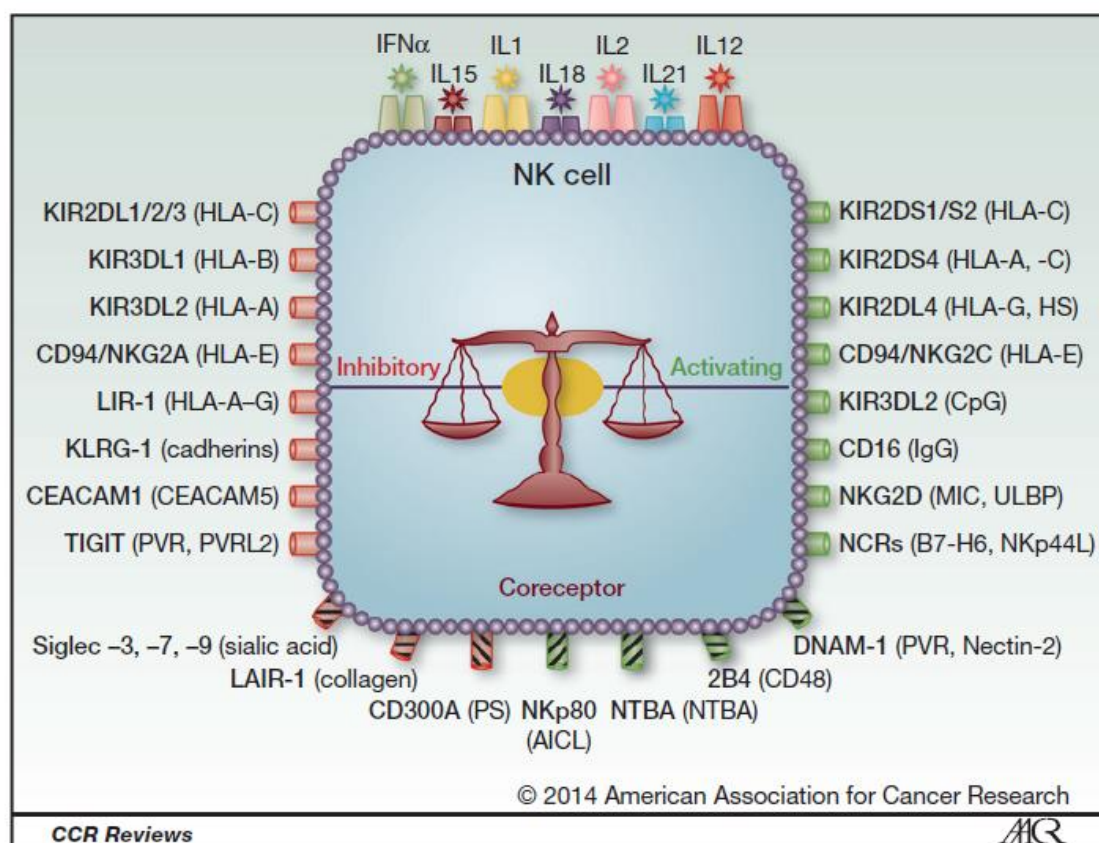
Son los encargados de activar las células NK tras reconocer ligandos expresados por células infectadas por virus o inducidos por moléculas de estrés en células tumorales.

Estos receptores basan su funcionamiento en el reclutamiento de moléculas adaptadoras que llevan a cabo la transducción de la señal. Estas moléculas adaptadoras señalizan a través de dominios ITAM (Immunoreceptors Tyrosin-based Activating Motifs) (20)(24). Posteriormente los ITAM reclutan ZAP 70 y Syk, esto desencadena la entrada de calcio y la degranulación de moléculas citotóxicas, citoquinas y quimiocinas (25).

Los receptores de activación se agrupan en distintas familias:

- CD16: es un receptor de baja afinidad para la fracción Fc (fracción cristalizable) de los anticuerpos. Participa en la opsonización de partículas, ya que reconoce células cubiertas con anticuerpos y producen citotoxicidad dependiente de anticuerpo mediante la liberación de citoquinas.
- NCR (Natural Cytotoxicity Receptors): incluye el NKp30, NKp46 y NKp44.
- NKG2D: reconoce moléculas propias producidas por estrés como MIC o ULBPs.
- KIRS: reconocen moléculas unidas al HLA-I.

Figura 5. Receptores de activación e inhibición de la superficie de las células NK y sus ligandos.(26)



### 2.2.3. Activación e inhibición de las células NK

Las células NK adquieren durante su desarrollo la función citotóxica lo que hace necesario la existencia de una serie de mecanismos de regulación que impidan que estas células NK ataquen a las células sanas de nuestro organismo. Así, durante su maduración, las células NK adquieren tolerancia respecto a las células propias (27).

En este proceso de tolerancia juegan un papel fundamental los receptores de inhibición y activación explicados en el apartado anterior (principalmente KIR, CD94/NKG2A, NKG2D, NKp46) y el HLA-1. Estos receptores se expresan de manera irregular en las células NK y son polimórficos, de manera que no todos tienen la misma afinidad por los ligandos del HLA-1 (28). Este proceso de activación e inhibición de las NK se basa en la integración de las señales que les llegan de los diferentes receptores de manera que se establece un delicado equilibrio entre las señales de activación y las de inhibición (29).

En condiciones de normalidad las células NK reconocen el HLA-I que actúa para ellas como una señal de inhibición de manera que no reciben estimulación de sus receptores de activación (30). Cuando las células están afectadas ya sea por una infección o por el desarrollo de un proceso tumoral, pueden disminuir los niveles de HLA-I o aumentar la expresión de señales de estrés. Esto hace que las señales de estimulación sobrepasen las de inhibición y se produce por lo tanto la activación de las células NK (31).

### **3. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

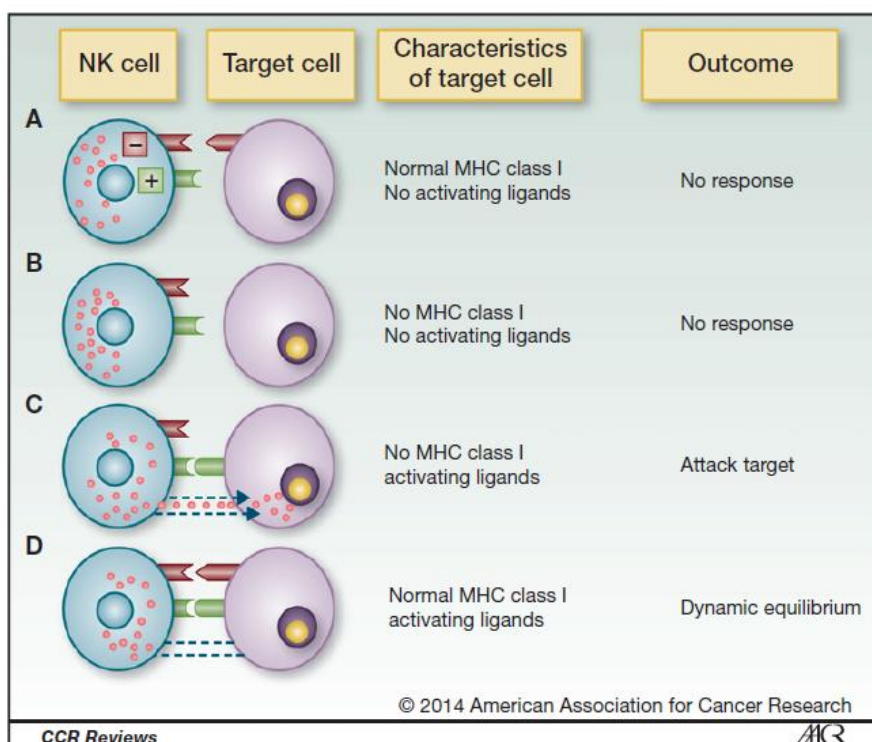
#### **3.1. Antecedentes e hipótesis**

A continuación resumiré la información obtenida de la búsqueda bibliográfica preliminar a este trabajo que nos ha hecho plantearnos la hipótesis que sostiene este TFG.

En primer lugar, desde el descubrimiento de las células NK en los años 70 y la posterior comprensión de sus funciones y sus mecanismos de funcionamiento, existen numerosos estudios a favor del papel que desempeñan las células NK en el reconocimiento y destrucción de las células tumorales (32). De hecho, las células NK forman la primera línea de defensa contra los tumores y pueden eliminar estas células por citotoxicidad directa o bien produciendo citoquinas como el IFN- $\gamma$  (interferón gamma) que estimulan la actividad de otras células del sistema inmune (33).

Por otro lado, los estudios acerca del comportamiento de las células NK en los trasplantes alogénicos de médula ósea aportan información interesante acerca de las propiedades que pueden tener estas células en un futuro como posible tratamiento para algunos tumores (33). Como hemos explicado anteriormente, las células NK poseen una serie de receptores activadores e inhibidores los cuales son estimulados por diversas señales y como resultado de la integración de las mismas se regula la activación o inhibición de las células NK. Entre ellos destacan los receptores de inhibición KIR que en condiciones normales reconocen el HLA-I. Sin embargo, los receptores KIR de las células NK de los donantes de un trasplante alogénico no son capaces de reconocer el HLA-I del receptor como propio. La supresión de esta señal del receptor KIR se traduce por lo tanto en la ausencia de inhibición por parte de estos receptores. Por ellos, las células NK alogénicas son capaces de inducir la remisión o minimizar las posibilidades de recidiva en pacientes con neoplasias hematológicas que son sometidos a este tipo de trasplantes (33)(34).

Figura 6. Equilibrio dinámico. Contacto entre célula NK con célula diana, HLA-I de superficie y su respuesta.



Por último, cabe destacar que los tratamientos de quimioterapia que se usan habitualmente en algunos cánceres son capaces de desencadenar una respuesta de estrés celular que facilita la activación de las células NK aumentando las posibilidades de que se produzca la muerte de las células tumorales por citotoxicidad directa mediada por las células NK (35)(33).

Todos estos argumentos acerca del importante papel que desempeñan las células NK contra las células tumorales y los distintos ejemplos aportados sobre su aplicación en algunos ámbitos nos han llevado a pensar que un mayor número de células NK detectadas en sangre puede ser un factor de buen pronóstico en el estudio de algunos cánceres. Por ello, defendemos como **hipótesis principal** en este TFG que una rápida recuperación de los niveles de células NK durante el tratamiento con quimioterapia es un indicador de buen pronóstico y favorece la respuesta al tratamiento de los pacientes pediátricos con LLA y LMA.

Para estudiar esta hipótesis planteamos como objetivo general de este trabajo desarrollar un análisis bibliográfico sobre los estudios que sugieren un papel de las células NK en la eficacia de la quimioterapia en pacientes con LLA y LMA pediátrico y establecer el protocolo para un futuro estudio experimental de la hipótesis.

### **3.2. Objetivos**

Para llevar a cabo este objetivo hipótesis planteamos los que se detallan a continuación:

- Realizar una revisión bibliográfica acerca de la relación entre los niveles de células NK, sus tipos y el pronóstico de la enfermedad.
- Realizar una revisión bibliográfica recopilando información sobre cómo influyen los niveles de células NK en la respuesta a la quimioterapia y la posterior evolución clínica de las LLA y las LMA en la población infantil.
- Optimizar las condiciones para el análisis mediante citometría de flujo de las células NK en estos pacientes.
- Plantear un estudio clínico que se podría llevar a cabo en el futuro con los resultados obtenidos.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1. Motor de búsqueda**

Esta revisión bibliográfica ha sido elaborada apoyándonos en 2 bases de datos bibliográficos; Pubmed y WOS (Web Of Science). A continuación, en las tablas se exponen los booleanos y combinaciones de búsqueda junto con los resultados obtenidos aplicando algunos filtros de búsqueda. Los principales filtros que se han utilizado han sido; estudios publicados en los últimos 5 años o 10 años, estudios comprobados en humanos descartando aquellos que sólo usan animales, número de citaciones del estudio filtrando los primeros como los más citados.

En primer lugar, he obtenido las palabras clave de las cuales quería realizar la revisión bibliográfica. Al usar como base de datos Pubmed he buscado los términos Mesh para así poder abarcar y a la vez acotar la información requerida. Por último, mediante los booleanos he combinado las palabras clave para finalmente quedarme con los resultados que más adelante se muestran.



## MOTOR DE BÚSQUEDA

Términos Mesh:

Prognosis	Killer Cells, Natural	Leukemia	Precursor Cell Lymphoblastic Leukemia-Lymphoma	Drug therapy	Immunology	Histocompatibility Antigens Class I
Prognoses	NK Cells	Leukemias	ALL, Childhood	Therapy, Drug	Immunology	Class I Antigens
Prognostic Factors	Cell, NK	Leucocythaemia	Childhood ALL	Drug Therapies		Antigens, Class I
Factor, Prognostic	Cells, NK	Leucocythaemias	Leukemia, Lymphoblastic, Acute, L1	Therapies, Drug		Class I Major Histocompatibility Antigens
Factor, Prognostic	Natural Killer Cells	Leucocythemia	Precursor Cell Lymphoblastic Leukemia Lymphoma	Chemotherapy		Class I MHC Proteins
Prognostic Factor	Cell, Natural Killer	Leucocythemas	Leukemia, Acute Lymphoblastic	Chemotherapies		Class I Major Histocompatibility Molecules
	Cells, Natural Killer		Acute Lymphoblastic Leukemia	Pharmacotherapy		MHC-I Molecules
	Killer Cell, Natural		Leukemia, Lymphoblastic	Pharmacotherapies		MHC I Molecules
	Natural Killer Cell		Leukemia, Lymphoblastic, Acute			Molecules, MCH-I
			Leukemia, Lymphocytic, Acute			MHC-I Peptides
			Lymphoblastic Leukemia			MHC I Peptides
			Lymphoblastic Leukemia, Acute			Peptides, MHC-I
			Lymphoblastic Lymphoma			MHC Class I Antigens
			Lymphocytic Leukemia, Acute			Human Class I Antigens
			Acute Lymphocytic Leukemia			Class I Human Antigens
			Leukemia, Acute Lymphocytic			

			Lymphoma, Lymphoblastic			
			Acute Lymphoid Leukemia			
			Leukemia, Acute Lymphoid			
			Lymphoid Leukemia, Acute			
			Leukemia, Lymphoid, Acute			
			Leukemia, Lymphocytic, Acute, L1			
			Lymphocytic Leukemia, L1			
			L1 Lymphocytic Leukemia			
			Leukemia, L1 Lymphocytic			
			Lymphoblastic Leukemia, Acute, Childhood			
			Lymphoblastic Leukemia, Acute, L1			
			Leukemia, Lymphoblastic, Acute, L1			
			Leukemia, Lymphocytic, Acute, L2			
			Lymphocytic Leukemia, L2			
			L2 Lymphocytic Leukemia			
			Leukemia, L2 Lymphocytic			

**PubMed (NIH: National Library of Medicine)**

Estrategia de búsqueda		
Búsqueda por Subheadings / Mayor terms		
#1	Killer Cells, Natural/immunology* AND Humans AND Cytotoxicity (filters: last 10 years)	2319
#2	Natural Killer cell* AND innate immunity* (Filter: published in last 10 years)	1307
#3	Cellular* AND Lymphocytes/immunology* AND cytotoxicity Tests	987
#4	Prognosis* AND Natural Killer Cells AND drug Therapy	448
#5	Prognosis AND Natural Killer Cells AND Chemoth*	680
#6	NK cells AND Paediatric leukemia AND Prognosis	77
<b>RESULTADO</b>	Tras descarte por temática, selección previa y fusión de búsquedas.	32

**WEB OF SCIENCE (WOS)**

Estrategia de búsqueda		
#1	TS= (Prognosis AND natural killer cells AND leukemia)	803
#2	TS= (adoptive immunotherapy AND humans)	14695
#3	TS= (adoptive immunotherapy AND humans AND leukemia)	3398
#4	COMBINACIÓN #3 AND #1	34
#5	TS= (adoptive immunotherapy AND humans AND leukemia NOT animals)	631
#6	COMBINACIÓN #1 AND #5	6
#7	TS= (pediatric leukemia AND prognosis AND NK cells)	52
<b>RESULTADO</b>	Tras descarte por temática, selección previa y fusión de búsquedas.	19

## **4.2. Aislamiento de PBMCs**

Los PBMCs se obtuvieron mediante separación por gradiente de densidad de las muestras de sangre. Para ello se diluyó la muestra de sangre en 5 volúmenes de PBS (tampón de fosfato salino). A continuación, esta sangre diluida se añadió sobre un volumen del reactivo Ficoll (Histopaque) en proporción 1:1. Posteriormente se centrifuga a 500xg durante 30 minutos. Al terminar la centrifugación se recuperan los PBMCs que se localizan en la interfase y se lavan 3 veces con PBS estéril. Estos PBMCs purificados se pueden utilizar después en estudios posteriores o tras ser activados.

## **4.3. Marcaje con anticuerpos**

### **Análisis por citometría de flujo**

Para caracterizar el fenotipo de las células NK dentro de la PBMCs, se utiliza citometría de flujo. Para ello se utilizan anticuerpos primarios ya marcados con fluorocromos tal y como se describe en el artículo de Lanuza et al. (9).

Para llevar a cabo este procedimiento, lo primero que se debe hacer es incubar las suspensiones celulares con los anticuerpos anteriormente comentados diluidos en tampón PBS enriquecido con un 5% de SFB (suero fetal bovino) durante 15 minutos a 4 °C en la oscuridad.

A continuación, se centrifugaron las muestras a 3000xg durante 2 minutos para eliminar la solución de marcaje y se realizó un lavado con PBS suplementado con SFB. Finalmente se fijaron las muestras con PFA al 1% (paraformaldehído) quedando listas para su posterior análisis por citometría de flujo.

El análisis por citometría de flujo consiste en medir las características de cada elemento de la suspensión celular cuando le incide luz de una fuente láser. Para lograr este objetivo, se hace pasar la suspensión celular a través de un pequeño orificio de manera que se obtiene una corriente continua de células que pasan una a una. Posteriormente se hace incidir un haz de luz láser sobre esta corriente continua de células. Este haz de luz excita los fluorocromos unidos a los anticuerpos a distintas longitudes de onda para cada fluorocromo. Finalmente se obtiene una imagen basada en el espectro de emisión de los fluorocromos que nos permite ver cada anticuerpo en un canal distinto (un color distinto). De este modo se clasifican las células en función de sus características (tamaño y complejidad) y por la intensidad de fluorescencia según los anticuerpos que lleven unidos. El análisis se lleva a cabo en un citómetro Gallius (Beckman Coulter) con el programa de análisis de citometría Weasel.

## **5. RESULTADOS**

La primera parte de los resultados de este TFG consiste en una revisión bibliográfica sobre artículos actuales relacionados con la hipótesis de trabajo planteada para comprender en qué estado se encuentran actualmente los estudios sobre las células NK y su valor pronóstico en las leucemias pediátricas. Además, se completará este apartado del TFG con algunos de los datos obtenidos mediante las técnicas explicadas en el apartado de material y métodos y que forman parte del proyecto de investigación que se está llevando a cabo en el CIBA por el grupo en el que he desarrollado este TFG.

### **5.1. Revisión bibliográfica**

Durante la búsqueda bibliográfica hemos encontrado varios artículos interesantes relativos a la relación existente entre los niveles de NK y la respuesta al tratamiento y el pronóstico en pacientes con LLA o LMA pediátrica

Como hemos explicado en la introducción, se conocen actualmente distintas subpoblaciones de células NK por lo que los artículos tratan no sólo de establecer si las células NK pueden considerarse un factor de buen pronóstico sino qué características específicas de estas células podrían pronosticar una mejor respuesta al tratamiento.

Entre los distintos factores que se tienen en cuenta en los estudios consultados podemos destacar la presencia de FasL (Fas ligando), la granzima B y el PI-9, el receptor de activación NKp46 y los diferentes haplotipos de los receptores KIR.

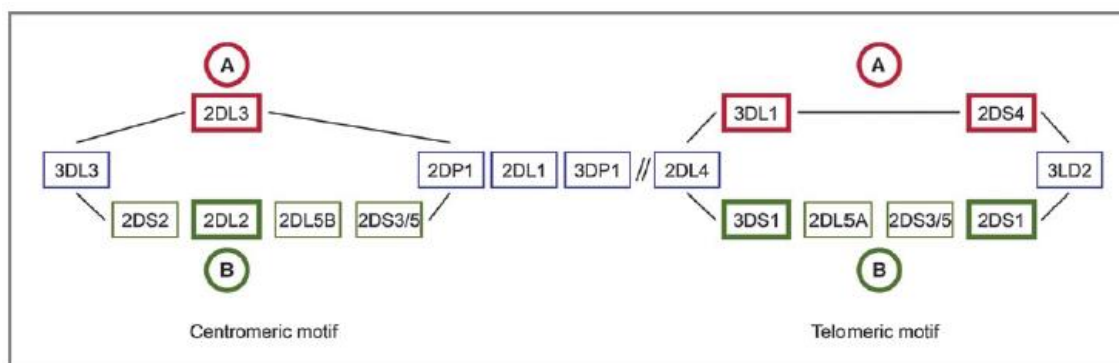
Antes de comenzar con los factores previamente nombrados vamos a analizar algunos artículos encontrados en los que se analiza de manera general la relación entre la presencia de células NK y el pronóstico y la respuesta al tratamiento. En primer lugar, cabe destacar que en uno de los pocos estudios encontrados que correlacionan número de células NK y MRD (enfermedad mínima residual), no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.12$ ) entre el número de células NK en sangre al diagnóstico en el grupo con MRD y en el grupo sin MRD después del tratamiento de inducción quimioterápico en LLA infantil (36). Sin embargo, hallamos otro estudio en el que se comparan dos grupos de pacientes con LLA infantil, uno con células NK presentes en médula ósea y otro sin estas células en médula ósea. Al comparar estos grupos se concluyó que los pacientes con células NK en médula ósea tenían una mejor respuesta a la terapia con corticoides, así como una mayor frecuencia de remisión de la enfermedad a los 15 días de tratamiento. Además estos pacientes también presentaron una mayor tasa de supervivencia global (37). Por último, otro de los estudios tenidos en consideración señala que existe un número y un porcentaje anormal de células NK en los pacientes afectados de LLA infantil en mayor medida que en el grupo control con el que se compararon estos pacientes, destacando también que tenían un menor número de células NK los pacientes de entre 1-9 años que aquellos mayores de 10 años. Además, este estudio también señala que los pacientes con LLA infantil presentan una citotoxicidad disminuida o deteriorada respecto a los grupos control, especialmente los pacientes con LLA que tiene más de 10 años presentan una degranulación de las células

NK disminuida respecto a los de entre 1 y 9 años. Esto podría explicar el hecho de que la edad de entre 1 y 9 años sea considerada un factor de buen pronóstico en la LLA infantil (38).

### 5.1.1. Haplotipos de los receptores KIR

Los receptores KIR de las células NK se encuentran expresados en el cromosoma 19q13.4 y se han establecido diferentes haplotipos según los alelos que se hallan presentes tanto en el centrómero como en el telómero del cromosoma (21). Los haplotipos más importantes de los receptores KIR son el A y el B. El haplotipo A contiene 5 KIRs de inhibición (KIR2DL3, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR3DL2) y el KIR activador KIR2DS4. El haplotipo B contiene por su parte los genes KIR2DL2, KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 y KIR3DS1. Esto tiene como consecuencia que el haplotipo B contiene más KIRs activadores que el haplotipo A (39). A continuación, se muestra un esquema simplificado de estos dos haplotipos explicados.

Figura 7. Esquema de los haplotipos A y B en el cromosoma 19q13.4.



Se ha introducido aquí este aspecto dado que el tipo de haplotipo puede condicionar una mejor o peor respuesta a diversos tratamientos según ha sido observado en diferentes estudios analizados.

De esta manera, el estudio realizado por Sullivan EM et al. ha encontrado diferencias estadísticamente significativas en la presencia de MRD según el tipo de haplotipo que presentan los pacientes. Así, la expresión de los receptores KIR2DL5A, KIR2DS1 y KIR2DS3, presentes exclusivamente en el haplotipo B, supuso un aumento de entre 3.05 y 4.5 veces de las probabilidades de MRD post tratamiento de inducción quimioterápica en estos pacientes (36). Esto sugiere que la presencia de haplotipo B está asociada a una pobre respuesta al tratamiento de inducción en la LLA pediátrica y, por lo tanto, a un peor pronóstico en esta enfermedad.

Además, en este mismo estudio se observó que las probabilidades de tener MRD fueron 2,85 veces (IC 95% 1.075-7.73) mayores en los pacientes con expresión telomérica A/B que en aquellos con expresión telomérica A/A aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las expresiones centroméricas de estos genes (36). Por lo tanto, parece que es concretamente la expresión telomérica de estos haplotipos la que

juega un papel determinante en el desarrollo de MRD y por lo tanto en el pronóstico de la LLA pediátrica.

Sin embargo, hemos encontrado también artículos en contra de estos resultados. Por un lado, en uno de estos se concluye que existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de KIRs activadores y una disminución del riesgo de LLA en población infantil. En este artículo la mayor asociación entre estas dos variables se encontró con el gen KIR2DS2 con una odds ratio de 0.27 (IC 95% 0.16-0.43), lo que implica que el KIR2DS2 se comporta según este estudio como un factor protector respecto a la LLA pediátrica. Además, también se observó que el riesgo de LLA pediátrica disminuía progresivamente en relación con el aumento del número de KIRs activadores (40). Por otro lado, otro de los artículos estudiados sugiere que no existe asociación significativa entre la cantidad de KIRs activadores y la LLA infantil (41).

En cuanto a la LMA hemos encontrado en su mayoría estudios en población adulta ya que es mucho menos frecuente en la población infantil y es el tipo más frecuente de leucemia aguda en la población adulta. Así los estudios encontrados destacan que para este tipo de leucemia sería protector tener el haplotipo B ya que este se asocia con un aumento del periodo libre de enfermedad y la supervivencia general después del tratamiento en este caso con alo-TPH (42). Cabe destacar también que, al contrario de lo señalado en el artículo de Sullivan EM et al., en el estudio de Cooley et al. sería la expresión centromérica del haplotipo B la que tiene una asociación más fuerte con la disminución del riesgo de recaída siendo el RR (riesgo relativo) de recaída post alo-TPH del grupo de pacientes con expresión centromérica B de 0,34 (IC 95% 0.20-0.57) y el RR de recaída o muerte post alo-TPH de 0.72 (IC 95% 0.55-0.93), esto supone que la presencia de expresión centromérica B se comportaría según este artículo como un factor protector en la LMA (43).

#### **5.1.2. Otros receptores de superficie de las células NK**

Pese al importante papel que desempeñan los receptores KIR en la función de las células NK existen otros receptores de superficie de estas células, implicados en la actividad citotóxica o en la regulación de dicha actividad, que se han relacionado con la presencia o ausencia de MRD en pacientes con LLA pediátrica.

En primer lugar, cabe destacar que los pacientes que presentaban MRD tras el tratamiento quimioterápico tenían una menor expresión de los receptores NKG2A (receptor de inhibición) y NKp46 (receptor de activación) si bien presentaban también una mayor expresión de FAS (receptor de muerte celular) (36). Además las células NK de los pacientes con MRD tenían una menor densidad superficial de FASL (ligando que activa muerte celular en células tumorales) que el grupo de pacientes sin MRD (36).

Por otro lado, otros estudios señalan que los pacientes que recibían tratamiento de inducción con IL-2 para el control de las recaídas presentaban un aumento de 3 veces de células NK que expresan en su superficie CD56bright y CD16+. Destacar que las células CD56bright son precursoras de las células NK maduras que presentan capacidad citotóxica

y expresan CD16+. De igual forma estas células CD16+ presentan en su superficie un aumento de expresión de NKp30 y NKp46 (receptores de tipo NCR de activación). La existencia de estas células en los pacientes se traduce a un aumento de supervivencia libre de enfermedad y una mejora de su supervivencia media (44). El hallazgo de estos receptores NKp46 y NKp30 supone la obtención de mejores resultados en la evolución de la enfermedad y una mejor respuesta al tratamiento. Además, se ha visto que ambos tienen capacidad de inducir directamente células NK CD16+, pero no de inducir a las células NK CD56bright (44). Esto último tiene una gran importancia ya que estudios previos muestran que los diagnósticos *de novo* de LMA frecuentemente tienen células NK que carecen de expresión de los receptores de activación de la familia NCRs, siendo así peor su supervivencia media(45).

Por último, existen diferentes factores intrínsecos de las células tumorales que pueden tener un papel determinante en la vía tumoral de escape a las NK. Algunos ejemplos de esto serían la presencia de ligando C2 en las células tumorales que inhibe el receptor KIR2DL1 o la abundancia de PI-9 intracelular. Este último proporciona a la célula tumoral resistencia frente a la granzima B que es un factor esencial en la citotoxicidad de las células NK (36).

### **5.1.3 “Educación o licenciatura” de células NK**

Como hemos comentado previamente en este trabajo, las células NK expresan en su superficie receptores KIR de inhibición capaces de reconocer el HLA-I de las células del organismo. Esto implica que en condiciones normales las células NK reconocen el HLA-I de las células propias estimulando así sus receptores KIR de inhibición. Esto genera una señal que se integra con el resto de señales que le llegan de los otros receptores de superficie teniendo como resultado la inhibición de las células NK de manera que no se ataquen nuestras propias células. Las células NK con un potencial autorreactivo, porque no reconocen este HLA-I o lo hacen en menor medida, quedan en un estado hiporreactivo. Este proceso es conocido como “educación o licenciatura” de las células NK (46), proceso crucial en la tolerancia de células NK.

Estas células NK no licenciadas pueden jugar un papel importante en el pronóstico de las leucemias ya que son capaces de activarse después de un alo-TPH consiguiendo que adquieran sus funciones efectoras a pesar de no reconocer el HLA-I (47) (48). Sin embargo, no todos los artículos apuntan en la misma dirección y Bjorklund et al. sostienen en su estudio que las células NK sin receptores capaces de reconocer el HLA propio permanecen hiporreactivas después de un alo-TPH (49).

Además, más recientemente se ha comenzado a estudiar el proceso de educación de los KIR activadores. Parece que las células NK que expresan KIR2DS1 (receptor activador cuyo ligando es el HLA-C2) solo se activan tras un alo-TPH cuando los donantes tienen HLA-C1/C2 o HLA C1/C1 permaneciendo hiporreactivas si los donantes son homocigotos para HLA-C2. Esto sugiere que la presencia del HLA-C2 en este caso produce células NK hiporreactivas



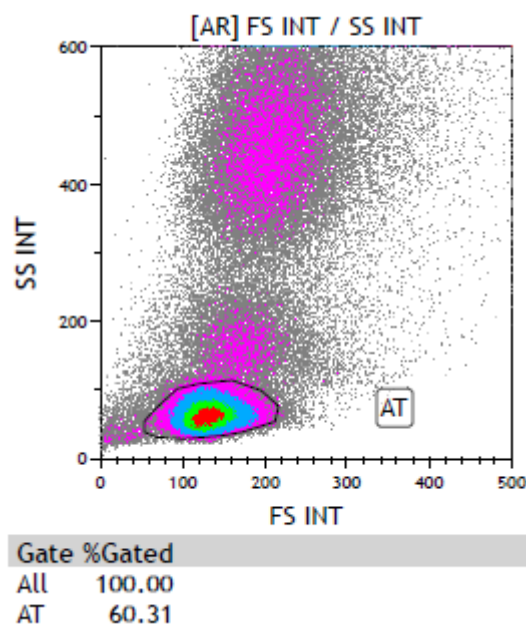
independientemente de sus receptores KIR o NKG2A (39). Así, algunos estudios señalan que existe asociación entre la expresión de KIR2DS1 del injerto tras un alo-TPH en entorno de HLA C1/C1 y una menor incidencia de recaídas (50).

## 5.2. Análisis de células NK

Dadas las restricciones durante los últimos 3 meses, no tuvimos acceso a muestras de leucemia infantil y como ejemplo, se llevó a cabo un análisis representativo con una muestra de cáncer de pulmón. El proceso incluyendo los anticuerpos usados y el posterior análisis, sería el mismo para muestras de pacientes con LLA o LMA infantil.

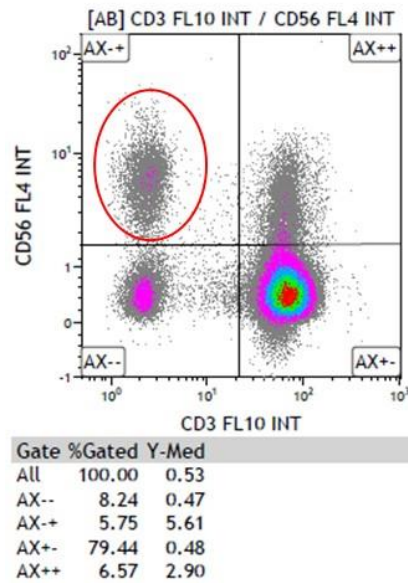
En primer lugar, se representan las células mediante un diagrama de puntos (“dot plot”) en el cual se separan las células que forman parte de la muestra sanguínea según tamaño y complejidad. En esta gráfica se seleccionan la población de células que corresponde a los linfocitos (en la figura 8 aparecen delimitados por un contorno circular negro (AT).

Figura 8. “Dot plot” de una muestra sanguínea de un paciente con cáncer de pulmón. En la tabla se indican el porcentaje de células total (all) o correspondiente a la zona seleccionada (linfocitos, AT).



A continuación, se analizó el marcaje celular con los respectivos anticuerpos (antiCD3 y antiCD56) dentro de la población seleccionada como linfocitos (AT) tal y como se explica en el apartado de material y métodos. Con esto se obtuvo un nuevo “dot plot” que representaba las células positivas para CD3 (canal de fluorescencia FL10, usando como fluoróforo “VioGreen”) frente a las positivas para CD56 (canal FL4, usando como fluoróforo “PerCP Vio700”). En este nuevo gráfico se seleccionaron las células CD3 – y CD56+ que son las que se corresponden con las células NK (en la Figura 9 estas células son las que se encuentran en el cuadrante superior izquierdo y se han resaltado con un círculo rojo).

Figura 9. "Dot plot" de los linfocitos de una muestra de un paciente con cáncer de pulmón marcados con anticuerpos anti CD3 y anti CD56.

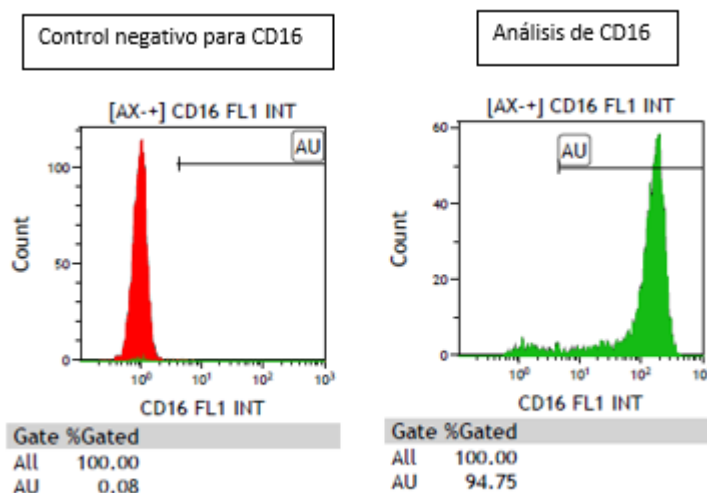


Por último, se analizó la expresión de receptores de activación CD16 y NKp46 y la molécula citotóxica gzmB dentro de la población de células NK seleccionada previamente (CD56+CD3-, marcada con un círculo rojo en la figura 9). Como se ha explicado previamente en el apartado de material y métodos se trata de anticuerpos primarios y cada uno de ellos está unido a un fluoróforo que al ser excitado por el láser emite luz en una longitud de onda distinta de manera que podemos diferenciar unos de otros.

A continuación, se muestran los análisis de los receptores y de la gzmB dentro de la población de células NK. En este caso, al tratarse de un único análisis se muestra la expresión de cada uno mediante un histograma que representa la intensidad de fluorescencia (eje x) respecto al número de células de cada intensidad.

## CD16

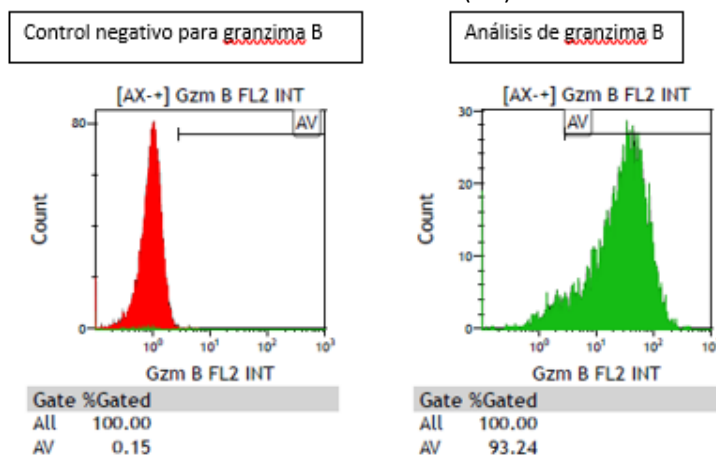
Figura 10. Control negativo de las células NK para CD16 (histograma rojo) y análisis de células NK marcadas con anticuerpo anti-CD16 (histograma verde). En la tabla se indican el porcentaje de células total (all) o correspondiente a la zona seleccionada con la línea horizontal (AU).



Basándonos en el control negativo (figura 10 histograma rojo) establecemos lo que se considera positivo en la expresión de CD16 que es todo aquello que se encuentra incluido en la línea con nombre AU. Como se puede ver en el análisis de las células NK marcadas con CD16 (Figura 10 histograma verde), la mayor parte de la población de células (94,75%) expresan el receptor activador CD16.

## Granzima B

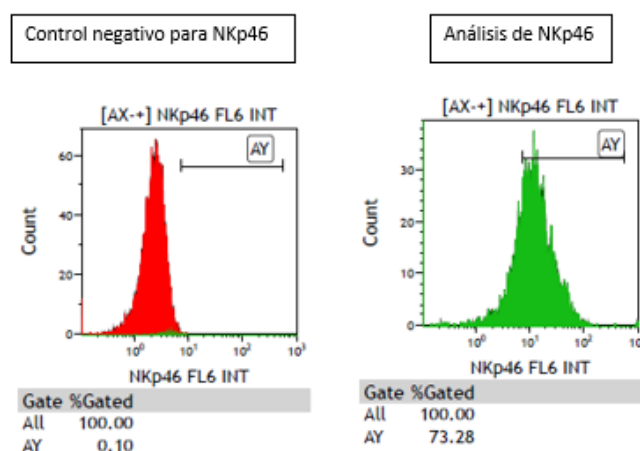
Figura 11. Control negativo de las células NK para la granzima B (histograma rojo) y análisis de células NK marcadas con anticuerpo anti-granzima B (histograma verde). En la tabla se indican el porcentaje de células total (all) o correspondiente a la zona seleccionada con la línea horizontal (AU).



De manera homónima a la realizada con el CD16 en este caso hemos analizado la expresión de granzima B. Aunque el histograma que muestra las células NK marcadas con anticuerpos anti-granzima B (figura 11 histograma verde) presenta una intensidad ligeramente menor que en el caso del CD16, los datos indican que un 93,24% de las células expresan esta molécula de citotoxicidad.

## NKp46

Figura 12. Control negativo de las células NK para el NKp46 (histograma rojo) y análisis de células NK marcadas con anticuerpo anti-NKp46 (histograma verde). En la tabla se indican el porcentaje de células total (all) o correspondiente a la zona seleccionada con la línea horizontal (AU).



En el caso del análisis del NKp46 (figura 12 histograma verde) solo un 73,28% de las células NK expresan el receptor de activación NKp46.

### 5.3 Diseño de un posible estudio futuro

**Tabla 3. Diseño de paneles de citometría de flujo para la búsqueda de marcadores de células NK como factores de pronóstico y respuesta a quimioterapia en pacientes pediátricos con LLA y LMA. (\*), Nombre de los diferentes paneles en función del tipo de marcador y de su función en células NK. Se indica el fluoróforo que lleva unido el anticuerpo y el canal de fluorescencia que ocupa en el citómetro de flujo descrito en Materiales y Métodos.**

*	ANTICUERPO	FLUOROFORO	CANAL
Memoria	CD16	FITC	FL1
	KIRNKAT2	PE	FL2
	CD56	PerCP Vio700	FL4
	NKG2A	PE-Vio770	FL5
	NKG2C	APC	FL6
	CD7	Alexa Fluor700	FL7
	CD57	APC-Vio770	FL8
	KRLG1	BV421	FL9
	CD3	VioGreen	FL10

*	ANTICUERPO	FLUOROFORO	CANAL
Activación	CD16	FITC	FL1
	NKP44	PE	FL2
	CD56	PerCP Vio700	FL4
	NKP30	PE/Cy7	FL5
	NKP46	APC	FL6
	CD7	Alexa Fluor700	FL7
	CD57	APC-Vio770	FL8
	NKG2D	BV421	FL9
	CD3	VioGreen	FL10

*	ANTICUERPO	FLUOROFORO	CANAL
KIR	CD16	FITC	FL1
	KIR2DL3 (CD158b2)	PE	FL2
	CD56	PerCP Vio700	FL4
	KIR3DL1 (CD158e)	PE-Vio770	FL5
	KIR2DL4 (CD158d)	APC	FL6
	KIR3DL2 (CD158k)	Alexa Fluor700	FL7
	CD7	APC-H7	FL8
	KIR2DL1 (CD158a)	BV421	FL9
	CD3	VioGreen	FL10

*	ANTICUERPO	FLUOROFORO	CANAL
Puntos de control	CD16	FITC	FL1
	LAG3	PE	FL2
	NKG2A	PE-VIO615	FL3
	CD56	PerCP Vio700	FL4
	TIM3	PE-Vio770	FL5
	CD107A/LAMP1	APC	FL6
	PD1	Alexa Fluor700	FL7
	CD57	APC-Vio770	FL8
	CD7	BV421	FL9
	CD3	VioGreen	FL10

Con el fin de diseñar un posible estudio futuro se han diseñado los paneles de citometría de flujo indicados en la figura 13 con el fin de buscar la correlación entre la presencia de diferentes subpoblaciones de células NK (definidas por diferentes receptores de superficie) y su nivel de activación y la evolución y respuesta al tratamiento en niños con LLA o LMA. Se trata de un estudio que se está llevando a cabo en el grupo del Dr. Pardo y que he considerado que sería un buen colofón a este TFG para adquirir una pequeña experiencia en el diseño de un estudio clínico en base a los resultados de la revisión bibliográfica.

Hemos seleccionado marcadores que nos permitan analizar la correlación entre células NK adaptativas (de memoria inmunológica), diferentes marcadores y receptores de activación como los NCRs (NKps), CD16 o NKG2D, los reguladores de la actividad de

células inmunológicas conocidos como puntos de control y que se están usando mucho en la inmunoterapia en algunos tumores adultos y un panel de receptores de la familia KIR, que tal y como se ha discutido, tienen un papel clave en la actividad antitumoral de células NK. Además, hemos incluido marcadores de función antitumoral de células NK como CD107a, que indica las células NK que están degranulando (actividad de exocitosis granular) y por tanto han tenido contacto con células tumorales.

Tal y como se ha descrito anteriormente, en todos los paneles se incluye CD16, CD56 y CD3 con el fin de seleccionar las dos subpoblaciones principales de células NK, CD56brightCD3-CD16- y CD56dimCD3-CD16+. Además, se ha incluido el marcador CD7 con el fin de diferenciar las células NK (CD7+) de los blastos leucémicos (CD7-) los cuales pueden expresar CD56 en función del subtipo en el caso de la LMA. Se van a usar los mismos paneles tanto para LLA como LMA con el fin de homogenizar los análisis en citometría de flujo y los correspondientes resultados.

## **1- Diseño estudio**

### **Selección de pacientes**

Utilizaremos como ejemplo una muestra de 100 pacientes (N=100) los cuales presenten LLA y LMA infantil de nuevo diagnóstico.

Tratamiento: los pacientes recibirán el tratamiento correspondiente según las guías terapéuticas actuales explicadas en el apartado de introducción.

### **Muestras:**

Sangre periférica y médula ósea. A diagnóstico y tras la evaluación de respuesta tras los periodos de inducción con quimioterapia. (aprox. Día 36 y a partir de día 70).

Recogidas en el Hospital Miguel Servet y Hospital La Paz. Envío refrigerado en menos de 24 horas a laboratorio en CIBA.

### **Análisis**

Los indicados en la tabla 3.

### **Variables clínicas principales:**

Supervivencia global a 2 y 5 años.

Supervivencia libre de enfermedad.

Respuesta a quimioterapia (Completa, Parcial o Sin respuesta). Evaluada en función del número de blastos en sangre/médula.

## **2- Presentación y aprobación por el CEICA**

## **3- Comienzo del estudio.**

## **4- Análisis de resultados en 2, 5 y 10 años.**

## 6. DISCUSIÓN

Como se ha señalado en el apartado de resultados, uno de los aspectos más interesantes que parece estar relacionado con el pronóstico de las leucemias es el haplotipo de los receptores KIR que expresan las células NK de los pacientes. Hemos leído varios artículos a este respecto y una de las cosas que más nos ha llamado la atención es la falta de consenso existente en la literatura actual. A este respecto hemos encontrado artículos que señalan en todas las direcciones. Así, algunos remarcan que el haplotipo B (haplotipo predominantemente activador) supone un peor pronóstico en la LLA infantil (36); otros afirman lo contrario, que los receptores KIRs activadores están relacionados con un mejor pronóstico de la LLA pediátrica (40); incluso hay algunos artículos en los que no se han hallado diferencias entre el tipo de receptores KIR y el pronóstico de esta leucemia (41).

Concretamente, uno de los resultados más llamativos desde nuestro punto de vista ha sido el que afirma que el haplotipo B supone un peor pronóstico ya que se trata de un haplotipo activador y parece paradójico o contraintuitivo que la presencia de un mayor número de receptores KIR que activen las NK pueda suponer un peor pronóstico para el cáncer (REF). Sin embargo, esto puede tener varias explicaciones plausibles.

Por un lado, podría deberse al fenómeno de educación o licenciatura de las células NK explicado previamente. El aumento de receptores KIRs de activación y la disminución de los receptores KIRs de inhibición puede tener como resultado unas células NK con un potencial autorreactivo mayor de manera que durante el proceso de educación que experimentan estas células, se convertirían en células NK no licenciadas (hiporreactivas) para evitar daños autoinmunes. De este modo serán necesarias señales inflamatorias más potentes que en las células NK licenciadas para activarse y pudiendo suponer por lo tanto un factor de mal pronóstico para el cáncer.

Por otro lado, también debemos tener en cuenta que el estudio que afirma que el haplotipo B se relaciona con un peor pronóstico de la enfermedad estudia la MRD después de un tratamiento de inducción quimioterápico (REF). Sin embargo, el que afirma que los receptores KIRs activadores suponen, por el contrario, un mejor pronóstico, estudia la MRD después de un alo-TPH (REF). Al no haber recibido los pacientes el mismo tratamiento, cabe la posibilidad de que las células NK tengan una respuesta distinta a cada una de estas terapias. Incluso cabría plantearse la combinación de los dos razonamientos anteriores de manera que el haplotipo B tuviera como consecuencia unas células NK hiporreactivas para las cuales la quimioterapia no produciría una respuesta inflamatoria lo suficientemente fuerte para desencadenar la activación de las células NK mientras que el alo-TPH sí que desencadenara señales inflamatorias suficientes para activar estas células NK y producir por lo tanto un mejor pronóstico.

En cualquier caso, queda clara la necesidad de continuar realizando estudios acerca de la influencia de los receptores KIR y sus tipos en el pronóstico de las leucemias ya que puede aportar resultados muy interesantes e incluso señalar dianas terapéuticas para posibles tratamientos de inmunoterapia.

En cuanto a los otros receptores todos los artículos apuntan al importante papel que desempeñan los receptores de la familia de receptores de activación NCR (entre ellos NKp30 y NKp46) no solo en mejorar el pronóstico de las leucemias, sino en proporcionar protección frente a ellas ya que algunos estudios señalan que su falta se podría relacionar directamente con el desarrollo de estas enfermedades (45). De este modo será interesante confirmar si la expresión de estos receptores y de otros relacionados con la activación de células NK suponen un mejor pronóstico en leucemia infantil, en línea con el trabajo futuro en el que se ha basado este TFG (26). Estos estudios no sólo podrán ser usados como herramienta diagnóstica para mejorar el manejo de estos pacientes, sino como base para desarrollar tratamientos de inmunoterapia basados en la regulación de la actividad de estos receptores y de las células NK en general. En esta línea cabe destacar la aparición de anticuerpos monoclonales y otros tratamientos biológicos que reconocen varios antígenos de modo simultáneo para que se unan y activen receptores de activación como NKp46 o NKG2D, de modo que las células NK se activan y se dirigen de modo selectivo a las células tumorales (51)

Por último, me gustaría señalar también la importante labor investigadora que se está llevando a cabo por el grupo de investigación dirigido por el Dr. Julián Pardo (director de este TFG) y al Dr. Ariel Ramírez Labrada (codirector de este TFG) del CIBA, ya que como demuestra la literatura existente este estudio puede tener importantes repercusiones en el pronóstico de las leucemias infantiles más prevalentes. Además, me gustaría agradecer la oportunidad de haber llevado a cabo mi TFG en esta área de conocimiento y haber podido colaborar en la medida de lo posible en este fantástico grupo de trabajo. Para mí ha supuesto la posibilidad de proporcionarme una visión más cercana de la investigación básica y la aplicación de sus resultados a estudios clínico, así como de la forma de trabajar en un laboratorio de investigación.

## **7. CONCLUSIONES**

1. Las células NK juegan un papel primordial en la inmunovigilancia Antitumoral.
2. La expresión de los receptores KIRs y el equilibrio existente entre KIRs activadores y KIRs inhibidores parece tener gran importancia en la respuesta de las células NK contra las células tumorales de tumores infantiles. Sin embargo, es necesario realizar nuevos estudios que aclaren el papel de cada uno de los KIRs en el pronóstico de las enfermedades neoplásicas ya que la literatura actual es discordante a este respecto.
3. La presencia de receptores de activación de la familia NCR (NKp30 y NKp46) supone un mejor pronóstico y una mayor supervivencia en la LLA y la LMA infantil.
4. El aumento del número de células NK CD56bright (precursoras de las células NK CD56dim) se ha relacionado con un mejor pronóstico de la LLA y la LMA infantil relacionado también con el aumento de expresión de receptores de activación de la familia NCR (NKp30 y NKp46).
5. Existen pocas evidencias experimentales sobre la correlación entre respuesta a quimioterapia y recuperación de los niveles de células NK funcionales.
6. Las técnicas de análisis de células NK utilizadas en el laboratorio están optimizadas y nos permitirán realizar el análisis del papel pronóstico de estas células durante el tratamiento con quimioterapia de tumores infantiles.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Gómez Casal F. Leucemias agudas. In: Hematología Grado en medicina. 2016. p. 305–19.
2. Las cifras del cáncer en España 2020 Hombres. SEOM. 2020;
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar;136(5):E359–86.
4. Ruiz Argüelles GJ. Leucemias Agudas. In: Fundamentos de Hematología. 4ª edición. 2009. p. 143–57.
5. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008 Aug;112(3):461–9.
6. Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Sep;132(3):536–44.
7. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J cancer*. 1975 Aug;16(2):216–29.
8. Fauriat C, Long EO, Ljunggren H-G, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010 Mar;115(11):2167–76.
9. Lanuza PM, Pesini C, Arias MA, Calvo C, Ramirez-Labrada A, Pardo J. Recalling the Biological Significance of Immune Checkpoints on NK Cells: A Chance to Overcome LAG3, PD1, and CTLA4 Inhibitory Pathways by Adoptive NK Cell Transfer? [Internet]. Vol. 10, *Frontiers in Immunology* . 2020. p. 3010. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.03010>
10. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008 May;9(5):503–10.
11. Yokoyama WM, Kim S, French AR. The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:405–29.
12. Stabile H, Fionda C, Santoni A, Gismondi A. Impact of bone marrow-derived signals on NK cell development and functional maturation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018 Aug;42:13–9.
13. Renoux VM, Zriwil A, Peitzsch C, Michaelsson J, Friberg D, Soneji S, et al. Identification of a Human Natural Killer Cell Lineage-Restricted Progenitor in Fetal and Adult Tissues. *Immunity*. 2015 Aug;43(2):394–407.
14. Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol*. 2013 Dec;34(12):573–82.
15. Berahovich RD, Lai NL, Wei Z, Lanier LL, Schall TJ. Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression. *J Immunol*. 2006 Dec;177(11):7833–40.
16. Orr MT, Lanier LL. Natural killer cell education and tolerance. *Cell*. 2010

Sep;142(6):847–56.

17. Mamessier E, Sylvain A, Thibult M-L, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest*. 2011 Sep;121(9):3609–22.
18. Sun C, Xu J, Huang Q, Huang M, Wen H, Zhang C, et al. High NKG2A expression contributes to NK cell exhaustion and predicts a poor prognosis of patients with liver cancer. *Oncoimmunology*. 2017;6(1):e1264562.
19. Paul S, Kulkarni N, Shilpi, Lal G. Intratumoral natural killer cells show reduced effector and cytolytic properties and control the differentiation of effector Th1 cells. *Oncoimmunology*. 2016;5(12):e1235106.
20. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:225–74.
21. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*. 1997 Dec;7(6):753–63.
22. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med*. 1998 Mar;187(5):813–8.
23. Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol*. 2011 Feb;89(2):216–24.
24. Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell Mol Immunol*. 2019 May;16(5):430–41.
25. Vivier E, Nunes JA, Vely F. Natural killer cell signaling pathways. *Science*. 2004 Nov;306(5701):1517–9.
26. Leung W. Infusions of Allogeneic Natural Killer Cells as Cancer Therapy. 2014;20(13):3390–401.
27. Shifrin N, Raulet DH, Ardolino M. NK cell self tolerance, responsiveness and missing self recognition. *Semin Immunol*. 2014 Apr;26(2):138–44.
28. Parham P. The genetic and evolutionary balances in human NK cell receptor diversity. *Semin Immunol*. 2008 Dec;20(6):311–6.
29. Brodin P, Karre K, Hoglund P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol*. 2009 Apr;30(4):143–9.
30. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol*. 2018;9:1869.
31. Holmes TD, El-Sherbiny YM, Davison A, Clough SL, Blair GE, Cook GP. A human NK cell activation/inhibition threshold allows small changes in the target cell surface phenotype to dramatically alter susceptibility to NK cells. *J Immunol*. 2011 Feb;186(3):1538–45.

32. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2016 Jan;16(1):7–19.
33. Kim N, Ho H, Lee LH, Choi WS, Lee J, Sik H. Natural killer cells as a promising therapeutic target for cancer immunotherapy. *Arch Pharm Res* [Internet]. 2019;42(7):591–606. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01143-y>
34. Cooley S, Parham P, Miller JS. Strategies to activate NK cells to prevent relapse and induce remission following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2018 Mar;131(10):1053–62.
35. Zingoni A, Fionda C, Borrelli C, Cippitelli M, Santoni A, Soriani A. Natural Killer Cell Response to Chemotherapy-Stressed Cancer Cells: Role in Tumor Immunosurveillance. *Front Immunol*. 2017;8:1194.
36. Sullivan EM, Jeha S, Kang G, Cheng C, Rooney B, Holladay M. NK Cell Genotype and Phenotype at Diagnosis of Acute Lymphoblastic Leukemia Correlate with Postinduction Residual Disease. 2014;1–10.
37. Mizia-Malarz A, Sobol-Milejska G. NK cells as possible prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Dis Markers*. 2019;2019:10–3.
38. Sa J, Valenzuela-vazquez L, Nu JC, Martí JA, Jime E, Medina-sanson A, et al. Functional characterization of NK cells in Mexican pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia : Report from the Mexican Interinstitutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukemia. 2020;1–15.
39. Babor F, Fischer JC, Uhrberg M. The role of KIR genes and ligands in leukemia surveillance. 2013;4(February):1–10.
40. Almalte Z, Samarani S, Iannello A, Debbeche O, Duval M, Infante-Rivard C, et al. Novel associations between activating killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and childhood leukemia. *Blood*. 2011 Aug;118(5):1323–8.
41. Babor F, Manser A, Schonberg K, Enczmann J, Borkhardt A, Meisel R, et al. Lack of association between KIR genes and acute lymphoblastic leukemia in children. Vol. 120, *Blood*. United States; 2012. p. 2770–2; author reply 2772.
42. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, Saeteurn K, Klein J, Le CT, et al. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2009 Jan;113(3):726–32.
43. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, et al. Plenary paper Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. 2010;116(14):2411–9.
44. Martner A, Rydström A, Riise RE, Aurelius J, Anderson H, Brune M, et al. Role of natural killer cell subsets and natural cytotoxicity receptors for the outcome of immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Oncoimmunology*. 2016;5(1):e1041701.

45. Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, Arnoulet C, Sainty D, Olive D, et al. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood* [Internet]. 2007;109(1):323–30. Available from: <http://10.0.4.158/blood-2005-08-027979>
46. Fernandez NC, Treiner E, Vance RE, Jamieson AM, Lemieux S, Raulet DH. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood*. 2005 Jun;105(11):4416–23.
47. Hsu KC, Gooley T, Malkki M, Pinto-Agnello C, Dupont B, Bignon J-D, et al. KIR ligands and prediction of relapse after unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy. *Biol blood marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2006 Aug;12(8):828–36.
48. Yu J, Venstrom JM, Liu X-R, Pring J, Hasan RS, O'Reilly RJ, et al. Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function after T cell-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2009 Apr;113(16):3875–84.
49. Björklund AT, Schaffer M, Fauriat C, Ringdén O, Remberger M, Hammarstedt C, et al. NK cells expressing inhibitory KIR for non-self-ligands remain tolerant in HLA-matched sibling stem cell transplantation. *Blood* [Internet]. 2010;115(13):2686—2694. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC2852367>
50. Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, Chewning JH, Spellman S, Haagenson M, et al. HLA-C –Dependent Prevention of Leukemia Relapse by Donor Activating KIR2DS1. 2012;367(9):805–16. Available from: <http://10.0.4.32/nejmoa1200503>
51. Gauthier L, Morel A, Anceriz N, Rossi B, Blanchard-Alvarez A, Grondin G, et al. Multifunctional Natural Killer Cell Engagers Targeting NKp46 Trigger Protective Tumor Immunity. *Cell*. 2019 Jun;177(7):1701-1713.e16.