

David Giraldos Jimenez

Aproximaciones de inmunoterapia
contra el mieloma múltiple
basadas en las células NK-92:
transfección estable con CD16 y
generación de un NK-CAR anti-
SLAMF7.

Director/es

Anel Bernal, Luis Alberto
Naval Iraberri, José Javier

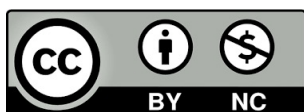
EXTRACTO

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

El presente documento es un extracto de la tesis original depositada en el Archivo Universitario.

En cumplimiento del artículo 14.6 del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, los autores que puedan verse afectados por alguna de las excepciones contempladas en la normativa citada deberán solicitar explícitamente la no publicación del contenido íntegro de su tesis doctoral en el repositorio de la Universidad de Zaragoza. Las situaciones excepcionales contempladas son:

- Que la tesis se haya desarrollado en los términos de un convenio de confidencialidad con una o más empresas o instituciones.
- Que la tesis recoja resultados susceptibles de ser patentados.
- Alguna otra circunstancia legal que impida su difusión completa en abierto.



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral [Extracto]

APROXIMACIONES DE INMUNOTERAPIA CONTRA
EL MIELOMA MÚLTIPLE BASADAS EN LAS
CÉLULAS NK-92: TRANSFECCIÓN ESTABLE CON
CD16 Y GENERACIÓN DE UN NK-CAR ANTI-
SLAMF7.

Autor

David Giraldos Jimenez

Director/es

Anel Bernal, Luis Alberto
Naval Iraberri, José Javier

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2023



Universidad
Zaragoza



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Tesis Doctoral

**APROXIMACIONES DE
INMUNOTERAPIA CONTRA EL
MIELOMA MÚLTIPLE BASADAS EN LAS
CÉLULAS NK-92: TRANSFECCIÓN
ESTABLE CON CD16 Y GENERACIÓN
DE UN NK-CAR ANTI-SLAMF7**

Memoria presentada por

David Giraldos Jiménez

Junio 2023

D. José Javier Naval Iraberri, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, y D. Luis Alberto Anel Bernal, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Aproximaciones de inmunoterapia contra el mieloma múltiple basadas en las células NK-92: transfección estable con CD16 y generación de un NK-CAR anti-SLAMF7**” ha sido realizada por **David Giraldos Jiménez** en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, bajo nuestra dirección y reúne, a nuestro juicio, las condiciones requeridas para que su autor pueda optar al grado de Doctor en Bioquímica por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, mayo 2023

Fdo: José Javier Naval Iraberri

Fdo: Luis Alberto Anel Bernal

Esta tesis doctoral se ha realizado gracias a una subvención destinada a la contratación de personal investigador predoctoral en formación para el período 2017-2021 del Gobierno de Aragón, cofinanciada con el Programa Operativo FSE Aragón 2014-2020 (convocatoria publicada en el BOA nº 238, de 14 de diciembre de 2017; y resolución publicada en el BOA nº 115, de 15 de junio 2018).

1765. No es un número al azar, son los días que han pasado desde que me embarqué en la aventura que ha supuesto esta tesis doctoral. 1765 días desde que empezó el contrato de la DGA hasta que deposité el presente manuscrito. Toda una odisea al más puro estilo Ulises.

No ha sido fácil, pues como él, cada día corrías el riesgo de naufragar en el camino y no llegar a Ítaca. Los escollos han sido múltiples y variados, desde los cantos de sirena de la ATCC mareándonos la perdiz durante medio año, hasta exilios interdepartamentales, pasando por la financiación de los proyectos, múltiples y diversas averías del citómetro, problemas de selección con el *Sorter*, pandemias, o las desesperantes transfecciones con las que daban ganas de saltar por la borda.

Afortunadamente, el barco no iba a la deriva. Contaba con la guía de **Javier y Alberto**, mis directores, a quienes tengo que agradecer por su confianza, ayuda, paciencia, indicaciones y enseñanzas. Dado que los tres somos fans de *Star Wars*, me voy a permitir la licencia de llamaros mis “maestros *Jedi*”. Habéis instruido a este *Padawan* en el camino de la Ciencia, como Obi-wan y Yoda a Luke. Al igual que él, también tuve que acudir a Dagobah para finalizar mi formación con el segundo de ellos, durante la ausencia temporal del primero. Por suerte, ha dado tiempo a cerrar la saga con el episodio “El retorno del *Jedi* **Javier**” antes de terminar la tesis. Hablando de retornos, espero **Alberto** que me sigas invitando a los siguientes torneos navideños, siempre es un placer enfrentarnos. Que la Ciencia os acompañe.

Otra capitana de la flota “**Inmunidad, Cáncer y Células madre**” a quien también quiero agradecer es **Isabel**. Eres fundamental para que los barcos de los distintos proyectos no se vayan a pique, y además sin tu gestión logística seguramente nos habríamos quedado sin provisiones en alta mar. De manera más concreta con respecto a mi investigación, gracias por tu ayuda con la parte de los vectores para las transfecciones, así como las indicaciones en los *labmeetings*. A ti también te debo el sobrenombre de “el hombre tranquilo”, pero sobretodo haberme puesto en contacto con **Susana y OPERON S.A.**, de quién me tocará hablar a su debido momento.

La última oficial en incorporarse a la escala de mando del grupo fue **Eva**. Al principio me agobiabas un poco con todas las preguntas e ideas que se te ocurrían acerca del proyecto, pero reconozco que has conseguido que ahora las vaya a echar de menos, al César lo que es del César. Lo único bueno de irme es que por fin dejarás de darme la tabarra con las CaCo2... Aunque no lo vayas a admitir, sabes que las prácticas de cultivos ya no van a ser lo mismo sin mí y nuestras “matrimoniadas”, pero estaré encantado de repetir como seminarista en BAIM si lo consideras oportuno.

Otra parte esencial de la tripulación han sido los diferentes técnicos que han estado a lo largo de estos años en el departamento: **Ismael, Pili, Manoli, Fina y Sandra**. Gracias por hacernos el trabajo algo más fácil con vuestra ayuda. Por supuesto en ese sentido no puedo olvidarme de **Marta Fajés**, persona clave del departamento sin cuya ayuda la mayoría no habríamos sabido hacer ni la mitad del papeleo.

Volviendo a la odisea que ha supuesto la tesis, no todo ha sido negativo. He aprendido mucho, parte de ello a partir de la horneada anterior de doctorandos del laboratorio, con quién mi interacción fue menor por el inevitable relevo generacional. Me refiero a **Leonor**, **Natalia**, y en especial a **Alfonso** y **Óscar**, que fueron quienes me enseñaron durante el TFM la mayoría de técnicas y todo lo referente al citómetro de flujo.

Pero sobretodo, valoro los compañeros de aventura que he conocido y tenido, de inestimable valor, que han permitido hacer más llevadera esta travesía y con quienes espero no perder por completo el contacto ahora que nuestras rutas de navegación se empiezan a separar. Me refiero a:

Joaquín, o debería decir el Doctor en el Norte. Creo que has sido un punto de referencia para todos los que hemos ido llegando después de ti. Eres paciente, perseverante, leal, trabajador, siempre has estado dispuesto a ayudarnos a los demás y tienes un gran corazón. Vamos, la definición perfecta de un *Hufflepuff*. Enhorabuena por tu progresión en la empresa, me alegra ver como todo el esfuerzo y sacrificio inicial que realizaste en la tesis se está traduciendo en frutos. Aunque ahora que te vas a ir a Madrid después de tantos años en el laboratorio, debo parafrasear a Harry: *“there’s no Laboratory without you”*.

Ana, nuestra incansable activista “pelirroja”. Contadora de historias y chismorreos, siempre estabas al tanto de la actualidad o tenías la habilidad de que te hubiera pasado algo. Cómo aprovechabas para preguntarme sabiendo que yo no tenía reparos en contestar. Por cierto, no sé si llegarías a ver en las cartas que íbamos a acabar en la competencia, pero enhorabuena por tu nuevo puesto.

Paula, la deportista del grupo. Una persona incansable, hay que ver que energía tenías siempre. Claro, supongo que por eso trabajabas con mitocondrias y de ahí sacarías tanto ATP. Había tan buena “bioquímica” con todos nosotros que nadie habría dicho que en realidad pertenecías a un grupo de investigación diferente. El primer torneo del departamento lo jugamos juntos, pero nos quedamos a las puertas de la gloria. Espero que todo te vaya genial por Barcelona.

Chantal, nuestra increíble y deslumbrante organizadora de eventos, no he conocido mejor anfitriona que tú. Es increíble cómo siendo foránea conoces más sitios y contactos en Zaragoza que sumándonos todos los demás autóctonos del grupo. Y además te sobra tiempo para hacer una investigación excelente. Tú me enseñaste a trabajar con las células NK, gracias por tu tiempo, paciencia y comprensión al principio. A cambio yo sólo te enseñé a jugar al guiñote, creo que saliste perdiendo con el intercambio cultural. Eso sí, me llevo el orgullo de haber sido campeones juntos y que el juego y el trofeo traspasen fronteras más allá del “gran charco”. Suerte en tu vuelta a casa, aunque seguro que las empresas se van a pelear por ti.

Nelia, toda una caja de sorpresas. De los que entramos de golpe en el doctorado entre 2017 y 2018 tú fuiste con la que tarde más en interactuar (eso pasa por quitarme el sitio durante mi lapso entre el máster y la tesis y tener que mudarme al laboratorio del citómetro). Sin duda, lo

bueno se hace esperar. Gracias por la intuición que tuviste durante aquel rato entre grupos de prácticas, porque esa conversación fue el inicio de nuestras sesiones mutuas de terapia durante el IVIS. Tranquila que no me quedo sólo con lo malo, también con las ideas para regalos y actividades, tus fotos de viajes para dar envidia sana y las cervezas y partidas al billar. Si quieres la revancha, avisa. ¡Suerte en ~~Valencia~~ Madrid con el post-doctorado!

Andrea, no sé la de veces que te pregunté al principio si la anexina iba con H₂O miliQ y el ABB con PBS, o al revés, hasta que me lo apunté en un *post-it*. La verdad es que al conocernos desde la carrera y ser más veterana en el laboratorio he recurrido muchas veces a ti para preguntas de ese estilo. Que paciencia has debido de tener. Esta tesis no habría sido posible sin ti, pues desde que centralizaron los cultivos de mielomas y te quedaste al cargo tenía que ir haciéndote las comandas de células diana. Gracias también por cuidar de mis NK cuando por congresos o enfermedad no he podido. Tienes un gran carácter y eres trabajadora como ninguna. La dedicación que has puesto es digna de estudio. Pocas veces he ido fuera de horarios y no estabas por el laboratorio, o pocos días miraba el calendario y no tenías reserva en el citómetro. Ánimo que ya queda poco.

Manu, alias *hackerman*. Aunque para ser tan bueno encontrando artículos imposibles, no tienes el FlowJo v10, eh. Aun siendo el más jovencito del grupo durante mucho tiempo has sabido tener galones cuando ha hecho falta. Hemos sido cómplices en nuestras maquinaciones para preparar las prácticas, los seminarios, los proyectos de innovación y las preguntas de los exámenes. Hay que decir que nos han puesto las jefas una fama de exigentes que no me parece a mí del todo justa, no sé qué opinarás tú. Entre las muestras del hospital, transfecciones, electroporaciones y el *Sorter* nos ha caído también cada una... A ver si para cuando haya que recoger dinero para tu regalo de tesis ya me he hecho Bizum...

Javi, qué decir de usted, caballero. Qué habría sido de mi paso por el doctorado sin su apoyo y presencia. Usted me sujetaba en los “momentos ventana”. Se nos han ido las horas en la comida y al bajar de comer hablando de deportes, internet, cine, videojuegos, libros, etcétera, a veces con colaboraciones externas de Joaquín, Martha, Irene, etc. Voy a ser malo y decir que espero que su tesis no sea más larga que el próximo libro de G.R.R. Martin, o también les pondrán un límite de páginas a los futuros doctorandos. Aunque a lo tonto a mí me están saliendo bien largos los agradecimientos. Tranquilo que no va a ser todo meterme con usted, también voy a acordarme de nuestros triunfos en el torneo del deparamento y en las Barlimpiadas. Por cierto, la sogá fue muy fácil de conseguir. La trencé con el plumaje de un pavo, pues como usted sabe, se trata de un “mamífero” muy peludo.

Raquel y Patricia, el dúo dinámico. Dinámico porque ibais de un lado a otro casi corriendo de tantas cosas que teníais que hacer con vuestras levaduras y toxinas. Al estar en laboratorios distintos no hemos interactuado tanto, pero aun así ha habido tiempo para buenos ratos y anécdotas. He oído **Raquel** que regresas, así que bienvenida de nuevo.

Ruth, la tercera en discordia del equipo “lípidos”. Nos conocimos en el máster y he podido ir viendo tu progresión. Has removido cielo y tierra para ir abriéndote camino a base de esfuerzo. Le pones sonido al laboratorio con tu risa contagiosa o con los gritos que pegas, tanto para bien como para mal, según el resultado de los experimentos. Que te vaya bien la experiencia al otro lado del “gran charco”.

Laura y Evelyn, habéis llegado recientemente, pero habéis encajado tan bien que parece que llevarais mucho más. Muchísimas gracias por vuestra ayuda en el experimento de los ratones. Qué curioso todo el vínculo con tu hermano y Diego, **Laura**. Si vuelven a necesitar un portero, que me digan. Y en cuanto a ti, **Evelyn**, cuida bien de mis pequeñas CAR/NK-92-CD16, espero que se porten bien y no te den muchos problemas. Os deseo lo mejor en vuestros proyectos doctorales. Y **Pilar**, el último fichaje doctoral. Algunos dirían que todavía estás a tiempo de huir. Tendrás momentos buenos y momentos malos, como todo en la vida, pero te invito a no desistir. Espero que hagas un buen uso de mi extaquilla, sobretodo que no te la quiten los expansionistas.

No forman parte del grupo de investigación, pero también se agradece el interés, apoyo y conversaciones de otros doctorandos y doctorandas del departamento como **Jorge, Nerea, Cristina, Irene y Martha**. De igual manera, digo lo mismo de otros profesores del departamento como **Fermín, M^aÁngeles, Patricio, Raquel, Pilar, Nuria, M^aJosé y María**.

Aunque no se hayan quedado, ha habido más personas que han pasado por el laboratorio de las que me quiero acordar, como por ejemplo **Elena, Deisy** (nos tienes que decir el secreto de la eterna juventud), **Olaia y Alba** (espero que te vaya genial por la empresa). Asimismo, de otras personas que acaban de llegar al grupo o todavía continúan, como **Andrea, Mario y Cristina**, que vaya desparpajo que tienes. Mucho ánimo que solamente estáis al principio del camino.

Obviamente, también tengo que agradecer por seleccionar este proyecto a la **DGA**, que al fin y al cabo ha sido la benefactora que ha financiado toda esta expedición científica.

También me gustaría acordarme de varias personas del CIBA. Primero de **Julián Pardo**, que fue quien nos cedió las células NK-92, y su grupo. En el incluyo a **Pilar Lanuza**, que me socorrió las primeras veces que tuve que ir por allí, y **Sandra**, que además de las células NK-92 me dio las tres reglas para cuidarlas, como a los *Gremlins*. También a **Cecilia, Ariel, Llipsy y Maykel**, que ya fuera con los ratones o el Incucyte pero me explicasteis lo que hiciera falta. Más personal que han tenido su granito de arena son **Bea y Godino** (aunque dio problemas al principio, vuestro trabajo con el *Sorter* resultó esencial para seleccionar las células), y **Eduardo Romanos**, gracias por tu colaboración e implicación en el experimento con los ratones.

Por otra parte, he de agradecer a los Servicios de Hematología del Hospital Universitario Miguel Servet y del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, por el acceso a las muestras de pacientes, y al **Dr. Palomera** por su suministro de daratumumab.

A nivel hospitalario también tengo que darle las gracias a todo el personal radiofísico del departamento de Física y Protección Radiológica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa por su colaboración y ayuda a la hora de irradiar las células. Especialmente a **Javier Jiménez**, ha sido un placer trabajar con alguien de la familia que además se explica excelentemente. Me han encantado esas conversaciones mezclando la física y la biología celular. Además, casi nos llevamos el premio al mejor póster de la SEFM-SEPR.

Otro aspecto positivo del doctorado ha sido la docencia, con las prácticas de cultivos celulares y el seminario de BAIM. Contra pronóstico, en una faceta en la que jamás me había imaginado, ha sido de las mejores experiencias de esta etapa. Es por ello que quiero acordarme en este punto de varios profesores que me marcaron durante la etapa estudiantil, como **M^a Carmen, Basilio, Casimiro, Mariano Benito y Carmen Lon** (creo que en esta tesis no he pecado de escueto). En el ámbito universitario, además de a los que ya os he mencionado previamente, destaco a **Luis Martínez Lostao**, quien gracias a las prácticas de cultivos celulares que me impartió tiene mucha “culpa” de que haya acabado en este grupo de investigación con las células NK. No me olvido del grupo de **Julio Montoya y Eduardo Ruiz Pessini**, donde hice mi TFG (co-dirigido también por **Laura Llobet**) y empecé a trabajar con cultivos celulares.

No solo he tenido profesores a destacar, también algunos alumnos como **Fernando Díez** (lástima que cuando preguntaste para hacer el TFG en el grupo estuviéramos sin financiación), **Diego Artigas** (qué golazo en propia marcaste, a ver cuándo vuelves de Francia y echamos otro supercoto) y **Nuria Sancho**, mi alumna de TFG. Gracias por hacer tan fácil y llevadera la experiencia, y por preguntar siempre el por qué y para qué de las cosas. Ya siento que los resultados no fueran más agradecidos, pero las hipótesis no siempre son correctas. Te deseo lo mejor por la rama de las ciencias forenses. Hago aquí énfasis con **Gabriel Sánchez**, el as del billar y los dardos, co-fundador de las Barlimpiadas®. Gracias por tu preocupación y sentido del humor, y como destaca Javi, por tu madurez. Es una pena que vayas a irte de la ciudad, que te vaya genial.

Aunque hayan pasado 1765 días desde que empecé la tesis, en realidad me embarqué mucho antes en esta aventura (al igual que Ulises, que si no hubiera ido a Troya luego no habría tenido que pegarse semejante viaje de vuelta). En este caso, mi Troya fue el grado de Biotecnología (y ojalá las células NK-92-CD16 terminaran siendo mi caballo de Troya particular en la lucha contra el cáncer). Mientras escribo estas páginas hace ya más de una década que empecé en la Universidad un 17 de septiembre de 2012, con cambio *in extremis* de grado afortunadamente, porque no tenía muy buena “química” con mi segunda elección. A pesar de ello, el principio no fue especialmente alentador.

Por suerte, al igual que cuando empecé el doctorado, pude hacer grandes amistades con las que arrimar el hombro y remar hacia adelante: **María** (aunque hayamos acabado siendo competencia directa, espero que no dejes de tratarme igual de bien que aquel día en secretaría), **Edu** (compañero de fatigas durante buena parte del grado, no sé cómo haces para mantener esa sonrisa y entusiasmo incansable a pesar de todas los contratiempos que has ido teniendo

por el camino de la ciencia, porque algunas han sido para coger, levantarse de la mesa e irse), **Isa** (gracias por esas invitaciones para desconectar o para ir a la Romareda. Parece mentira que en todo este tiempo no haya sido capaz el Real Zaragoza de ascender todavía, a ver si la próxima temporada es ya la definitiva), **Iratxe** (la mejor maestra de experimentación animal que pude tener), **David Martínez** (confío en que ahora que voy a recuperar mi tiempo libre podamos retomar nuestros duelos Carlsen-Nakamura), **Helena** (la pionera en doctorarse del grupo, y una mente maravillosa capaz de compaginar siempre mil cosas y además todas ellas bien hechas), **Jéssica** (ojalá haber tenido tu habilidad novelística para escribir más rápido la tesis), **Patri** (gracias por esos soplos confidenciales desde el Vall d'Hebron, suerte con la estancia ahora por Seattle), **Vero** (espero todo os siga yendo bien por Alemania, si vuelvo a pasar cerca de Múnich esta vez avisaré con más antelación), **Dani**, y **Javi** y **Andrea** (que ya habéis tenido vuestro propio párrafo antes).

Como cabía esperar, mención especial para **Ángela**. A pesar de que decidir quedarme con la beca y la tesis fueron factores que contribuyeron a que nuestros rumbos se separasen, siempre me has seguido apoyando y he podido contar contigo. Tu prisma me permitió ver la luz entre la tormenta y evitar caer en los remolinos. Gracias. Por cierto, no sé si seguirás guardando la **TARDIS**, pero a partir de ahora ya podré tratar de hacerme el gracioso y decir “*trust me, I’m The Doctor*”.

Gracias **Biosexyomics** por estos más de 10 años de “sufrimiento” relativamente compartido, de historias juntos, las innumerables horas pasadas en el **Capone** (jugando al fútbolín, a los dardos o simplemente tomando algo), esos trabajos grupales en las mesas de los pasillos, las quedadas lúdicas en el **Multiverso** u otros lugares, y los viajes habidos y por haber. ¡**Sahña** para todos!

Ellos no han sido los únicos amigos que me han apoyado durante estos años. Gracias por un lado a **Bayona, Raúl, Mario, Diego, Pedro, Pablo, Serrano, Valentin** y **Héctor** (ahora también conocido como “Chef Maxi”), y por el otro a **Sergio, Josemi** y **Juan**, por preguntar por mis células asesinas, por interesarse por el estado del proyecto y qué iba a hacer después, y por aguantar que haya sacrificado planes por la tesis. Espero dejarme ver más en adelante. Para vosotros ya tendré dedicatorias más específicas ahora que vamos a empezar la temporada de las bodas.

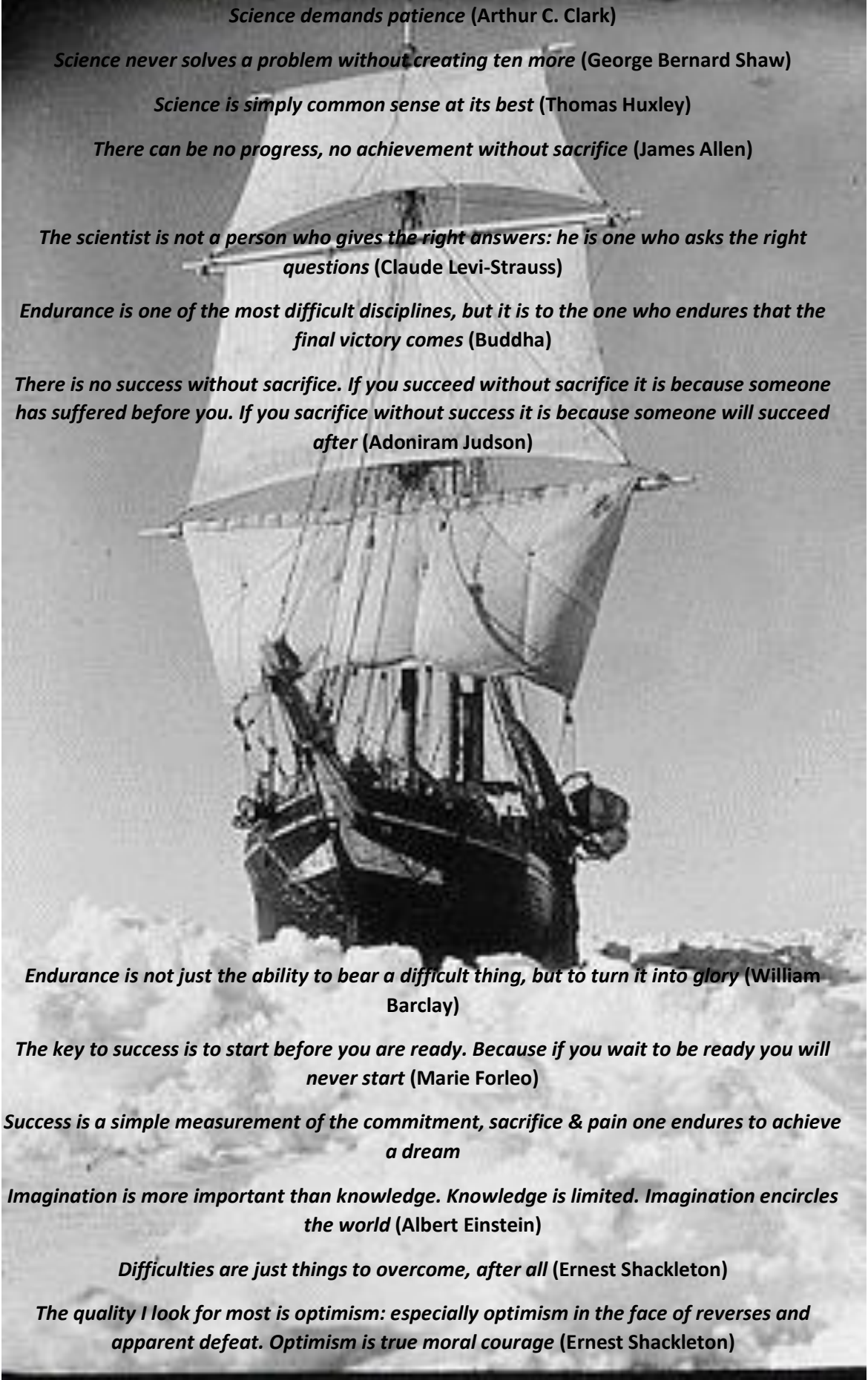
De todas formas, no deja de resultarme irónico que cuando empecé el grado yo tenía clarísimo que no iba a hacer la tesis, y mírame ahora, Doctor y todo, quién me lo iba a decir. Las vueltas que da la vida. Buena culpa de ello tiene **Javier** y el TFM que me dirigió, así como las ganas de probarme a mí mismo y saber si era capaz de seguir con la investigación. Es cierto que mientras escribo estas líneas he terminado en la industria, pero no ha sido por descontento con el mundo académico, sino por el devenir de las circunstancias.

Llegados a este punto quiero agradecer también precisamente a **Tomás y Susana** por haber confiado en mí para formar parte de **OPERON S.A.** y por su paciencia para estar compaginando los compases finales de la tesis con el trabajo. La verdad es que no podía tener mejores compañeros porque desde el primer día me he sentido como en casa, el ambiente que hay es magnífico, y en los momentos de estrés todos hemos ido a una. Gracias a **Sara** (por todas tus enseñanzas sobre el mundo de los coloides y las inmunocromatografías), **Lorena** (por tu ayuda a calibrar el ojo y sobretodo por tu excelente labor), **Bea B.** (por tener a alguien con quien hablar de fútbol y la Fórmula 1), **Rodrigo** (entre zurdos turiasonenses nos entendemos), **Bea M.** (¿o debería decir, EntamoBea? Gracias por ser tan concienzuda en tus explicaciones), **Iris** y **Natalia** (compañeras de penurias con la Evaluación de Funcionamiento), **M^a Ángeles** (siempre velando por nuestros derechos y seguridad), **Rachel** (fuente de noticias y, lo más importante, muestras a buen precio), **Camelia**, **Elena A.**, **Arantxa**, **Bea E.**, etc. Podría seguir, pero no me caben los 92 nombres de la plantilla que había cuando hicimos el concurso de quién sabe más de la empresa.

CCGgcgcgcgcg**ACCgcgatggcgcgcgcg**taactGgcggtgctgaccattatggcgccggaacgcagccagaacgcg
gaaaacgcgccggcgcggaatgcgaacgcgaaaacatgattgtgattgatgcgtaactGgaaatggaaagcatttatgaaaac
gaaagcgcgattagcccgcgagctgcgaacaggtggaactggcggtggaaaacattcgcaaccaggtgagccgcgaaagcg
aacgcgtggaaatggaagcgctggaaggccgccaggtgaacatgcggtggaacgcaccgaatgccagaaccagtgattgat
cagtaactCGcagcgacccgtgagctgcgcgcgacccgcgagcaccgtgagccagaaccgcattagcgcggtataccgtgattaa
CACcgaacgcgaaagctaaTTTcagcgctgaacgatgaacgcagcaccgcgaacgatattaaCGGcatgtatatgattaa
CGAtgaagtggaaaactggcatgaaaacatttgccagaactttgtgagcgaagcgaacattatggcgctgaaaattaaCGGcga
tcagatgagctaaCCGcagcgacccaggatcagaccgtggcgccgcagtatcagccggcggtgcattgaaaactgcattgcgtat
tgccagatgccgcgcgaaaacagcattcagaacgaaagcaccagagcatggaaagcgaaagctaaGATgcgaaacaaaga
ataaATGgaacgctgcatttaaACccatgcgaacaaaagctaaGGCcgcgctgcattgcgagctaa

Y, por último, aunque en realidad son los más importantes y los que han estado desde el principio, agradecer a toda mi familia. A mis abuelos, tíos y primos en **Tarazona**, preguntando si se han muerto las células o no, si crecen o no crecen, etc. Gracias porque los viajes “al pueblo” han sido de las mejores válvulas de escape para desconectar de los problemas de la tesis. A mis hermanas **Belén** y **Laura**, por alegrarme y amenizarme los días. Y a mis padres, **Jesús** y **Milagros**, gracias por los valores que me educasteis y hacerme como soy, por apoyarme y por aguantar estos años de caos en los que a veces según el experimento ni sabía si iba a bajar a cenar.

Al final, entre **Todos** conseguimos llegar a buen puerto, **GRACIAS.**



Science demands patience (Arthur C. Clark)

Science never solves a problem without creating ten more (George Bernard Shaw)

Science is simply common sense at its best (Thomas Huxley)

There can be no progress, no achievement without sacrifice (James Allen)

The scientist is not a person who gives the right answers: he is one who asks the right questions (Claude Levi-Strauss)

Endurance is one of the most difficult disciplines, but it is to the one who endures that the final victory comes (Buddha)

There is no success without sacrifice. If you succeed without sacrifice it is because someone has suffered before you. If you sacrifice without success it is because someone will succeed after (Adoniram Judson)

Endurance is not just the ability to bear a difficult thing, but to turn it into glory (William Barclay)

The key to success is to start before you are ready. Because if you wait to be ready you will never start (Marie Forleo)

Success is a simple measurement of the commitment, sacrifice & pain one endures to achieve a dream

Imagination is more important than knowledge. Knowledge is limited. Imagination encircles the world (Albert Einstein)

Difficulties are just things to overcome, after all (Ernest Shackleton)

The quality I look for most is optimism: especially optimism in the face of reverses and apparent defeat. Optimism is true moral courage (Ernest Shackleton)

La terapia celular adoptiva y el uso de anticuerpos monoclonales son dos modalidades de la inmunoterapia que se han combinado a lo largo de este trabajo. Por un lado, se han utilizado diferentes células asesinas naturales (NK), y por el otro, el anticuerpo anti-CD38 daratumumab.

Daratumumab se combinó inicialmente con células NK activadas y expandidas (eNK) *in vitro*, siguiendo un protocolo desarrollado con anterioridad en nuestro laboratorio. Esto resultó en una considerable actividad citotóxica sobre líneas celulares de mieloma múltiple (MM) humano. Dicha actividad fue dependiente mayoritariamente de la vía de los gránulos citotóxicos (perforina/granzima B), mientras que los ligandos de los receptores mortales sólo ejercían un efecto minoritario en base a la sensibilidad propia de cada línea. El problema de estas células para ser consideradas como el modelo sobre el que seguir trabajando radicó en la variabilidad entre donantes a partir de los cuales se extraían las células NK para ser activadas.

Como alternativa de modelo se utilizó la línea celular NK-92. Estas células presentaban una actividad citotóxica mayor que la de las células eNK, aunque en este caso exclusivamente dependiente de la vía de los gránulos citotóxicos. No obstante, al carecer de la expresión del receptor CD16 no podían ser utilizadas junto a daratumumab. Se realizó por lo tanto una transfección para resolver ese punto crítico mediante una modificación genética. Una vez confirmada la expresión de CD16 en la nueva línea NK-92-CD16 generada, y su estabilidad, se ensayaron estas células en combinación con daratumumab sobre líneas celulares de MM humano. Los resultados obtenidos sobre dichas líneas *in vitro* fueron excelentes en múltiples condiciones (cultivos en 2D y en 3D, a ratios efector-diana muy bajos, etc). Si bien la modificación genética no alteró la dependencia exclusiva de la ruta de los gránulos citotóxicos, sí que parece que aumentó la expresión de moléculas citotóxicas implicadas en ella y en otras vías (granzima B y TRAIL). En vista del potencial terapéutico mostrado, las células NK-92-CD16 se enfrentaron en presencia de daratumumab a células plasmáticas de diversos pacientes de MM. A pesar de tratarse de muestras reales más complejas, los resultados fueron positivos, llegando incluso a revertir situaciones de resistencia a tratamientos previos.

La irradiación de las células NK-92-CD16 por cuestiones de seguridad a la hora de ser administradas a los pacientes no pareció repercutir gravemente en su actividad citotóxica, aunque sí garantizó anular su potencial replicativo a tiempos superiores a 48 horas.

Posteriormente, sobre este modelo de células NK-92-CD16 se generó un receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-SLAMF7 con una segunda modificación genética. Se consiguió una transfección estable del CAR, pero el porcentaje de células positivas no superó el 50% y su actividad citotóxica sobre las líneas de MM no fue superior a la de las células NK-92-CD16.

Finalmente, se llevó a cabo un experimento *in vivo* en un modelo de ratones inmunodeprimidos NSG xenoinjertado subcutáneamente con el MM humano MM.1S-GFP-Luc. Aunque no llegaron a obtenerse resultados estadísticamente significativos, la tendencia positiva obtenida sobre todo en el grupo tratado con las células CAR-NK-92-CD16 anti-SLAMF7 combinado con daratumumab indica la actividad terapéutica del modelo celular generado.

ABREVIATURAS

7AAD: 7-aminoactinomicina D, *7-Amino-Actinomycin D*

aa: aminoácidos

AB: Antibiótico, *Antibiotic*

ABB: Buffer de unión a anexina-V, *Annexin-V Binding Buffer*

ADCC: Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo, *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*

ADCP: Fagocitosis Celular Dependiente de Anticuerpo, *Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis*

ADP: Adenosín Difosfato, *Adenosine Diphosphate*

APAF1: *Apoptotic Protease Activating Factor 1*

APC: Célula Presentadora de Antígenos, *Antigen-Presenting Cell* (en un contexto inmunológico)

APC: Alofococianina, *Allophycocyanin* (en un contexto de citometría de flujo y fluoróforos)

APS: Persulfato de Amonio, *Ammonium Persulfate*

ASCT: Trasplante Autólogo de Células Madre, *Autologous Stem Cell Transplantation*

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATP: Adenosín Trifosfato, *Adenosine Triphosphate*

BCA: Ácido Bicinconínico, *Bicinchoninic Acid*

Bcl-2: *B-cell lymphoma-2*

BCMA: *B-Cell Maturation Antigen*

BCR: Receptor de Células B, *B-Cell Receptor*

BH: Dominio de Homología Bcl-2, *Bcl-2 Homology domain*

BiKE: *Bi-specific Killer Engager*

BiTE: *Bi-specific T-cell Engager*

BMMCs: Células Mononucleares de la Médula Ósea, *Bone Marrow Mononuclear Cells*

BMSCs: Células del Estroma de la Médula Ósea, *Bone Marrow-derived Stromal Cells*

BSA: Albúmina de Suero Bovino, *Bovine Serum Albumin*

CAR: Receptor de Antígeno Quimérico, *Chimeric Antigen Receptor*

CDC: Citotoxicidad Dependiente del Complemento, *Complement-Dependent Cytotoxicity*

CHO: *Chinese Hamster Ovary*

CIP: Proteínas Inhibidoras del Complemento, *Complement Inhibitory Proteins*

CTG: *CellTrackerTM Green*

CTLA-4: *Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen-4*

DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Peligro, *Danger-Associated Molecular Patterns*

DC: Célula Dendrítica, *Dendritic Cell*

DD: Dominio Mortal, *Death Domain*

DISC: *Death-Inducing Signaling Complex*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetil Sulfóxido, *Dimethyl Sulfoxide*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico, *Deoxyribonucleic Acid*

DNAM-1: *DNAX Accesory Molecule-1*

DR: Receptor Mortal, *Death Receptor*

ECL: Quimioluminiscencia, *Enhanced Chemiluminescence*

EDTA: Ácido Etilendiaminetetraacético, *Ethylenediaminetetraacetic Acid*

EGTA: *Ethylene Glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EMA: Agencia Europea de Medicamentos, *European Medicines Agency*

eNK: células NK expandidas, *expanded Natural Killer cells*

EpCAM: *Epithelial Cell Adhesion Molecule*

Fab: Fragmento de unión a antígeno, *Fragment antigen-binding*

FADD: *Fas-Associated Death Domain protein*

FasL: Ligando de Fas, *Fas Ligand*

Fc: Fragmento cristalizabile, *Fragment crystallizable region*

FDA: *Food and Drug Administration*

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína, *Fluorescein Isothiocyanate*

FSC-H: *Forward Scatter*

GFP: Proteína Fluorescente Verde, *Green Fluorescent Protein*

GSDMs: Gasderminas, *Gasdermins*

GSDMD: Gasdermina D, *Gasdermin D*

HER2: *Human Epidermal growth factor Receptor 2*

HLA: *Human Leukocyte Antigen*

HRD: Hiperdiploidía, *Hyperdiploidy*

HRP: Peroxidasa de Rábano, *Horseradish Peroxidase*

HS: Suero de caballo, *Horse Serum*

IAP: Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis, *Inhibitors of Apoptosis Proteins*

ICAM: *Intercellular Adhesion Molecules*

IFN: Interferón, *Interferon*

Ig: Inmunoglobulina, *Immunoglobulin*

IGF1: *Insulin-like Growth Factor 1*

IGH: Cadena Pesada de las Inmunoglobulinas, *Immunoglobulin Heavy chain*

IL: Interleuquina, *Interleukin*

IMiD: Fármacos Inmunomoduladores, *Immunomodulatory Drugs*

ITAM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*

ITIM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*

JAK-STAT: *Janus Kinase - Signal Transducer and Activator of Transcription*

KIR: *Killer cell Immunoglobulin-like Receptor*

LB: Medio Luria-Bertani, *Luria-Bertani medium*

LPS: Lipopolisacárido, *Lipopolysaccharide*

LTR: Repetición Terminal Larga, *Long Terminal Repeat*

O/N: Durante la noche, *Overnight*

mAb: Anticuerpo monoclonal, *monoclonal Antibody*

MACS: *Magnetic-Activated Cell Sorting*

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MDSCs: Células Supresoras Derivadas de Mieloides, *Myeloid-Derived Suppressor Cells*

MEM: *Minimun Essential Medium*

MFI: Intensidad Media de Fluorescencia, *Mean Fluorescence Intensity*

MGUS: Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto, *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad, *Major Histocompatibility Complex*

MIC-A/B: *MHC class I polypeptide-related A/B*

miRNA: *micro Ribonucleic Acid*

MM: Mieloma Múltiple, *Multiple Myeloma*

MOMP: Permeabilización de la Membrana Externa Mitocondrial, *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*

mRNA: RNA mensajero, *messenger Ribonucleic Acid*

NCR: *Natural Cytotoxicity Receptor*

NK: células Asesinas Naturales, *Natural Killer cells*

NSG: *NOD Scid Gamma*

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PBMCs: Células Mononucleares de Sangre Periférica, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PBS: Tampón Fosfato Salino, *Phosphate-Buffered Saline*

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa, *Polymerase Chain Reaction*

PD-1: *Programmed cell Death protein 1*

PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*

PD-L1: *Programmed Death-Ligand 1*

PE: Ficoeritrina, *Phycoerythrin*

PEI: Polietilenimina, *Polyethylenimine*

PHA: Fitohemaglutinina, *Phytohaemagglutinin*

PRR: Receptores de Reconocimiento de Patrones, *Pattern Recognition Receptors*

PS: Fosfatidilserina, *Phosphatidylserine*

PUMA: *p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*

PVR: Receptor del Virus de la Polio, *Polio Virus Receptor*

RE: Retículo Endoplasmático, *Endoplasmic Reticulum*

RNA: Ácido Ribonucleico, *Ribonucleic Acid*

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno, *Reactive Oxygen Species*

RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*

RT: Temperatura Ambiente, *Room Temperature*

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

scFv: Fragmento variable de cadena simple, *single-chain variable Fragment*

SCID: *Severe Combined Immunodeficiency*

SD: Desviación Estándar, *Standard Deviation*

SDS-Page: *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis*

SFB: Suero Fetal Bovino, *Fetal Bovine Serum*

SI: Sistema Inmunitario, *Immune System*

SLAMF7: *Signaling Lymphoytic Activation Molecule Family member 7*

SMAC: *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*

SMM: Mieloma Múltiple Latente, *Smouldering Multiple Myeloma*

SSC-H: *Side Scatter*

sTRAIL: TRAIL soluble, *soluble TRAIL*

TAE: Tampon Tris-Acetato EDTA, *Tris-Acetate-EDTA buffer*

TCR: Receptor de Células T, *T-Cell Receptor*

TEMED: Tetrametiletilendiamina, *Tetramethylethylenediamine*

TGF-β: Factor de Crecimiento Transformante-beta, *Transforming Growth Factor-beta*

TIGIT: *T cell immunoreceptor with Immunoglobulin and ITIM domains*

TNF: Factor de Necrosis Tumoral, *Tumor Necrosis Factor*

TNFR1/2: *TNF Receptor 1/2*

TRAIL: *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*

TRAILR1/2: *TRAIL Receptor 1/2*

TriKE: *Tri-specific Killer Engager*

UI: Unidades Internacionales, *International Units*

ULBP: *UL16 Binding Protein*

XIAP: *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 EL CÁNCER	3
1.1.1 Visión histórica y evolutiva	3
1.1.2 Bases moleculares del cáncer	5
1.1.3 Propiedades biológicas y características del cáncer	7
1.2 MUERTE CELULAR	10
1.2.1 Apoptosis	11
1.2.1.1 Apoptosis intrínseca	12
1.2.1.2 Apoptosis extrínseca	13
1.2.1.3 Características de la apoptosis	16
1.2.1.4 Alteraciones de la apoptosis	17
1.2.2 Otras formas de muerte celular programada	18
1.3 EL SISTEMA INMUNITARIO HUMANO	20
1.3.1 Conceptos generales	20
1.3.2 Sistema Inmunitario innato	22
1.3.2.1 Células NK	24
1.3.2.1.1 Características generales de las células NK	24
1.3.2.1.2 Mecanismos de activación de las células NK	25
1.3.2.1.3 Mecanismos citotóxicos de las células NK	29
1.3.3 Sistema Inmunitario adaptativo	30
1.3.3.1 Linfocitos T	31
1.3.3.2 Linfocitos B	32
1.3.3.3 Homeostasis de la respuesta adaptativa y generación de la memoria inmunitaria	35
1.3.4 Interacción entre el Sistema Inmunitario innato y el Sistema Inmunitario adaptativo	36
1.3.5 El Sistema Inmunitario y la muerte celular	37
1.3.6 El Sistema Inmunitario y el cáncer	39
1.3.6.1 Inmunoección del cáncer	39
1.3.6.2 Inmunoterapia del cáncer	42
1.3.6.2.1 Terapia celular adoptiva	44
1.3.6.2.1.1 Línea celular NK-92	46
1.4 MIELOMA MÚLTIPLE	49
1.4.1 Características generales	49
1.4.2 Origen y patogénesis	50
1.4.2.1 Eventos genéticos primarios	51
1.4.2.2 Eventos genéticos secundarios	52
1.4.3 Papel del microambiente tumoral	53

1.4.4 Sintomatología y diagnóstico	56
1.4.5 Tratamiento	57
1.4.5.1 Nuevos agentes quimioterapéuticos	58
1.4.5.2 Nuevos agentes inmunoterapéuticos	60
1.4.5.2.1 Anticuerpos monoclonales	62
1.4.5.2.1.1 Daratumumab	63
1.4.5.2.1.1.1 Datos técnicos	63
1.4.5.2.1.1.2 Mecanismos de acción	64
1.4.5.2.1.1.3 Efectos adversos, negativos y resistencia al tratamiento	67
1.4.5.2.2 Otros agentes inmunoterapéuticos	69
2 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	71
3 MATERIALES Y MÉTODOS	75
3.1. CULTIVOS CELULARES	77
3.1.1. Líneas celulares	77
3.1.2. Cultivos primarios	78
3.1.3. Medios de cultivo	79
3.1.4. Materiales y productos utilizados para cultivos celulares	79
3.5.1 Determinación de la muerte celular por citometría de flujo	80
3.1.6 Mantenimiento de las líneas celulares y detección de micoplasmas	81
3.1.7 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)	82
3.1.7.1 Activación y expansión de células eNK a partir de PBMCs	82
3.1.7.2 Activación de linfocitos a partir de PBMCs para generar blastos	83
3.1.8 Obtención de células mononucleares de la médula ósea	83
3.1.9 Congelación y descongelación celular	84
3.2 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	84
3.2.1 Preparación de medios y cultivos bacterianos	84
3.2.2 Obtención de bacterias competentes y transformación bacteriana	85
3.2.3 Extracción y cuantificación de DNA plasmídico	85
3.2.4 Digestión de DNA plasmídico	86
3.2.5 Electroforesis de DNA en gel de agarosa	87
3.2.6 Clonaje de genes de interés en vectores virales	87
3.3. GENERACIÓN DE LÍNEAS ESTABLES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE A PARTIR DE LA LÍNEA CELULAR NK-92	90

3.3.1 Vectores virales para la sobreexpresión estable de proteínas	90
3.3.1.1 Vectores lentivirales para la sobreexpresión estable de CD16.....	91
3.3.1.2 Vectores retrovirales para la sobreexpresión estable de un CAR anti-SLAMF7	92
3.4 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR	94
3.4.1 Citotoxicidad de las células eNK sobre líneas celulares de mieloma múltiple	94
3.4.2 Citotoxicidad de los sobrenadantes de las células NK-92 sobre líneas celulares de mieloma múltiple	95
3.4.3 Citotoxicidad de sTRAIL sobre líneas celulares de mieloma múltiple	95
3.4.4 Citotoxicidad de las células NK-92 sobre líneas celulares de mieloma múltiple	95
3.4.5 Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 sobre líneas celulares de mieloma múltiple, PBMCs y blastos	96
3.4.6 Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 irradiadas sobre líneas celulares de mieloma múltiple	96
3.4.7 Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 sobre líneas celulares de mieloma múltiple en condiciones de cultivo en 3D	97
3.4.8 Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 sobre células plasmáticas de pacientes de mieloma múltiple	98
3.5 CITOMETRÍA DE FLUJO.....	98
3.5.1 Determinación de la muerte celular por citometría de flujo	99
3.5.1.1 Determinación de la translocación de fosfatidilserina	100
3.5.1.2 Determinación de la pérdida de la integridad de membrana	100
3.5.2 Análisis de la expresión de proteínas en la membrana celular por citometría de flujo.....	100
3.5.3 Separación celular por citometría de flujo	102
3.6 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	103
3.6.1 Extracción de proteínas celulares totales	103
3.6.2 Cuantificación de proteínas	104
3.6.3 Separación de las proteínas mediante SDS-Page y transferencia a membranas de nitrocelulosa.....	104
3.6.4 Análisis de proteínas mediante inmunotransferencia y detección de los inmunocomplejos.....	105
3.7 MODELO ANIMAL DE MIELOMA MÚLTIPLE.....	106
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	109

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	111
4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS LÍNEAS CELULARES DE MIELOMA MÚLTIPLE A LA APOPTOSIS EXTRÍNSECA Y A LA CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPO	113
4.2 ESTUDIO DEL MECANISMO DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR DARATUMUMAB (ANTI-CD38) EN COMBINACIÓN CON LAS CÉLULAS eNK SOBRE CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE	118
4.2.1 Obtención, activación y expansión de células eNK a partir de PBMCs.....	118
4.2.2 Caracterización de las células eNK expandidas y activadas	119
4.2.3 Actividad citotóxica de las células eNK sobre líneas celulares de mieloma múltiple.....	122
4.3 ESTUDIO DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDUCIDA EN LAS CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE. PAPEL DE LAS CÉLULAS NK-92	132
4.3.1 Caracterización de la línea celular NK-92	132
4.3.2 Actividad citotóxica de las células NK-92 sobre las líneas celulares de mieloma múltiple.....	136
4.4 ESTUDIO DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR DARATUMUMAB (ANTI-CD38) EN LAS CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE. PAPEL DE LAS CÉLULAS NK-92-CD16	145
4.4.1 Generación de la línea celular NK-92-CD16.....	145
4.4.2 Caracterización de la línea celular NK-92-CD16 generada	151
4.4.3 Actividad citotóxica de las células NK-92-CD16 sobre las líneas celulares de mieloma múltiple	158
4.4.4 Estabilidad de la expresión de CD16 y ZsGreen en la línea celular NK-92-CD16	169
4.4.5 Evaluación del potencial terapéutico de las células NK-92-CD16 en células de pacientes de mieloma múltiple.....	170
4.4.6 Estudio del potencial terapéutico de las células NK-92-CD16 irradiadas.....	179
4.5 GENERACIÓN Y ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE CÉLULAS CAR-NK-92-CD16	184
4.5.1 Generación de la línea celular CAR-NK-92-CD16.....	184
4.5.2 Actividad antitumoral de las células CAR-NK-92-CD16	190
4.6 ACCIÓN DE LAS CÉLULAS NK-92-CD16 Y CAR-NK-92-CD16 EN UN MODELO <i>IN VIVO</i> DE MIELOMA MÚLTIPLE	192
4.6.1 Caracterización de la línea MM.1S-GFP-Luc	192

4.6.2 Efecto <i>in vivo</i> de las células NK-92-CD16 y CAR-NK-92-CD16 en combinación con daratumumab (anti-CD38) en un modelo humanizado de mieloma múltiple.....	195
5. DISCUSIÓN GENERAL.....	203
6. CONCLUSIONES	211
7. APÉNDICE.....	215
8. BIBLIOGRAFÍA	221

INTRODUCCIÓN

1.1 EL CÁNCER

El cáncer es la principal causa de mortalidad en el mundo si no se tienen en cuenta las enfermedades cardiovasculares (Mattiuzzi & Lippi, 2019; Nagai & Kim, 2017). En el año 2020 se detectaron alrededor de 19,3 millones de nuevos casos de cáncer y éste fue responsable de casi 10 millones de muertes en todo el planeta (Ferlay et al., 2021; Mattiuzzi & Lippi, 2019). En base a la tendencia creciente que presenta la incidencia de cáncer, se calcula que esa cifra se duplicará para el año 2060, momento en el que se prevé que superará a las enfermedades cardiovasculares (Mattiuzzi & Lippi, 2019).

A diferencia de otras enfermedades, el cáncer no es una patología única y definida, sino más bien un conjunto de muchas. Hay descritos más de 100 tipos distintos de cáncer, existiendo además subtipos de ellos que pueden encontrarse entre órganos específicos (Hanahan & Weinberg, 2000). Todos ellos tienen en común un crecimiento celular descontrolado en su tejido de origen y la capacidad de diseminación a otros diferentes, produciéndose eventualmente un fallo funcional del organismo que puede provocar la muerte.

No todos los tipos existentes de cáncer tienen la misma incidencia y gravedad. Los que más frecuentemente se diagnostican son los cánceres de mama/pecho (2,26 millones/año), el de pulmón (2,21 millones/año), el de colon y recto (1,93 millones/año), y el de próstata (1,41 millones/año) (Ferlay et al., 2021). En cambio, los que producen más muertes anuales son los cánceres de pulmón (1,79 millones/año), el cáncer de colon y recto (0,92 millones/año), el cáncer de hígado (0,83 millones/año) y el cáncer de estómago (0,77 millones/año) (Ferlay et al., 2021).

1.1.1 Visión histórica y evolutiva

Los datos anteriores reflejan la enorme magnitud que ha adquirido el cáncer hoy en día y subrayan la importancia de la investigación para comprender mejor su compleja biología y desarrollar tratamientos efectivos. Pese a su creciente repercusión en el último siglo, no se trata de un problema exclusivo de la sociedad actual. El primer registro escrito de esta patología es un papiro del antiguo Egipto datado en torno al año 3000 A.C. (Faguet, 2015; Hajdu, 2011). Este documento, conocido como el Papiro Edwin Smith, describe 8 casos de tumores de pecho tratados de eliminar por cauterización y tilda la enfermedad de “incurable”. Otro escrito posterior del año 1500 A.C., el Papiro de Ebers, hace ya referencia a otro tipo de tumores incluyendo los de piel, útero, estómago y recto (Hajdu, 2011).

A pesar de las menciones históricas, la enfermedad permaneció mucho tiempo sin recibir un nombre. Fue Hipócrates (460-370 A.C), considerado por muchos autores el “padre de la medicina”, quien mil años después acuñó el término “cáncer” para referirse a ella (Faguet, 2015; Hajdu, 2011). En realidad, Hipócrates utilizó los términos griegos *carcinos* y *carcinoma* para describir los tumores en función de si producían úlceras o no. Estas palabras, referentes a un cangrejo, fueron elegidas por la similitud que él encontraba entre la forma de las proyecciones del tumor al crecer y dicho animal (Hajdu, 2011). Siglos después el término fue traducido al latín como “*cancer*” por el médico romano Celsus (25-50 A.C) y este nombre ha perdurado hasta la

actualidad. Posteriormente, el médico griego Galeno (130-200 D.C.) utilizó el término “*oncos*” para describir los tumores, dando pie al prefijo utilizado para denominar la rama de la medicina y a los especialistas que tratan el cáncer (Hajdu, 2011).

Estas evidencias podrían hacer pensar que el cáncer es tan antiguo como la especie humana, pero su origen en realidad se remonta mucho más atrás. Así lo atestiguan los hallazgos paleontológicos de tumores en animales de tiempos prehistóricos (Hajdu, 2011). Y aunque se han observado crecimientos tumorales a lo largo de prácticamente todos los vertebrados (Aktipis et al., 2015), las neoplasias no son exclusivas de los organismos de mayor orden. Este tipo de eventos ocurren a lo largo de todo el rango de organismos pluricelulares, incluyendo a los hongos, plantas y algas, y son consecuencia de la evolución (Aktipis et al., 2015; Trigos et al., 2018).

Las estructuras de las redes de expresión y regulación génica actuales son el resultado de la adaptación a las presiones selectivas que han tenido lugar a lo largo de la historia de la evolución (Trigos et al., 2018). Sin duda alguna, uno de los mayores hitos evolutivos que moldearon estas estructuras fue la transición que se produjo de organismos unicelulares a pluricelulares (Trigos et al., 2018). Los organismos pluricelulares se caracterizan por la cooperación de sus células para desarrollar, mantener y reproducir el organismo completo por encima de la integridad de las propias células (Aktipis et al., 2015).

Dicho salto evolutivo supuso la aparición, diversificación e innovación de nuevos genes, redes y procesos que conectaron de forma regulada con los ya existentes en los organismos unicelulares previos (Trigos et al., 2018). Esto, junto con la expresión de nuevas proteínas reguladoras de la señalización intracelular y de la adhesión permitieron establecer una comunicación y coordinación intercelular más compleja (Trigos et al., 2018) y el desarrollo de lo que algunos autores denominan las cinco bases de la vida pluricelular (Aktipis et al., 2015):

- Inhibición de la proliferación: el control sobre el sistema de crecimiento primitivo unicelular limitó la división de las células, pasando de ser continua a producirse sólo en función de las necesidades del organismo durante su desarrollo y mantenimiento (Aktipis et al., 2015).
- Control de la muerte celular: la aparición de la muerte celular programada (*ver apartado 1.2*) permitió eliminar las células o tejidos obsoletos que han perdido su función o dejado de ser útiles al organismo, así como mantener de forma precisa el número de tipos diferentes de células y sus conexiones funcionales (Aktipis et al., 2015).
- Reparto de tareas: gracias a la diferenciación celular surgieron distintos tejidos celulares, cada uno de ellos especializado en funciones concretas (Aktipis et al., 2015).
- Asignación de recursos: con la distribución de funciones, una parte del organismo pasó a encargarse de la obtención y almacenamiento de nutrientes para todas las células del mismo, repartiéndolos en función de las necesidades de cada momento (Aktipis et al., 2015).

- Mantenimiento del medio ambiente: se potenció la adaptabilidad del organismo a través de la capacidad de ajustar el ambiente intracelular en respuesta a señales extracelulares (Aktipis et al., 2015).

No obstante, todos estos avances crearon a su vez una serie de vulnerabilidades en las conexiones entre ambos sistemas. Cuando esos puntos de control impuestos durante la evolución para mantener la homeostasis de los tejidos normales se desregulan, se produce entonces la transformación maligna. Por ejemplo, algunas moléculas y rutas comúnmente desreguladas en el cáncer, tales como Wnt, el factor de crecimiento transformante de tipo β (TGF- β), los receptores con actividad tirosín quinasa, Notch/Delta, el sistema JAK-STAT (*Janus Kinase - Signal Transducer and Activator of Transcription*), Hedgehog, integrinas y cadherinas, evolucionaron originalmente para controlar el crecimiento de los organismos unicelulares durante la transición a pluricelulares (Trigos et al., 2018).

Cuando esos puntos débiles se ven afectados, se generan células tumorales que recuperan muchas propiedades del comportamiento de los organismos unicelulares y la dependencia de sus procesos biológicos (Trigos et al., 2018). De esa forma se produce un cambio en las prioridades de dichas células, que anteponen su propia supervivencia y la de su linaje a la del organismo. Como consecuencia promueven la proliferación celular independiente y actúan en contra de las mencionadas características de la cooperación multicelular (Trigos et al., 2018).

Hay muchos ejemplos fenotípicos que evidencian esa similitud entre las células tumorales y las de organismos unicelulares tales como bacterias y levaduras. Algunos de ellos son el crecimiento competitivo en vez de cooperativo de las células, la dependencia energética de procesos de fermentación como la glucólisis aeróbica y una elevada inestabilidad genómica que favorece la aparición de fenotipos mutantes que permitan sobrevivir bajo condiciones adversas (Trigos et al., 2018).

De hecho, entre los fármacos más usados contra el cáncer se encuentran los dirigidos contra procesos celulares compartidos con los organismos unicelulares, incluyendo pemetrexed (síntesis de purinas y pirimidinas), bortezomib (inhibidor del proteasoma), y paclitaxel y vinblastina (ensamblaje del huso mitótico). Dichos fármacos funcionan debido a la dependencia de los tumores de procesos celulares primitivos, la mayoría relacionados con la proliferación, que tienen descontrolada (Trigos et al., 2018).

1.1.2 Bases moleculares del cáncer

El cáncer es una enfermedad que ocasiona cambios dinámicos en el genoma celular (Hanahan & Weinberg, 2000). Su desarrollo en humanos, denominado carcinogénesis u oncogénesis, es un proceso de múltiples pasos a lo largo de los cuales una célula normal se transforma en tumoral (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011). Cada uno de esos pasos refleja alteraciones genéticas o mutaciones que conducen a la transformación progresiva, la cual se produce de una forma similar a la evolución darwiniana (Foulds, 1954; Hanahan & Weinberg,

2000; Nowell, 1976). Si el cambio genético acontecido confiere una ventaja selectiva para el crecimiento y/o la supervivencia de la célula frente a los sistemas de control del organismo, se desencadena una expansión clonal de la misma (Foulds, 1954; Hanahan & Weinberg, 2000; Nowell, 1976).

Para que una mutación otorgue una ventaja selectiva a la célula y contribuya al avance de la transformación tumoral tiene que producirse uno de estos dos efectos:

- Pérdida recesiva de la función de genes supresores de tumores: estos genes normalmente están asociados al control del ciclo celular o de los daños internos de la célula. Su función es evitar la proliferación en ausencia de señales inductoras (citoquinas o factores de crecimiento) o impedir que una célula con daños intracelulares prolifere perpetuándolos en su linaje. Un ejemplo de esta categoría es p53, conocido como el “guardián del genoma”. Su origen evolutivo se remonta a los organismos pluricelulares primitivos, actuando como centro de regulación para diversos conjuntos de procesos. Pese a su gran relevancia, apenas tiene solapamiento funcional con otras moléculas (Trigos et al., 2018). Esto le convierte en uno de los principales puntos débiles del sistema de control comentados anteriormente. Cuando se detecta que la célula ha perdido la integridad de su genoma, p53 induce la parada del ciclo celular para permitir su recuperación antes de que la célula prolifere. Si el daño producido en el DNA es excesivo y no se puede reparar, entonces p53 induce la muerte celular programada para eliminar del organismo ese genoma alterado (Hanahan & Weinberg, 2000). Esta ruta de señalización se pierde en muchos de los cánceres humanos, de manera que las células anómalas proliferan acumulando mutaciones que llevan a la progresión tumoral (Levine, 1997).
- Ganancia dominante de función de protooncogenes: estos genes codifican proteínas implicadas en el control del crecimiento celular de manera fisiológica. Al sufrir una mutación pueden codificar proteínas activas de forma patológica o sobreexpresarlas, produciendo un crecimiento incontrolado de las células independientemente de la presencia de señales de crecimiento en el entorno. Cuando se produce ese cambio, los genes mutados se denominan oncogenes. En este grupo se encuentran por ejemplo las ciclinas, los receptores de factores de crecimiento y las proteínas citoplasmáticas encargadas de transducir la señal de dichos receptores (Cantley et al., 1991). Un ejemplo concreto es el del oncogen H-Ras, un transductor de señal que al activarse constitutivamente a causa de mutaciones estimula de forma autocrina las rutas de proliferación y supervivencia celular (Hanahan & Weinberg, 2011).

Una vez este suceso tiene lugar, las células transformadas empiezan a proliferar de forma autónoma y descontrolada en el tejido de origen, formando un nuevo tejido o neoplasia denominado tumor primario. Conforme avanza su crecimiento y se van acumulando más cambios genéticos, puede adquirir propiedades invasivas, pasando a considerarse un tumor maligno. Si llegan a extravasarse a los vasos sanguíneos, las células pueden abandonar el tejido originario

y viajar por el organismo colonizando otros tejidos en un proceso conocido como metástasis (Steeg, 2016).

Con todas las mutaciones que se producen a lo largo de este desarrollo, el tumor termina formado por una mezcla de células procedentes de distintas expansiones clonales, fenómeno conocido como interferencia clonal (De Visser & Rozen, 2006). Este modelo policlonal heterogéneo explica por qué el Sistema Inmunitario (SI) puede eliminar eficazmente sólo algunas células cancerígenas o por qué un tratamiento no logra reducir completamente la masa tumoral. Además, existe un modelo de crecimiento jerárquico dentro del tumor, en el que una población de células iniciadoras tendría la capacidad de autorrenovarse, conservar la tumorigenicidad y diferenciarse en el resto de las poblaciones (Hermann et al., 2007). A dicha población se la denomina células madre tumorales (Sancho et al., 2016).

No obstante, los tumores no son simples masas formadas por mezclas de células que proliferan. En los últimos años los investigadores se han percatado de que los tumores son una especie de órganos cuya complejidad se aproxima e incluso supera a la de los tejidos normales y que están compuestos por múltiples tipos celulares que interaccionan entre sí de manera heterotípica. En ellos se pueden encontrar también células normales: células endoteliales, pericitos, células inmunitarias con perfil inflamatorio, fibroblastos y células del estroma asociadas al tumor. El conjunto de todas ellas forma lo que se conoce como microambiente tumoral, el cual tiene un papel activo e importante en la biogénesis y progresión del tumor (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011).

Por último, existen diversos factores de riesgo que hay que tener en cuenta ante la posibilidad de desarrollar un cáncer. Algunos de ellos son prevenibles, como los factores ambientales: obesidad, exposición a radiaciones, la dieta y el consumo de alcohol y/o de tabaco (Blackadar, 2016). Desafortunadamente, otros factores como la edad, el género o la predisposición genética no se pueden evitar. Cualquiera de estos factores puede producir daños en el DNA que favorezcan el inicio o la progresión de la oncogénesis.

1.1.3 Propiedades biológicas y características del cáncer

Tal y como se ha ido comentando, el cáncer es una enfermedad muy heterogénea, tanto por los más de 100 tipos descritos como por la alta variabilidad entre las propias células de un tumor concreto. A pesar de ello, durante su desarrollo las células tumorales adquieren una serie de características que son compartidas por la mayoría de tipos de cáncer humanos (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Esto nos permite reducir las complejidades de la enfermedad a un pequeño número de principios subyacentes, lo que facilita su estudio (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011; Trigos et al., 2018). Estas características se han denominado los “*hallmarks*” o marcadores del cáncer, cuya lista se ha ido ampliando con el paso de los años (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011):

- Señalización proliferativa constante: los tejidos normales controlan meticulosamente la producción y liberación de factores promotores del crecimiento para mantener la

- homeostasis del número de células y la arquitectura funcional del tejido. La ganancia de función de los oncogenes (receptores o transductores de estos factores) genera una señalización positiva y permanente de la proliferación (Hanahan & Weinberg, 2000).
- Evasión de las señales inhibitorias del crecimiento: este tipo de señales detienen el ciclo celular e inducen un estado quiescente. Existen factores solubles, pero también proteínas inmovilizadas en la matriz extracelular o en la superficie de células contiguas que inhiben el crecimiento a través del contacto. Muchas de estas señales inhibitorias dependen de la acción de genes supresores de tumores, por lo que cuando éstos se pierden dejan de tener efecto (Hanahan & Weinberg, 2000).
 - Resistencia a la muerte celular: las células tumorales durante el curso de la oncogénesis y/o durante el tratamiento del cáncer se enfrentan a estreses que en condiciones normales inducirían la muerte celular programada. La ganancia de oncogenes que inhiben este proceso o la pérdida de función de los encargados de inducirla en circunstancias normales lleva a la resistencia contra este mecanismo (Hanahan & Weinberg, 2000).
 - Potencial replicativo ilimitado: las células normales tienen limitada su proliferación por el acortamiento progresivo de los telómeros en cada división realizada, lo que termina resultando en el colapso de los cromosomas y de la célula (Hayflick, 1997). La ganancia de actividad de la enzima telomerasa (oncogén) en las células tumorales permite el mantenimiento de los telómeros y con ello superar el límite replicativo (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).
 - Inducción de angiogénesis: los nutrientes y el O₂ suministrado por los vasos sanguíneos son cruciales para la función y supervivencia de cualquier tejido. El tumor en crecimiento necesita la formación de nuevos vasos sanguíneos que lo irrigen para hacer frente a la mayor demanda de estos factores. Este desarrollo vascular también aumenta las posibilidades de que las células cancerígenas se extravasen e inicien una fase de metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000).
 - Activación de la invasión y la metástasis: esto permite a las células cancerosas escapar de la zona del tumor primario y reubicarse en otras donde inicialmente no tienen limitaciones de espacio o nutrientes. Para ello las células sufren un cambio en el patrón de expresión de las proteínas de adhesión celular y de las integrinas, encargadas de la unión a la matriz extracelular. Para poder abrirse paso entre los tejidos y estructuras las células tumorales también expresan proteasas extracelulares (Hanahan & Weinberg, 2000).
 - Evasión de la eliminación por el Sistema Inmunitario (SI): en realidad, la gran mayoría de cánceres incipientes son eliminados a tiempo por el SI. Los tumores que se diagnostican son los que han conseguido evadir su detección y destrucción a través de la expresión de proteínas de superficie y factores solubles que inhiben la acción del SI (Hanahan & Weinberg, 2011).

- Desregulación del metabolismo energético: la proliferación celular crónica e incontrolada de las células tumorales requiere ajustes del metabolismo para proporcionar energía suficiente que sustente el continuo crecimiento y división celular. En condiciones aeróbicas, las células normales procesan la glucosa primero a piruvato vía glucólisis en el citoplasma, y luego hasta CO₂ en la mitocondria. Bajo condiciones anaeróbicas, la glucólisis es favorecida y apenas se procesa piruvato en la mitocondria ya que consumiría O₂. Otto Warburg fue el primero en observar que las células tumorales alteran el metabolismo de la glucosa limitando su producción de energía a la glucólisis aun en presencia de O₂, llevando a un estado denominado “glucólisis aeróbica”. Esto se conoce como “efecto Warburg” (Hanahan & Weinberg, 2011).
- Desbloqueo de la plasticidad fenotípica (desdiferenciación): en muchos casos el resultado final de la diferenciación celular, un proceso propio de los organismos pluricelulares, es antiproliferativo. Un estado de alta replicación y diferenciación celular no puede coexistir simultáneamente, ejemplificando la incompatibilidad entre los sistemas pluricelulares y unicelulares (Trigos et al., 2018). Las células tumorales consiguen revertir ese estado terminal desdiferenciándose a estados progenitores (Hanahan, 2022).

Todos estos marcadores del cáncer pueden interpretarse como desregulaciones de genes y procesos celulares establecidos durante la evolución de los organismos pluricelulares (Hanahan & Weinberg, 2011; Trigos et al., 2018). Como tal, dichos marcadores se correlacionan con alteraciones de las cinco bases descritas de la vida pluricelular, tal y como se muestra en la *Figura 1.1*.

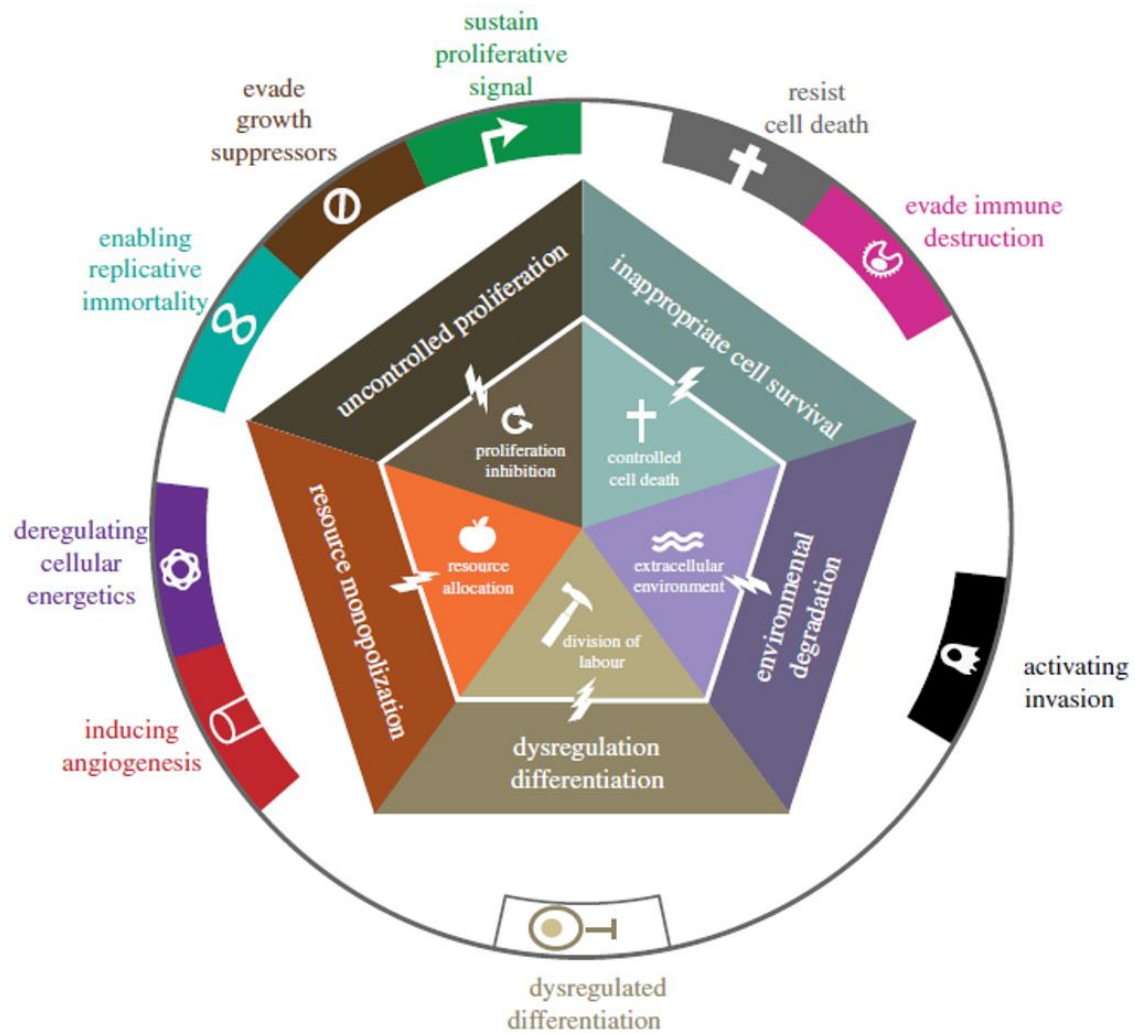


Figura 1.1. Relación entre las bases de la vida pluricelular y los marcadores del cáncer. Los marcadores del cáncer se corresponden con alteraciones en las bases de la vida pluricelular: con su comportamiento unicelular y priorizando su propia supervivencia, las células tumorales alcanzan un estado desdiferenciado perdiendo su función específica en el organismo, proliferan de manera descontrolada, resisten a los estímulos inductores comunes de la muerte celular programada, acaparan recursos del organismo para su propio consumo y alteran y degradan su entorno conforme lo invaden. Imagen modificada de (Aktipis et al., 2015).

1.2 MUERTE CELULAR

Las células, como cualquier entidad viva, terminan muriendo. En el caso de los organismos pluricelulares, tal y como se ha explicado en sus características (ver apartado 1.1.1), muchas células del organismo mueren con el propósito de mantenernos vivos. A lo largo de la historia ha habido distintas clasificaciones de la muerte celular. Actualmente se distingue, en base a aspectos funcionales, entre muerte celular accidental y muerte celular programada (D. Tang et al., 2019).

La muerte celular accidental, también conocida comúnmente como necrosis, ocurre de forma no regulada como resultado de un grave trauma celular (Singh et al., 2019). Por ejemplo, el ataque de muchos patógenos produce necrosis. Otros tipos de traumas como quemaduras, cortes o lesiones por compresión también causan necrosis y a la vez facilitan la infección por parte de patógenos que podrían provocar más ataques (R. C. Taylor et al., 2008).

En cuanto a la muerte celular programada, ésta implica cascadas precisas de señalización muy conservadas evolutivamente. Es ejecutada por un conjunto de moléculas efectoras definidas y tiene consecuencias bioquímicas, funcionales e inmunitarias específicas (Carneiro & El-Deiry, 2020; D. Tang et al., 2019). La primera observación científica al respecto se remonta al año 1842, cuando Karl Vogt observó células muriendo en sapos (D. Tang et al., 2019). Desde entonces se han descubierto y descrito múltiples subtipos de muerte celular programada en función de sus características moleculares y de la respuesta a los distintos estreses causantes (D. Tang et al., 2019). De todas ellas, la más estudiada y fisiológicamente predominante es la apoptosis, responsable de la desaparición de más de 60.000 millones de células de nuestro organismo cada día (Cotter, 2009; Ichim & Tait, 2016; Singh et al., 2019).

1.2.1 Apoptosis

Descrita en 1972 por John Kerr, Andrew Wyllie y Alastair Currie, la apoptosis es una ruta de muerte celular conservada evolutivamente en los organismos pluricelulares (Ichim & Tait, 2016; Kerr et al., 1972; Singh et al., 2019; D. Tang et al., 2019; R. C. Taylor et al., 2008). Permite eliminar las células dañadas, disfuncionales o ya no necesarias de manera segura y controlada, evitando o minimizando dañar y alterar las células vecinas. Los restos de las células apoptóticas son retirados por el SI, y en caso de ser necesario, son reemplazadas por progenie derivada de células madre (Singh et al., 2019; R. C. Taylor et al., 2008). A diferencia de la necrosis, al tratarse de una ruta regulada es un proceso activo que requiere gasto de energía (Singh et al., 2019).

La apoptosis está implicada en procesos fisiológicos como la homeostasis celular, el desarrollo, maduración y mantenimiento de tejidos y órganos, la ejecución de funciones efectoras inmunitarias y la prevención del cáncer (Ichim & Tait, 2016; Singh et al., 2019; D. Tang et al., 2019). Por ejemplo, el desarrollo del cerebro perinatal está asociado con una proliferación masiva de los progenitores neuronales, seguido por una oleada de apoptosis que afecta aproximadamente a la mitad de las células para eliminar las que sobran o las que no han establecido una conexión sináptica apropiada (Singh et al., 2019).

Existen dos subtipos de apoptosis en función de la ruta y los estímulos que la inicien, pero ambos convergen en las proteínas responsables de destruir la célula en última instancia (ver *Figura 1.2*) (D. Tang et al., 2019). Dichas proteínas son las enzimas caspasas, cisteín-proteasas con especificidad de corte tras un residuo de Asp (D. Tang et al., 2019; R. C. Taylor et al., 2008). En condiciones normales las caspasas se encuentran en los tejidos sanos como precursores inactivos (zimógenos). Sin embargo, bajo los estímulos iniciadores de la apoptosis se activan y efectúan la proteólisis de miles de proteínas de la célula resultando en su

desmantelamiento y muerte (Carneiro & El-Deiry, 2020; R. C. Taylor et al., 2008). Dentro de las caspasas se distingue entre iniciadoras y efectoras. Las primeras son capaces de autoactivarse y activar a las efectoras, y las segundas son quienes llevan a cabo la mayor parte de la proteólisis apoptótica (Carneiro & El-Deiry, 2020; R. C. Taylor et al., 2008). Las caspasas 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10 están implicadas en la apoptosis, pero no es el único proceso en el que interviene esta familia de proteínas. Las caspasas 1, 4, 5 y 12 producen inflamación en relación a otros tipos de muerte celular regulada (R. C. Taylor et al., 2008).

1.2.1.1 Apoptosis intrínseca

La primera de las vías de apoptosis es la llamada ruta intrínseca, la cual puede ser iniciada por un amplio abanico de estímulos intracelulares (Bock & Tait, 2020; Ichim & Tait, 2016; Singh et al., 2019). Entre ellos se incluyen daños al DNA (por radiaciones ionizantes, agentes quimioterápicos etc.), daños en los orgánulos celulares, daño mitocondrial, estrés oxidativo, estrés del retículo endoplasmático (RE), inhibición de rutas de señalización intracelular, excesiva estimulación de la mitosis o muerte inducida por oncogenes. Las células también pueden sufrir apoptosis intrínseca por la falta de estímulos propios positivos, como la privación de nutrientes, citoquinas o factores de crecimiento (Bock & Tait, 2020; Ichim & Tait, 2016; Singh et al., 2019). Todos estos estreses apoptóticos tienen en común que terminan provocando la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), un punto clave en la apoptosis que se considera de no retorno (Bock & Tait, 2020; Carneiro & El-Deiry, 2020; Ichim & Tait, 2016).

Debido a su gran relevancia, el proceso de MOMP está muy regulado por interacciones entre los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*), cuyos miembros contienen uno o más dominios de homología con Bcl-2 (BH, BH1-BH4) (Bock & Tait, 2020; Ichim & Tait, 2016; Singh et al., 2019). Dentro de ella hay tres subfamilias:

- Bcl-2 proapoptóticas multidominio: Bax, Bak y Bok/Mtd. Son los efectores centrales de la apoptosis intrínseca. Al ser activadas en la superficie mitocondrial sufren cambios conformacionales y oligomerizan formando macroporos en la membrana externa de la mitocondria, produciendo la MOMP (Bock & Tait, 2020; Carneiro & El-Deiry, 2020; Singh et al., 2019).
- Bcl-2 proapoptóticas sólo BH3: estas proteínas tienen sólo el tercer dominio BH y se encargan de activar directa o indirectamente a las proapoptóticas efectoras (Carneiro & El-Deiry, 2020; Ichim & Tait, 2016). Dentro de ellas se distingue entre:
 - o Activadoras: Bim, Bid y PUMA (*p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*). Se unen y activan directamente a las proapoptóticas activadoras (Carneiro & El-Deiry, 2020). La proteólisis de Bid por la caspasa-8 genera su forma activa tBid (Singh et al., 2019).
 - o Sensibilizadoras: Bad, Noxa, Bik, BMF y Hrk. Su papel es indirecto porque no activan eficientemente a Bax y Bak. Por el contrario, inhiben a las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas, liberando a las proapoptóticas efectoras y a las

proapoptóticas sólo BH3 activadoras secuestradas (Carneiro & El-Deiry, 2020; Singh et al., 2019).

- **BCL-2 antiapoptóticas:** Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Bcl-2-A1, Mcl-1. Contienen los cuatro dominios BH (BH1-BH4) y se encargan de oponerse a la cadena de eventos proapoptóticos. En condiciones basales bloquean la apoptosis uniéndose y secuestrando a los monómeros de Bax y Bak o a las proteínas sólo BH3 (Bock & Tait, 2020; Ichim & Tait, 2016; Singh et al., 2019).

Los niveles de las proteínas de la familia Bcl-2 modulan la sensibilidad y resistencia a la apoptosis (Carneiro & El-Deiry, 2020). Los distintos estreses celulares o señales de daño regulan normalmente de manera positiva a las proteínas proapoptóticas favoreciendo su activación (Singh et al., 2019). Por ejemplo, el daño que produce la radiación ionizante sobre el DNA induce apoptosis mediante el gen supresor de tumores p53. Al no poder repararse el daño producido, p53 induce la transcripción de genes diana proapoptóticos entre los que se incluyen los genes que codifican a Bax, PUMA y Noxa (Singh et al., 2019).

Una vez se ha producido la MOMP, se liberan moléculas apoptogénicas como el citocromo c y la proteína SMAC/Diablo (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*) desde el espacio intermembrana. Cuando estas moléculas se encuentran presentes en el citoplasma, promueven directa o indirectamente la activación de las caspasas (Carneiro & El-Deiry, 2020; Ichim & Tait, 2016; Singh et al., 2019; D. Tang et al., 2019).

El citocromo c interacciona con APAF1 (*Apoptotic Protease Activating Factor 1*) a través de un proceso dependiente de adenosín trifosfato (ATP) y forma un complejo citoplasmático heptamérico. Este complejo, conocido como el apoptosoma, recluta a la procaspasa iniciadora 9 y la activa (Carneiro & El-Deiry, 2020; Singh et al., 2019; Tait & Green, 2010; R. C. Taylor et al., 2008). Ésta, a su vez, activa posteriormente a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 que proceden a proteolizar y destruir la célula (D. Tang et al., 2019). En cuanto a SMAC, bloquea e inhibe a XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*) y a otras proteínas de la familia IAP (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*) que son inhibidores de las caspasas, facilitando así su activación (Carneiro & El-Deiry, 2020; Ichim & Tait, 2016).

1.2.1.2 Apoptosis extrínseca

La otra vía es conocida como la ruta de apoptosis extrínseca. A diferencia de la intrínseca, requiere estímulos extracelulares para ser iniciada.

Estos estímulos son reconocidos por la familia de los denominados receptores mortales (DRs), ubicados en la membrana plasmática. Entre sus miembros debemos citar a Fas (también conocido como CD95), TRAILR1 (*TRAIL Receptor 1*, también conocido como DR4), TRAILR2 (*TRAIL Receptor 2*, también conocido como DR5), TNFR1 (*TNF Receptor 1*) y TNFR2 (*TNF Receptor 2*). FasL (*Fas Ligand*) es el ligando de Fas, TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) es el ligando de DR4 y DR5, y TNF (*Tumor Necrosis Factor*) es el ligando de TNFR1 y

TNFR2 (Carneiro & El-Deiry, 2020; Ichim & Tait, 2016; D. Tang et al., 2019). Los dos primeros, FasL y TRAIL, son los ligandos de mayor importancia fisiológica.

Estos ligandos de los DRs, también conocidos como ligandos mortales, son proteínas transmembrana de tipo II que ejercen su actividad biológica en forma de trímeros (Locksley et al., 2001). Están expresados en la superficie de distintas células, incluyendo varias de las células del SI (*ver apartado 1.3.2.1 y apartado 1.3.3.1*), aunque también pueden ser liberados como ligandos solubles o asociados a exosomas (Anel et al., 1994; LeBlanc & Ashkenazi, 2003; Martínez-Lorenzo et al., 1996, 1999).

Cuando se produce la interacción con sus respectivos ligandos mortales, los DRs trimerizan y se agregan. Esto conlleva el reclutamiento de diversas proteínas a la región intracelular de los DRs gracias a un dominio conservado en ellos conocido como dominio mortal (DD) (Carneiro & El-Deiry, 2020). Las proteínas en cuestión son la proteína adaptadora FADD (*Fas-Associated Death Domain protein*) y las procaspasas 8 y 10. FADD induce la dimerización de cada una de las procaspasas y entre las tres forman el complejo DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*), en el que son proteolizadas y activadas las caspasas iniciadoras 8 y 10. Posteriormente ellas activan a las caspasas efectoras 3 y 7, y éstas a su vez a la 6, conduciendo a la apoptosis (Carneiro & El-Deiry, 2020; Ichim & Tait, 2016; D. Tang et al., 2019).

Al igual que en la ruta intrínseca, en ésta también existen proteínas encargadas de regular negativamente la activación de las caspasas, como por ejemplo FLIP (*FLICE-Like Inhibitory Protein*). Por otra parte, la caspasa 8 además de activar a las caspasas efectoras también puede proteolizar a la proteína de la familia Bcl-2 Bid, generando su forma activa tBid que sirve de puente para conectar ambas rutas apoptóticas. Esta conexión permite amplificar la señalización apoptótica en aquellas células en las que la ruta extrínseca no es suficiente para producir su muerte directamente (Bock & Tait, 2020; Carneiro & El-Deiry, 2020; Singh et al., 2019).

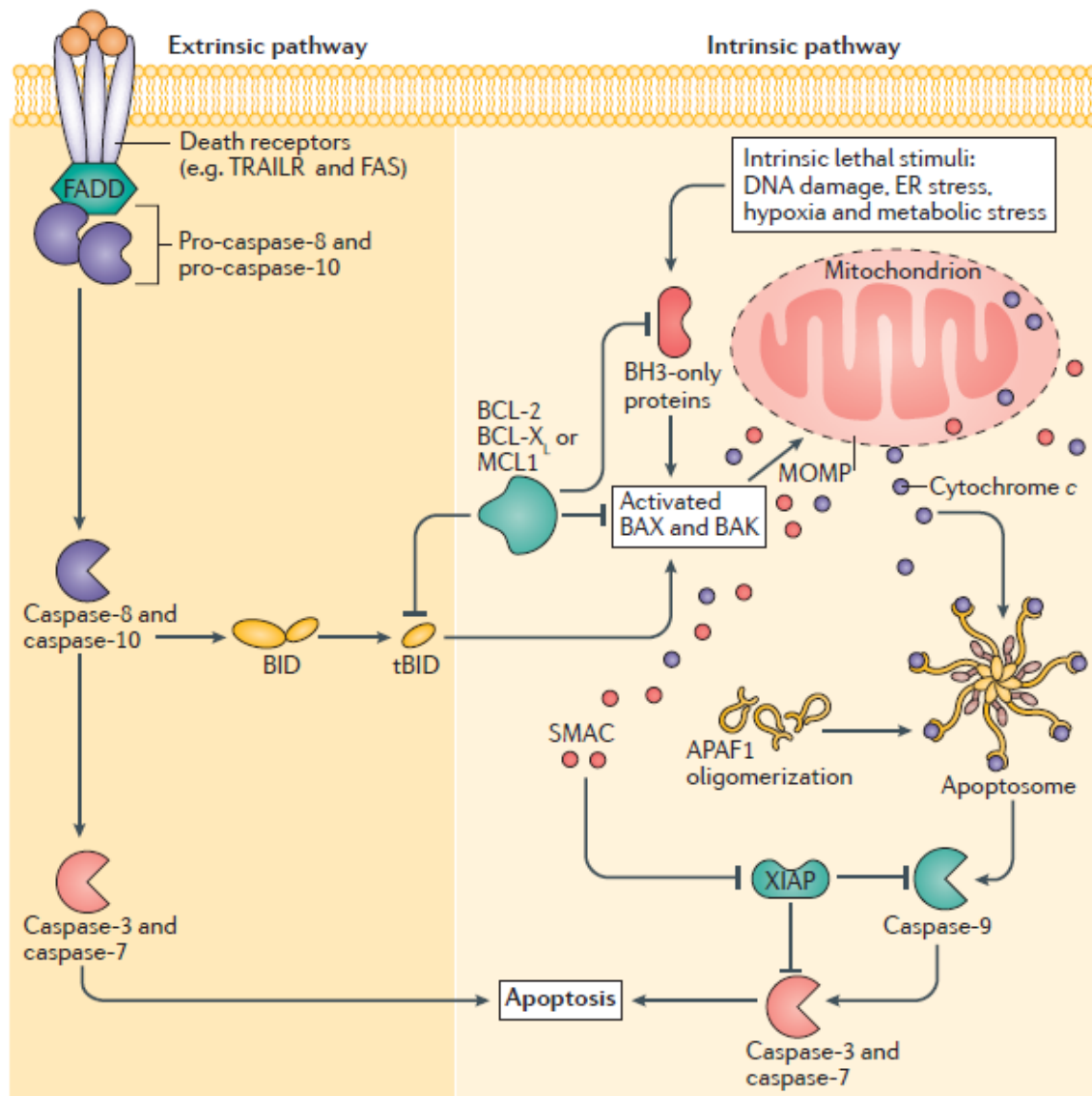


Figura 1.2. Vías de la apoptosis: extrínseca e intrínseca. En la vía extrínseca, una vez que FasL (Fas Ligand) y TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) se unen a sus respectivos receptores mortales (Fas y DR4/DR5), se activan las caspasas iniciadoras (caspasa 8 y caspasa 10) a través de la dimerización mediada por proteínas adaptadoras tales como FADD (Fas-Associated Death Domain protein). Las caspasas 8 y 10 activan a su vez a las caspasas efectoras 3 y 7 que ejecutan la apoptosis. En cuanto a la ruta intrínseca (o mitocondrial), se requiere la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP). Distintos estreses celulares promueven la activación de las proteínas sólo BH3, provocando en última instancia por medio de Bax y Bak la MOMP. Se liberan así proteínas del espacio intermembrana mitocondrial como SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) y el citocromo c al citoplasma celular. El citocromo c al interactuar con APAF1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) induce el ensamblaje del apoptosoma, que activa a su vez a la caspasa 9. Seguidamente, la caspasa 9 activa a las caspasas efectoras 3 y 7 conduciendo a la apoptosis. Imagen tomada de (Ichim & Tait, 2016).

1.2.1.3 Características de la apoptosis

En ambas vías de la apoptosis la acción de las caspasas tiene como resultado la proteólisis de miles de proteínas (Carneiro & El-Deiry, 2020). La degradación de algunas de ellas, como factores de transcripción, factores de inicio de traducción, proteínas ribosomales, enzimas y proteínas constitutivas ocurre sin mayor repercusión que la pérdida de función y la interrupción de los procesos moleculares en los que están involucradas (R. C. Taylor et al., 2008). En cambio, la degradación de otras proteínas implicadas en el mantenimiento de estructuras celulares mayores produce una serie de cambios morfológicos característicos de la apoptosis (Ichim & Tait, 2016; R. C. Taylor et al., 2008).

Este es el caso de la proteólisis de muchos de los principales constituyentes del citoesqueleto celular, incluyendo filamentos de actina, miosinas, tubulinas, etc. También se degradan los sitios de adhesión de la célula a sus vecinas y a la matriz extracelular. El efecto conjunto de estos eventos es que las células se redondean y retraen de las células vecinas en las etapas iniciales de la apoptosis. Después, hay un intervalo prolongado en el que se forman ampollas en la membrana (*blebbing*), ya que el citoplasma fluye contra áreas sin soporte donde el citoesqueleto se ha debilitado (R. C. Taylor et al., 2008).

Las láminas A, B y C también son dianas de las caspasas, resultando en la desintegración de la lámina nuclear y el colapso de la envoltura nuclear. La fragmentación del núcleo lleva a su vez a la degradación del DNA genómico debido al corte de la cromatina por endonucleasas en los sitios internucleosomales (Larsen & Sørensen, 2017; Novo et al., 2022). Posteriormente, las estructuras nucleosomales del DNA hidrolizado se condensan (Carneiro & El-Deiry, 2020; R. C. Taylor et al., 2008).

El núcleo no es el único orgánulo celular que se ve afectado por la acción de las caspasas. El aparato de Golgi, la red mitocondrial y el RE también sufren una fragmentación pronunciada durante la apoptosis (R. C. Taylor et al., 2008). Los fragmentos generados y los orgánulos restantes son redistribuidos en las ampollas apoptóticas, y si éstas terminan escindiéndose pueden quedar empaquetados en pequeñas vesículas independientes conocidas como cuerpos apoptóticos (R. C. Taylor et al., 2008).

Toda esta serie de eventos se producen en un lapso de tiempo de entre 30 y 120 minutos tras la inducción de la apoptosis (Wyllie et al., 1980). Por último, la fase terminal de la apoptosis en condiciones fisiológicas consiste en la retirada de las células moribundas (y sus cuerpos apoptóticos) por parte de los fagocitos, células del SI (*ver apartado 1.3.1*). Las células que sufren apoptosis son rápidamente reconocidas, engullidas y eliminadas gracias a que la membrana plasmática experimenta una serie de cambios bioquímicos. Estas alteraciones sirven de señalización, atrayendo a los fagocitos (R. C. Taylor et al., 2008). Hay varios ejemplos, pero sin duda el mejor caracterizado es la translocación del fosfolípido de membrana fosfatidilserina (PS). En condiciones normales la PS se encuentra confinada en la cara interna de la bicapa lipídica de la membrana plasmática. En cambio, durante la apoptosis, la PS es translocada en un proceso

dependiente de caspasas, a la cara externa de la membrana. Al quedar expuesta, actúa como ligando de reclamo e induce la fagocitosis de la célula apoptótica (R. C. Taylor et al., 2008).

En general, la mayor parte de esta secuencia de cambios morfológicos y bioquímicos pueden ser utilizados como marcadores moleculares de la apoptosis (Ichim & Tait, 2016). Algunos de ellos son detectables directamente a través de la microscopía óptica (cambios morfológicos, *blebbing*), y otros son detectables gracias al uso de sondas fluorescentes a través de la microscopía de fluorescencia (fragmentación del DNA) y de la citometría de flujo (pérdida del potencial mitocondrial debido a la permeabilización y fragmentación de las mitocondrias, y externalización de PS) (Carneiro & El-Deiry, 2020).

Es importante recalcar que a pesar de las alteraciones que sufre, la membrana plasmática mantiene su integridad durante la apoptosis. Esta característica marca una importante diferencia con la necrosis que, al ser una muerte celular accidental no regulada, está acompañada por una rápida pérdida de integridad de membrana y la liberación del contenido celular al espacio extracelular. Esto puede producir daño a las células vecinas y generar una respuesta inflamatoria por parte del SI, (ver apartado 1.3.5) (R. C. Taylor et al., 2008).

1.2.1.4 Alteraciones de la apoptosis

La apoptosis es crucial para mantener la homeostasis en el organismo, pero como cualquier otra ruta molecular puede verse alterada por mutaciones. Tanto la ausencia o el exceso de apoptosis puede llevar al desarrollo de diferentes enfermedades humanas entre las que se encuentran algunas de las primeras causas de muerte en el mundo, tales como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades autoinmunes y las enfermedades infecciosas (Ichim & Tait, 2016; Linkermann et al., 2014; Singh et al., 2019; D. Tang et al., 2019).

La pérdida excesiva de células por una apoptosis desmedida puede ser perjudicial. Es el caso de la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la de Parkinson o la de Huntington (Singh et al., 2019; D. Tang et al., 2019). Por ejemplo, la acumulación de los péptidos β -amiloides en la enfermedad de Alzheimer puede activar la caspasa 3 e inducir apoptosis. Dichos péptidos también regulan negativamente a Bcl-2 y positivamente a Bax, además de producir estrés oxidativo (Paradis et al., 1996; Rohn, 2010). Todo esto lleva a la disfunción y muerte de las neuronas por apoptosis, lo que resulta en la demencia progresiva que eventualmente termina siendo fatal.

De la misma manera que si hay excesiva apoptosis, la ausencia de ella también tiene consecuencias negativas. Si las células que tienen que morir no lo hacen, se empiezan a acumular en el organismo, pudiendo dañarlo por diversos mecanismos. En este sentido, existen varios ejemplos de una apoptosis insuficiente. Es el caso de desórdenes autoinmunitarios como el lupus eritematoso sistémico, en el que se ha observado una alta expresión anormal de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en linfocitos T y B de sangre periférica (Singh et al., 2019). Esto también puede ocurrir en algunas infecciones causadas por patógenos. La bacteria *Mycobacterium tuberculosis* es atrapada e internalizada por los fagocitos, pero es capaz de

sobrevivir dentro de ellos. Para impedir que se induzca la apoptosis de la célula en la que se refugian, la bacteria promueve la producción de la proteína antiapoptótica Mcl-1, que inhibe la apoptosis intrínseca (Singh et al., 2019).

Sin embargo, no hay ningún conjunto de enfermedades en el que se haya caracterizado mejor la apoptosis que en el cáncer. Al inicio de una transformación neoplásica, casi todas las células desregulan el factor de transcripción Myc, el cual controla genes implicados en el crecimiento y la proliferación (Singh et al., 2019). Estos cambios promueven a la vez la inducción de la apoptosis, ya que Myc también controla genes proapoptóticos y la expresión de éstos se ve incrementada. El resultado es una mayor susceptibilidad a la apoptosis y la muerte con frecuencia de las células malignas generadas (Singh et al., 2019). Estos mecanismos protegen al organismo pluricelular de que esas células alteradas proliferen y adquieran un comportamiento “unicelular”.

Por tanto, la evasión de la apoptosis en ese estado de transformación celular es vital para la proliferación continua del cáncer, y la habilidad de suprimir la apoptosis es uno de los marcadores del cáncer (*ver apartado 1.1.3*) (Hanahan & Weinberg, 2000). Para ser capaces de evadir la apoptosis muchos tumores humanos sobreexpresan por ejemplo proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 o la familia IAP, o regulan negativamente proteínas proapoptóticas como Bim, Bid, Bad, Noxa, PUMA, Hrk, Bax o Bak (Carneiro & El-Deiry, 2020; Singh et al., 2019). No obstante, a pesar de ser capaces de sobrevivir a la apoptosis durante la transformación neoplásica, algunos tumores son igual o incluso más sensibles a la apoptosis que sus células de origen (Ichim & Tait, 2016). Es por ello que las células cancerosas, particularmente aquellas de origen hematopoyético, muestran una alta sensibilidad a la quimioterapia citotóxica y a las radiaciones ionizantes (Singh et al., 2019). Aun así, estos tratamientos no suelen erradicar el 100% de las células malignas, resultando en la selección y expansión de las células capaces de desarrollar una mayor resistencia a la terapia (Singh et al., 2019).

1.2.2 Otras formas de muerte celular programada

Aunque la apoptosis es la muerte celular fisiológica predominante, a partir de la década de 1990 se empezaron a descubrir otras modalidades de muerte celular regulada no apoptótica (D. Tang et al., 2019). Entre ellas se encuentran las siguientes (*ver Figura 1.3*):

- **Necroptosis:** aunque las primeras observaciones de este tipo de muerte se produjeron en 1996, no fue descrita como tal hasta 2005 por Junying Yuan. Este tipo de muerte celular se trata de una forma regulada de necrosis, con la que comparte algunas características morfológicas. Se produce únicamente bajo condiciones de inhibición de las caspasas (la inactivación de la caspasa 8 es un requisito). En esas circunstancias, varios estímulos (por ejemplo, la señalización a través de los DRs) pueden terminar induciendo la oligomerización de la proteína MLKL y la formación de poros en la membrana, llevando a su ruptura. Al ser una muerte lítica, se produce la liberación de contenido intracelular al espacio extracelular induciendo una fuerte respuesta

inflamatoria (de Miguel et al., 2022; D. Tang et al., 2019). Está mejor caracterizada en el contexto de la señalización del TNF y su papel fisiológico parece estar relacionado con el SI (*ver apartado 1.3.5*).

- Piroptosis: término acuñado en 2001 por Brad Cookson. Es una forma lítica de muerte celular regulada que presenta diferencias morfológicas con la apoptosis. Se caracteriza por ser ejecutada por miembros de la familia de proteínas llamadas gasderminas (GSDMs). Su principal miembro es la gasdermina D (GSDMD) y es necesaria su expresión en las células para que tenga lugar este tipo de muerte. En caso de expresarse, las GSDMs pueden ser activadas proteolíticamente por las granzimas (*ver apartado 1.3.2.1.3*) o por las caspasas (inicialmente se creía que las proinflamatorias, pero ahora se sabe que también la caspasa 3 es capaz). Una vez activadas las GSDMs por proteólisis, se libera un fragmento amino-terminal con capacidad de oligomerizar en la membrana plasmática, formando poros. La pérdida de integridad de la membrana causa un grave choque osmótico y una rápida liberación de contenido citoplasmático que produce inflamación (de Miguel et al., 2022; Ramírez-Labrada et al., 2022; D. Tang et al., 2019). Esta modalidad de muerte está relacionada también con el SI (*ver apartado 1.3.5*).
- Ferroptosis: descrita por primera vez en 2003, el término se emplea desde 2012 gracias a Brent Stockwell (D. Tang et al., 2019). Consiste en una forma regulada de necrosis, caracterizada por producir un daño terminal en la membrana plasmática a causa de un incremento de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (de Miguel et al., 2022; D. Tang et al., 2019). Dicha peroxidación se debe a la interacción de iones libres de hierro (II) con especies reactivas de O₂ (ROS) en la reacción de Fenton. Esta muerte puede ser por tanto inhibida con quelantes de hierro.

A pesar de ser consideradas generalmente como entidades independientes, estas modalidades de muerte en el fondo están molecularmente interconectadas entre sí y con la apoptosis.

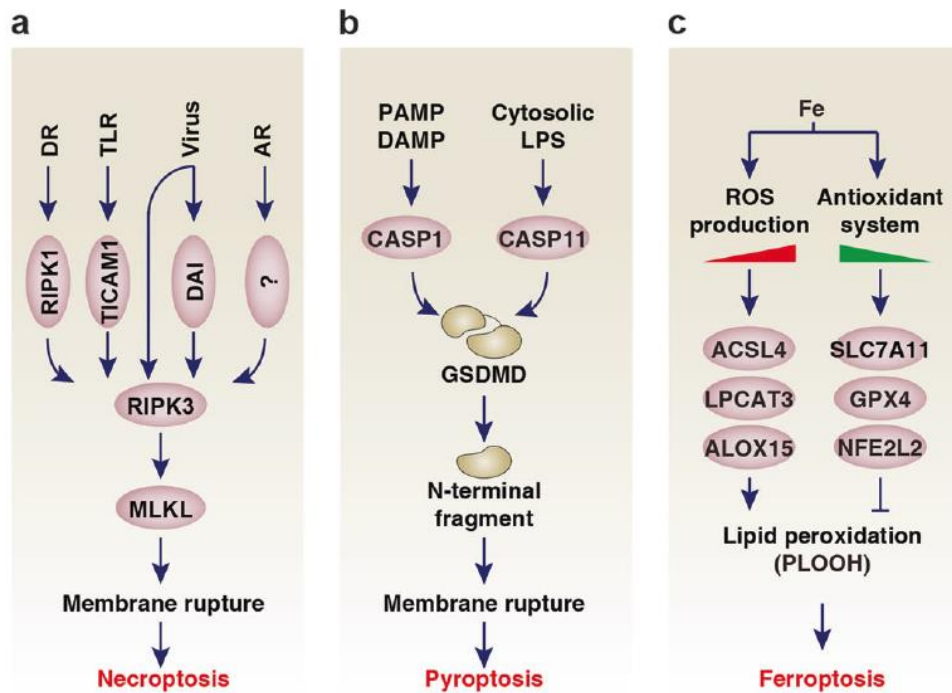


Figura 1.3. Otras modalidades de muerte celular regulada. a) Bajo inhibición de caspasas, distintos estímulos pueden activar a la proteína MLKL para que oligomerice y se produzca la ruptura de la membrana en la necroptosis. Entre los posibles inductores iniciales se incluyen por ejemplo los receptores mortales (DR) y la acción de virus. b) La piroptosis es principalmente causada por la activación de la proteína GSDMD tras ser proteolizada por las caspasas en respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos o a peligro (PAMP y DAMP respectivamente) o en respuesta a lipopolisacáridos (LPS) citosólicos. c) La ferroptosis es una forma de muerte celular que recae en el balance entre la producción de ROS inducida por la acumulación de hierro y los sistemas antioxidantes durante la peroxidación de lípidos. Imagen tomada de (D. Tang et al., 2019).

1.3 EL SISTEMA INMUNITARIO HUMANO

El Sistema Inmunitario (SI) constituye las defensas que protegen al organismo contra un ambiente potencialmente peligroso.

1.3.1 Conceptos generales

Anteriormente se ha hablado del origen y evolución de los organismos pluricelulares (ver apartado 1.1.1), pero ésta no terminó allí. La continua presión que ejerce la selección natural dio lugar a una enorme variedad de organismos pluricelulares, parte de ellos ya extintos. Centrándonos en los animales, tanto los que han perdurado como los que no han tenido que hacer frente a lo largo de la historia a distintas amenazas externas, siendo a veces las más pequeñas las más peligrosas. Una buena prueba de ello es que, hasta la aparición de los

antibióticos, las infecciones por microorganismos lideraban las causas de muerte a lo largo del mundo.

La presencia, por tanto, de algún tipo de sistema defensivo efectivo ha ido de la mano con el éxito evolutivo (Nicholson, 2016). Cuando los animales primitivos eran invadidos por un microorganismo, tenían que eliminarlo o expulsarlo rápidamente de su organismo para mantener su integridad. Para ello producían barreras de proteínas defensivas, liberaban moléculas químicas destructivas o atrapaban los patógenos en células capaces de engullirlos (fagocitos). En caso de no ser suficiente con esos mecanismos, podían sacrificar la parte del cuerpo afectada y regenerarla después (Yatim & Lakkis, 2015). No obstante, la arquitectura y las funciones tisulares se volvieron cada vez más diferenciadas y complejas a la par que los organismos seguían evolucionando. Debido a ello la capacidad de regenerar tejidos fue disminuyendo hasta perderse en la mayoría de animales, salvo en contadas excepciones como las estrellas de mar o algunos reptiles, por ejemplo.

Ante la necesidad de un sistema de defensa más sofisticado, la selección natural preservó lo mejor del sistema primitivo previo y promovió el desarrollo sobre su base de uno nuevo con células más especializadas (Yatim & Lakkis, 2015). El conjunto resultante de todas las células y proteínas actuales encargadas de defender los organismos animales de agentes patógenos o dañinos se denomina SI.

En concreto, el SI humano es una red interactiva de órganos linfoides, células, factores humorales y citoquinas. Se divide en dos tipos en función de la velocidad y especificidad de la respuesta inmunitaria que se produce, los cuales se corresponden con la transición evolutiva entre sistemas de defensa (Parkin & Cohen, 2001; Yatim & Lakkis, 2015).

- Sistema inmunitario innato: es de respuesta rápida y proporciona protección inmediata, pero carece de especificidad molecular por lo que responde igual ante todas las infecciones y puede dañar los tejidos normales (*ver apartado 1.3.2*) (Parkin & Cohen, 2001; Yatim & Lakkis, 2015). Se denomina así porque sus mecanismos de defensa están codificados en la línea germinal, habiendo sido seleccionados por la evolución y transmitidos de generación en generación con pequeños refinamientos. Está prácticamente conservado en todo el filo animal, hasta en los individuos más simples, lo que refleja su probada eficacia y versatilidad (Parkin & Cohen, 2001; Yatim & Lakkis, 2015). Además, es clave para mantener la homeostasis de los tejidos normales, detectando y reparando los tejidos dañados o eliminando las células senescentes o apoptóticas (Yatim & Lakkis, 2015).
- Sistema inmunitario adaptativo: la respuesta que produce depende del tipo de infección sufrida, adaptándose sobre la marcha a cada situación (*ver apartado 1.3.3*). El reconocimiento molecular lo consigue gracias a receptores específicos generados por recombinación genética, por lo que cada individuo tiene un SI adaptativo distinto. Esta respuesta es precisa, pero necesita varios días o semanas para desarrollarse. Una vez erradica la infección, genera lo que se conoce como “memoria inmunitaria”, activándose

de manera más rápida y potente en caso de reinfección (Nicholson, 2016; Parkin & Cohen, 2001; Yatim & Lakkis, 2015). Es característica de los animales de mayor grado de desarrollo.

Todas las células que componen el SI se generan a partir de una célula madre hematopoyética, que también da lugar a otros elementos de la sangre como los eritrocitos y las plaquetas. Las células madre hematopoyéticas son pluripotentes, teniendo la capacidad de regenerarse, y se localizan en la médula ósea. Allí pueden dar lugar a dos precursores distintivos. Por un lado, el progenitor mieloide, a partir del que se derivan los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos), monocitos/macrófagos, células dendríticas (DCs), eritrocitos y plaquetas. Por otro lado, el progenitor linfóide, a partir del que se forman los linfocitos (B y T), y las células linfoides innatas (ILCs), entre las que se encuentran las células asesinas naturales (*Natural Killer*, NK). El conjunto de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos y células NK constituye lo que se conoce como glóbulos blancos o leucocitos (Nicholson, 2016).

La mayoría de estas células producen diversas citoquinas, proteínas de pequeño peso molecular, generalmente solubles, que actúan como mensajeros para alterar el comportamiento de la célula productora o de otras vecinas. En verdad las citoquinas son producidas prácticamente por todas las células del organismo y tienen una gran variedad de funciones, dependiendo de la citoquina y de las células implicadas. Los efectos biológicos suelen afectar a la activación celular, división, movimiento o muerte celular programada (Nicholson, 2016; Parkin & Cohen, 2001). Entre las citoquinas producidas por el SI destacan:

- Interleuquinas (IL): son las citoquinas producidas por los leucocitos y que tienen efecto principalmente sobre otros leucocitos (Parkin & Cohen, 2001).
- Quimioquinas: son las citoquinas que tienen actividad quimioattractiva, es decir, producen la migración de los leucocitos mediante un gradiente de concentración (Parkin & Cohen, 2001).
- Interferones (IFN): son las citoquinas que interfieren la replicación viral (Parkin & Cohen, 2001).

Además de estas células, varios órganos componen el SI. Los órganos linfoides primarios (médula ósea y timo) se encargan de la producción y maduración de las células inmunitarias recién nacidas. Por su parte, los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos y tejido linfóide asociado a mucosas) se encargan de albergar a las células del SI una vez ya han superado esos procesos. Aparte de en los órganos linfoides secundarios, las células del SI pueden encontrarse circulando por el organismo a través de los vasos sanguíneos y linfáticos (Yatim & Lakkis, 2015).

1.3.2 Sistema Inmunitario Innato

Constituye la primera línea de defensa del organismo y cuenta con varios puntos de acción. La piel y las membranas mucosas actúan como barreras físicas, químicas (presencia de

enzimas como la lisozima) y microbiológicas, dificultando el acceso de los patógenos a las células del organismo (Nicholson, 2016; Parkin & Cohen, 2001). Si esas barreras son superadas se produce la infección. Entonces entran en juego el sistema del complemento y las células del SI innato: granulocitos, monocitos/macrófagos, DCs y células NK.

El sistema del complemento se compone de más de una treintena de proteínas plasmáticas, la mayoría producidas por el hígado (Murphy & Weaver, 2017). Circulan en la sangre como precursores inactivos hasta que se produce una infección. Entonces se activan en una secuencia proteolítica en cascada, en la que en cada paso se va amplificando la señal. La activación del complemento se produce en el exterior de la célula u organismo diana por la unión del primer eslabón de la cadena a un elemento superficial de la membrana plasmática. Las células normales del organismo expresan los receptores adecuados que inhiben su activación. Existen tres rutas posibles de activación, en función de la molécula que produzca la interacción: la clásica (anticuerpos), la alternativa (polisacáridos de levaduras y bacterias Gram-negativas) y la de lectinas (residuos de manosa). Las 3 rutas convergen en la activación del componente central, C3. A partir de ese punto la ruta común induce el ensamblaje del complejo C5-C9, conocido como complejo de ataque a la membrana. Este complejo forma un poro transmembrana en la superficie de la célula diana y produce su muerte por lisis osmótica (Parkin & Cohen, 2001).

Además de este efecto de muerte directa, el sistema del complemento tiene otras funciones anti-infecciones. Miembros como C3b y C4b opsonizan las dianas promoviendo su fagocitosis. Otros, como C3a, C4a y C5a, son anafilotoxinas solubles que incrementan la permeabilidad vascular y generan un gradiente quimiotáctico, induciendo inflamación y permitiendo la llegada y penetración tisular de células del SI y anticuerpos (Murphy & Weaver, 2017; Parkin & Cohen, 2001).

Con respecto a las células del SI innato, las DCs, los granulocitos y los macrófagos expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Se trata de patrones moleculares asociados tanto a agentes patógenos externos (patrones moleculares asociados a patógenos, o PAMPs) como a potenciales peligros internos (patrones moleculares asociados a peligro, o DAMPs). Los patrones en cuestión son estructuras muy conservadas pero que no se encuentran presentes en las células de mamíferos (por ejemplo, lipopolisacáridos o manosas de paredes de bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y levaduras). De esa forma el SI innato, a pesar de no ser específico, puede discriminar con respecto a las moléculas propias del organismo (Matzinger, 1994; Parkin & Cohen, 2001).

Otras células del organismo, como las endoteliales y epiteliales, también expresan los PRRs. Así, cuando se produce una infección, éstas células y las del SI innato presentes en el tejido afectado interactúan con ellos y liberan citoquinas. Las citoquinas secretadas por un lado estimulan la división de los precursores mieloides en la médula ósea para generar más células que hagan frente a la infección. Por otro, junto a algunos de los efectos del sistema del complemento, inducen inflamación y reclutan a la zona infectada monocitos y granulocitos. Los monocitos al extravasarse al tejido afectado se activan y diferencian a macrófagos. En cuanto a

los granulocitos, principalmente se reclutan neutrófilos (infecciones de bacterias y hongos). Los eosinófilos y basófilos quedan relegados a las infecciones por parásitos (sobre todo nematodos) y a las respuestas alérgicas, respectivamente (Parkin & Cohen, 2001).

Los neutrófilos y macrófagos reclutados son de las células más importantes al inicio de una respuesta inmunitaria. Son las primeras en llegar y tienen alta eficacia eliminando patógenos de dos formas posibles. Pueden hacerlo engulléndolos en un proceso conocido como fagocitosis. Quedan entonces recluidos en unas estructuras intracelulares donde son eliminados por la producción de metabolitos tóxicos de O_2 (H_2O_2 y radicales hidroxilo). También pueden liberar enzimas (mieloperoxidasa y lisozima) inductoras de toxicidad al espacio extracelular en donde se encuentra la infección. Esta segunda es una estrategia suicida, en la que las células del SI innato se sacrifican para poner fin a la infección y proteger al resto del organismo, matando además indiscriminadamente al resto de células sanas presentes en el área (Nicholson, 2016; Parkin & Cohen, 2001). Queda patente de nuevo una de las bases descritas de la vida pluricelular (*ver apartado 1.1.1*). El resultado es un absceso de pus formado por todos los restos celulares, que deben ser eliminados por los fagocitos para mantener la homeostasis.

El último tipo de célula del SI innato, pero no por ello menos importante, son las células asesinas naturales (*Natural Killer*, NK). Reciben este nombre porque una vez han eliminado a una célula diana, pueden matar rápidamente de manera similar a múltiples células diana adyacentes como si fueran un “asesino en serie” (Shimasaki et al., 2020). Debido a la relevancia que tienen en esta tesis doctoral, se les dedica una sección entera (*ver apartado 1.3.2.1*)

1.3.2.1 Células NK

Estas células son uno de los mejores ejemplos del proceso de evolución que ha habido en el desarrollo del SI. Esto se debe a que presentan características tanto del SI innato como del SI adaptivo, a modo de eslabón perdido, desafiando los sistemas tradicionales de clasificación (Yatim & Lakkis, 2015).

1.3.2.1.1 Características generales de las células NK

Las células NK son un subconjunto de linfocitos citotóxicos del SI innato descubiertos al inicio de la década de 1970. Descritas como pequeñas células linfoides granulares, suponen sólo el 10-15% de los linfocitos totales presentes en sangre periférica (Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975; Reina-Ortiz et al., 2022; Song et al., 2016; Yan et al., 1998; Y. Zhu et al., 2016). Se desarrollan en la médula ósea a partir del mismo precursor linfoide que los linfocitos T y B. Sin embargo, se diferencian en que las células NK carecen de receptores específicos y no requieren un encuentro previo con su diana que las sensibilice y active (Kennedy et al., 2000; Lodolce et al., 1998; Reina-Ortiz et al., 2022; Scoville et al., 2019; Sportoletti et al., 2021).

Pueden distinguirse por su inmunofenotipo, ya que al carecer de los receptores específicos generados por recombinación genética también carecen de la molécula CD3 asociada a ellos. Dado que sí expresan la molécula CD56, implicada en adhesiones celulares e importante en su

papel citotóxico para unirse a las dianas, se identifican como linfocitos CD56⁺CD3⁻ (Abel et al., 2018; Shimasaki et al., 2020). En base al nivel de expresión de CD56 se clasifican en dos subgrupos de células NK, cada uno con sus propias funciones y características (Freud et al., 2017). Las que tienen mayor nivel de expresión se denominan CD56^{bright}, producen citoquinas proinflamatorias (principalmente IFN γ y TNF α), tienen baja expresión de receptores reguladores y son relativamente inmaduras y muy poco citotóxicas. Las células NK CD56^{bright} son más abundantes en tejidos y en los nódulos linfáticos, y reaccionan con una intensa proliferación frente al estímulo de IL-2 o IL-15. El otro subgrupo tiene algo menos de intensidad de expresión de CD56 y se denominan CD56^{dim}. Estas células están diferenciadas completamente y tienen una gran y rápida capacidad citotóxica y de secreción de citoquinas cuando son activadas. Este tipo de células constituyen la mayoría de células NK circulando en sangre periférica (Freud et al., 2014, 2017; Reina-Ortiz et al., 2022; Sportoletti et al., 2021; Stabile et al., 2017). CD16 es otro marcador característico de las células NK, el cual se detallará más adelante (*ver apartado 1.3.2.1.2*) y cuya expresión es mayor en las células CD56^{dim} que en las CD56^{bright}. Se considera que la secuencia de desarrollo de las células NK sigue los siguientes cambios: CD56^{bright}CD16⁻ a CD56^{bright}CD16^{dim}, a CD56^{dim}CD16^{dim}, a CD56^{dim}CD16⁺ (Abel et al., 2018; Freud et al., 2014).

En el momento de su descubrimiento se consideraron células especializadas en eliminar células tumorales, debido a su habilidad para matarlas *in vitro* (Kiessling et al., 1975). De hecho, con el paso del tiempo cada vez hay más evidencias de que están implicadas en la inmunovigilancia del cáncer siendo una de sus primeras líneas de defensa (Dunn et al., 2004; Malmberg et al., 2017; Slaney et al., 2013). No obstante, su principal función es el control de diversas infecciones víricas, incluyendo los virus de Epstein-Barr (Chijioke et al., 2013; Orange, 2013), herpes simple (Dai & Caligiuri, 2018), inmunodeficiencia humana, gripe y hepatitis C (Jost & Altfeld, 2013; Lam & Lanier, 2017). También hay evidencias de que pueden reaccionar a la infección con citomegalovirus y prevenir su reactivación (Foley et al., 2012).

En general, las células NK tienen una tasa de renovación en sangre de aproximadamente dos semanas (Shimasaki et al., 2020), tienen un papel importante en la defensa antivírica y antitumoral (Reina-Ortiz et al., 2022; Sportoletti et al., 2021; Yu et al., 2009), y son capaces de ejecutar rápidas respuestas inmunitarias (normalmente en cuestión de días). Además, últimamente hay crecientes evidencias de que las células NK pueden adquirir características funcionales similares a las de memoria inmunitaria, caracterizadas por elevar la actividad y generar respuestas específicas ante un desafío repetido (Paul & Lal, 2017; Shimasaki et al., 2020).

1.3.2.1.2 Mecanismos de activación de las células NK

Debido a que tienen un papel diferente a los otros tipos celulares del SI innato, las células NK tienen que ser capaces de discriminar entre células propias sanas y células propias diana (infectadas, transformadas o estresadas). Al carecer de receptores específicos, las células NK y sus funciones quedan reguladas por un conjunto de receptores de membrana. Estos receptores interaccionan con sus correspondientes ligandos expresados en las células diana, produciendo

señales activadoras o inhibitoras según el receptor y el ligando (ver *Figura 1.4* y *Figura 1.5*). El balance global de las señales es el que determina si la célula adyacente debe ser eliminada o no, y activa o bloquea la citotoxicidad de las células NK (Abel et al., 2018; Chiossone et al., 2018; Paul & Lal, 2017; Reina-Ortiz et al., 2022; Shimasaki et al., 2020; Sportoletti et al., 2021).

Las señales inhibitorias son mediadas por receptores que reconocen el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), también denominado en humanos como HLA-I (*Human Leukocyte Antigen*) (Chiossone et al., 2018; S. Kim et al., 2005; Kumar, 2018; Orr & Lanier, 2010; Paul & Lal, 2017; Reina-Ortiz et al., 2022; Shimasaki et al., 2020). Esta molécula, sobre la que se hablará en detalle en el SI adaptativo (ver *apartado 1.3.3*), se expresa en todas las células sanas del organismo. Esta circunstancia permite que los tejidos sanos autoinhiban a las células NK maduras y que éstas sólo ataquen a las células “estresadas” por una infección viral o una transformación neoplásica, así como a los tejidos enfermos que no expresan el HLA-I (Anfossi et al., 2006; Kärre, 2008; S. Kim et al., 2005; Orr & Lanier, 2010; Reina-Ortiz et al., 2022; Shimasaki et al., 2020).

La mayoría de estos receptores inhibitorios son miembros de la familia KIR (*Killer cell Immunoglobulin-like Receptor*) y reconocen distintas moléculas clásicas de HLA-I (A, B y C) (*Figura 1.4*) (Chiossone et al., 2018; Paul & Lal, 2017; Reina-Ortiz et al., 2022; Shimasaki et al., 2020). Los principales receptores (y sus respectivos ligandos) en humanos son: KIRDL1 (HLA-C), KIR2DL2 y KIR2DL3 (HLA-C y HLA-B), KIR3DL1 (HLA-B y HLA-A(Bw4)) y KIR3DL2 (HLA-A) (Pende et al., 2019). Existe otro miembro de esta familia con carácter inhibitorio, KIR2DL4, pero en este caso se une a la molécula no clásica HLA-G (Rajagopalan & Long, 2012). El otro tipo de receptor con papel inhibitorio es el heterodímero CD94/NKG2A y su isoforma NKG2B, que reconocen con alta afinidad otra molécula no clásica del HLA-I (HLA-E) (Borrego et al., 2005; Braud et al., 1998; Carretero et al., 1997).

En contrapartida, las células NK expresan un gran número de receptores activadores que reconocen determinantes virales o ligandos celulares inducidos por estrés (ver *Figura 1.5*) (Reina-Ortiz et al., 2022). Entre ellos destaca la familia de los NCRs (*Natural Cytotoxicity Receptors*), compuesta por tres miembros: NKp30 y NKp46, expresados constitutivamente, y NKp44, adquirido tras la activación (Barrow et al., 2019; Chiossone et al., 2018; Paul & Lal, 2017; Reina-Ortiz et al., 2022; Shimasaki et al., 2020). Los tres tienen ligandos comunes, como las hemaglutininas víricas y los heparan-sulfato-glicosamiglicanos (Hecht et al., 2009). En cuanto a ligandos particulares, NKp30 reconoce a B7-H6 y BAT3 (Brandt et al., 2009; Vivier et al., 2008), NKp44 reconoce a una variante de 21spe-MLL5 (Baychelier et al., 2013), y NKp46 reconoce a CFP, uno de los factores del sistema del complemento (Nevins et al., 2016). Salvo en el caso de las hemaglutininas víricas y de CFP, que se trata de actividades antivirales y antimicrobianas, el resto de ligandos están ausentes en las células normales y sobreexpresados en un amplio rango de tumores (Baychelier et al., 2013; Brandt et al., 2009).

Por otra parte, hay receptores activadores que reconocen específicamente moléculas de HLA-I. Es el caso del resto de miembros de la familia de receptores KIR: KIR2DS1 (HLA-C),

KIR2DS2 (HLA-C), KIR2DS4 (HLA-C) y KIR3DS1 (HLA-B) (Blunt & Khakoo, 2020; Pende et al., 2019; Stewart et al., 2005). El receptor heterodimérico CD94/NKG2C también es específico de HLA-I, aunque en este caso se une con baja afinidad a la molécula no clásica HLA-E (Braud et al., 1998; Sáez-Borderías et al., 2009).

Otros receptores coestimuladores que cooperan con los NCRs y NKG2D amplificando la activación de las células NK son DNAM-1 (*DNAX Accesory Molecule-1*) y 2B4. El primero de ellos compete con TIGIT (*T cell immunoreceptor with Immunoglobulin and ITIM domains*) y CD96 para unirse a sus ligandos CD155 (también conocido como PVR, *Polio Virus Receptor*) y CD112, expresados en algunos cánceres, induciendo actividad antitumoral (Fionda et al., 2015; Pende et al., 2005). El segundo de ellos se une a CD48, molécula que presenta altos niveles de expresión en linfomas y en células infectadas con EBV (*Epstein-Barr Virus*) (McArdel et al., 2016). Las células NK también expresan el correceptor CD59 y la molécula de adhesión LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen 1*), importantes para una degranulación polarizada (Bryceson et al., 2005; Marcenaro et al., 2003).

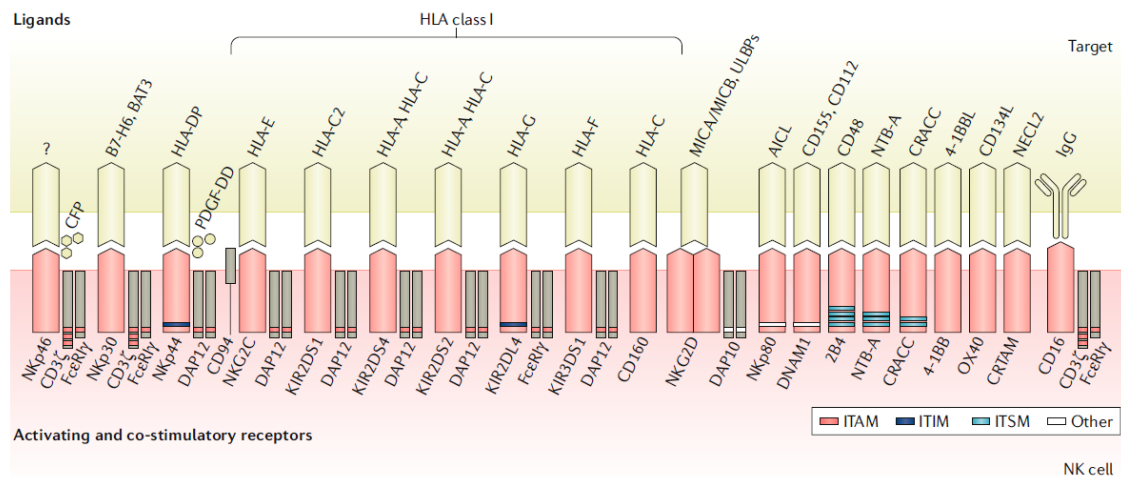


Figura 1.5. Receptores activadores de las células NK y sus respectivos ligandos y proteínas adaptadoras. Los receptores activadores tienen por lo general una estructura similar a las inmunoglobulinas o a las lectinas, con un dominio extracelular, un dominio transmembrana que promueve el agrupamiento entre ellos, y la mayoría de ellos tienen asociadas proteínas adaptadoras con motivos ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). Entre dichas proteínas adaptadoras se incluyen DAP10, DAP12, la cadena CD3ζ y la cadena FcεR1γ del receptor CD16. Los receptores activadores generan una fuerte señal intracelular, resultando en una rápida y transitoria fosforilación de los motivos ITAM. Esta señal funciona como un interruptor de encendido-apagado que conecta con la maquinaria de señalización intracelular, transduciéndola. Imagen adaptada de (Shimasaki et al., 2020).

Sin embargo, no cabe duda de que el receptor activador más potente es CD16, expresado en la mayoría de las células NK de sangre periférica. Es un receptor de baja afinidad del fragmento cristalizante (región Fc) de los anticuerpos, elementos del SI adaptativo que se detallarán más adelante (ver apartado 1.3.3.2). Está formado por la cadena FcγRIIIα asociada a

la cadena CD3 ζ (Shimasaki et al., 2020). Tras la unión a dianas recubiertas de anticuerpos, induce la muerte de la célula diana activando los mecanismos citotóxicos de las células NK en un proceso conocido como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Battella et al., 2016; Maki et al., 2001; Ochoa et al., 2017; Suck et al., 2016). La ADCC, tal y como se verá más adelante, tiene una gran relevancia clínica para la terapia del cáncer (*ver apartado 1.3.6.2 y apartado 1.4.5.2.1*) (Sánchez-Martínez et al., 2018; Sportoletti et al., 2021).

En general, para el balance final de señales no solo hace falta que haya ausencia de ligandos inhibitorios sino también presencia de ligandos activadores. La ligación de receptores activadores de forma individual generalmente es insuficiente para desencadenar la citotoxicidad o la secreción de citoquinas (Shimasaki et al., 2020). CD16 a través de la ADCC supone una excepción. Se trata de una activación y señalización tan potente que una vez seleccionada la diana por la unión al anticuerpo se ignora la presencia de los ligandos inhibitorios. Respecto al papel de las citoquinas, la IL-2 potencia la señal de los receptores activadores; y la IL-15 (secretada principalmente por monocitos, macrófagos y DCs) también activa las células NK y promueve su supervivencia y proliferación (Shimasaki et al., 2020).

1.3.2.1.3 Mecanismos citotóxicos de las células NK

Una vez las células NK han encontrado una diana y se han activado mediante los ligandos correspondientes, pueden eliminarla por varios mecanismos distintos o por la combinación de ellos.

Por un lado, las células NK tienen un citoplasma rico en gránulos de tipo lisosomal que contienen proteínas citotóxicas como perforina y varios tipos de granzimas (serín proteasas) (Martínez-Lostao et al., 2015; Reina-Ortiz et al., 2022; Shimasaki et al., 2020; Sportoletti et al., 2021). Tanto la perforina como al menos las granzimas A y B se consideran necesarias para la muerte de las células tumorales por parte de las células NK (Pardo et al., 2002; van den Broek et al., 1995). Cuando se produce la activación, los gránulos convergen hacia la zona de contacto entre ambas células y se fusionan con la membrana plasmática. De esa forma liberan su contenido en el espacio comprendido entre las células, denominado sinapsis inmunitaria (Shimasaki et al., 2020). Una vez libres en ese espacio, la perforina oligomeriza y crea, de forma similar a las proteínas del sistema del complemento, poros en la membrana de la célula diana. Esto permite la entrada de las granzimas al citoplasma de las dianas. Una vez dentro las granzimas pueden inducir diversos tipos de muerte celular, incluyendo apoptosis (para algunos autores se considera propiamente como una tercera ruta de la apoptosis), necroptosis, o piroptosis dependiendo de la diana tumoral y de las granzimas (de Miguel et al., 2022; Pardo et al., 2004; R. C. Taylor et al., 2008). Por ejemplo, la granzima B es una serín proteasa que proteoliza algunas dianas celulares y activa tanto a las caspasas iniciadoras como a las ejecutoras. La granzima B puede desencadenar de forma rápida la apoptosis de la célula diana, pero también podría iniciar la necroptosis si las caspasas se encuentran inactivas o la piroptosis si se expresan GSDMs (Carneiro & El-Deiry, 2020; de Miguel et al., 2022; Pardo et al., 2009; D. Tang et al., 2019).

Por otro lado, las células NK también pueden producir la muerte directa de sus dianas activando la señalización de los DRs (Martínez-Lostao et al., 2015; Shimasaki et al., 2020; Y. Zhu et al., 2016). Para ello deben expresar FasL y TRAIL en su membrana o bien liberarlos al exterior en microvesículas. Aunque se ha visto que ejercen la citotoxicidad a través de ambos ligandos mortales, TRAIL parece ser el más relevante (Reina-Ortiz et al., 2022; Screpanti et al., 2001; Smyth et al., 1998). La interacción de los ligandos mortales con sus respectivos DRs en las células diana activa y desencadena por lo general la ruta extrínseca de la apoptosis. No obstante, como ya se ha comentado anteriormente, en caso de inhibición de la caspasa 8, la estimulación de los DRs podría inducir la necroptosis de las células (de Miguel et al., 2022; D. Tang et al., 2019).

Además, las células NK también producen y liberan citoquinas con potencial citotóxico, tales como IFN γ y TNF α , capaces de inducir apoptosis en ciertas circunstancias (Dunn et al., 2006; Fauriat et al., 2010; Shimasaki et al., 2020; Voskoboinik et al., 2006). También está descrito que dichas citoquinas puedan inducir ferroptosis y necroptosis respectivamente (de Miguel et al., 2022; D. Tang et al., 2019). Por si fuera poco, las células NK también pueden mediar indirectamente respuestas inmunitarias produciendo citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y factores de crecimiento, tales como IL-13, CCL3, CCL4, CCL5, XCL1 y GM-CSF, influyendo en la actividad de otras células inmunitarias (Shimasaki et al., 2020; Sportoletti et al., 2021).

1.3.3 Sistema Inmunitario adaptativo

Dado que muchos de los mecanismos de estimulación del SI innato requieren exposición de la superficie del patógeno, éste es incapaz de detectar los organismos intracelulares (virus, micobacterias, y algunos hongos, protozoos o patógenos facultativos intracelulares). Cuando esto ocurre, o cuando el SI innato no es capaz de erradicar la infección en sus compases iniciales y ésta se prolonga, entonces entra en juego el SI adaptativo (Parkin & Cohen, 2001).

Este sistema está formado por los linfocitos T y los linfocitos B, y su principal característica es el uso de receptores específicos capaces de distinguir entre moléculas propias y extrañas, hasta el punto de discriminar entre cada tipo de extrañas. La interacción del receptor con su molécula específica inicia una respuesta inmunitaria dirigida contra cada tipo de infección (Parkin & Cohen, 2001). Estas moléculas reconocidas por el SI adaptativo son normalmente una proteína (o un fragmento suyo) y reciben el nombre de antígenos. En caso de ser una estructura del propio organismo la que inicie la respuesta inmunitaria se denomina autoantígeno (Nicholson, 2016; Yatim & Lakkis, 2015).

Los receptores específicos en cuestión son el resultado de una serie de recombinaciones genéticas producidas durante el desarrollo de los linfocitos, las cuales afectan a los segmentos que codifican las zonas de los receptores que identifican y se unen a los antígenos (Parkin & Cohen, 2001). Dichos reordenamientos aleatorios en el DNA afectan a los 4 segmentos de genes implicados en la formación del receptor: Variable (V), Diversidad (D), Unión (J) y Constante (C). Estos genes tienen multiplicidad de regiones (por ejemplo, los linfocitos T tienen entre 25-100

genes V, alrededor de 25 genes D y alrededor de 50 genes J) y libertad combinatoria, pudiendo unirse cualquiera de los genes a los otros para formar la región final VDJ (Parkin & Cohen, 2001). Este elegante truco molecular permite a partir de un número finito de genes adyacentes generar un enorme número de receptores de antígeno, cada uno de ellos único (Yatim & Lakkis, 2015). El resultado es la producción de más de 10^8 receptores para los linfocitos T, y más de 10^{10} receptores para los linfocitos B. Los linfocitos B tienen más repertorio de receptores porque durante su activación ocurren más reordenamientos génicos (hipermutación somática) (Parkin & Cohen, 2001).

1.3.3.1 Linfocitos T

Los linfocitos T son generados como el resto de células del SI en la médula ósea, aunque posteriormente migran al timo para su maduración. Su receptor de membrana específico es el TCR (*T-Cell Receptor*), compuesto comúnmente por un heterodímero de cadenas α y β (menos del 10% de linfocitos T tienen un heterodímero de γ y δ) (Parkin & Cohen, 2001).

Pese a su gran variabilidad y especificidad, los TCR no pueden reconocer a los antígenos que se encuentran circulando libremente por el organismo. Para que se produzca la interacción receptor-antígeno que dé inicio a la respuesta inmunitaria, los antígenos tienen que estar correctamente procesados en péptidos lineales de 8-9 residuos de aminoácidos (aa) y presentados en unas estructuras denominadas complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Nicholson, 2016; Parkin & Cohen, 2001). Como ya se ha comentado previamente, en humanos también se denomina HLA (*Human Leukocyte Antigen*). Existen dos tipos de MHC localizados en la membrana celular y que exponen los antígenos a las células del SI adaptativo, dependiendo del correceptor del TCR con el que interactúan.

- MHC de clase I (MHC-I): se expresa en todas las células del organismo (a excepción de los glóbulos rojos) para que ninguna parte del cuerpo quede sin vigilancia (Nicholson, 2016). Con el MHC-I las células exponen antígenos endógenos, es decir, una selección de antígenos procesados a partir de las proteínas que producen. Con esta estrategia el SI distingue entre proteínas propias de células normales y proteínas de bacterias. No solo eso; si las células han sido infectadas por un virus o se han transformado en tumorales y están sintetizando proteínas víricas o aberrantes, el SI también lo detecta.
- MHC de clase II (MHC-II): para controlar la activación de los linfocitos, su expresión está limitada a un grupo especializado de células con capacidad fagocítica y de presentación de antígenos. Este grupo de células se conoce como células presentadoras de antígenos (APCs) e incluye a las DCs, los macrófagos y los linfocitos B. Con el MHC-II las APCs exponen antígenos procesados a partir del material que fagocitan a lo largo del organismo. Esto incluye tanto patógenos como células muertas del propio organismo.

Debido a que los TCR y su especificidad por los antígenos se generan de forma aleatoria, existe la posibilidad de que se produzcan TCR poco funcionales o autorreactivos que reconozcan autoantígenos. Por esa razón, mientras maduran en el timo, los linfocitos T son sometidos a un

proceso de doble selección. Primero sufren una selección positiva en la que los linfocitos cuyo TCR tiene una unión débil o no reconoce al MHC son eliminados. Después, sufren una selección negativa en la que los linfocitos cuyo TCR reconoce fuertemente al MHC presentando autoantígenos son eliminados ya que supondrían un riesgo para el organismo. En el global de estos dos procesos más del 90% de los linfocitos T son eliminados a través de la apoptosis (Nicholson, 2016), en otro ejemplo de sacrificio celular en pos de preservar más adelante el organismo. El resultado es una población de linfocitos T que tienen potencial para reconocer fuertemente antígenos ajenos y que no reconocen antígenos propios, con lo que pueden ser exportados de forma segura desde el timo.

Asociado al TCR se encuentra el complejo CD3. Está formado por 4 cadenas distintas que se encargan de transducir hasta el núcleo la cascada de señales que llevan a la activación y proliferación de los linfocitos T. Entre ellas destaca CD3 ζ . Para que la activación sea completa se necesita además de la interacción TCR-antígeno-MHC la señalización a través de interleuquinas y de diversos correceptores. Los principales correceptores para los linfocitos T son las moléculas de superficie CD40, CD80 y CD86 (también conocidas estas dos últimas como B7-1 y B7-2), que se unen a CD40L, CD28 y CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen-4*), respectivamente (Parkin & Cohen, 2001). Sin esas señales adicionales la célula se volvería anérgica o llevaría a cabo la muerte celular programada.

Si los linfocitos reciben todas las señales, se activan y se convierten en células T efectoras. Se distinguen dos tipos en base del correceptor que expresan para interactuar con el MHC y la función que ejercen:

- Linfocitos T citotóxicos (T_c): su correceptor para el MHC es CD8, que interactúa únicamente con el MHC-I. Están implicados en la actividad antiviral y antitumoral, y su función es eliminar las células que portan su antígeno específico (Nicholson, 2016; Parkin & Cohen, 2001). Sus mecanismos citotóxicos son similares a los descritos anteriormente para las células NK: gránulos citotóxicos que contienen perforina y granzimas, y los ligandos mortales (Martínez-Lostao et al., 2015). Una subpoblación conocida como T_{reg} se encarga de regular y suprimir la respuesta inmunitaria del resto de las poblaciones.
- Linfocitos T auxiliares (T_h): en su caso el correceptor que expresan para interactuar con el MHC es CD4, siendo específico del MHC-II. Una vez activados orquestan la respuesta inmunitaria adaptativa, reconociendo antígenos externos y activando otras partes de la respuesta mediada por células, como los linfocitos T_c y los linfocitos B (Nicholson, 2016; Parkin & Cohen, 2001). Se subdividen según las citoquinas que producen y la respuesta inmunitaria generada.

1.3.3.2 Linfocitos B

A diferencia de los linfocitos T, los linfocitos B permanecen en la médula ósea para su maduración. Su receptor de membrana específico de antígeno es el BCR (*B-Cell Receptor*), que

consiste en una inmunoglobulina (Ig) unida a membrana. Las Ig, también conocidas como anticuerpos, están formadas por la combinación de dos cadenas pesadas iguales y dos cadenas ligeras idénticas (Nicholson, 2016). La unión de estas cadenas entre sí por puentes disulfuro da lugar a una estructura en forma de Y, tal y como se puede ver en la *Figura 1.6*.

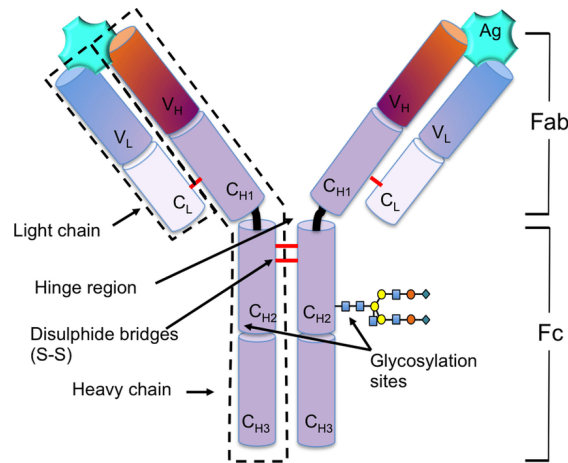


Figura 1.6. Estructura general de una inmunoglobulina (Ig). La molécula típica de una Ig consiste en cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas (H) y dos ligeras (L), unidas entre sí por puentes disulfuro (mostrados como líneas rojas). Las cadenas ligeras constan de un dominio variable (V_L) y de un dominio constante (C_L), mientras que las cadenas pesadas constan de un dominio variable (V_H) y de varios dominios constantes (C_H) en tándem, cuyo número depende de cada isotipo. La base de las cadenas pesadas constituye el fragmento cristalizable (Fc), capaz de interaccionar con el receptor de anticuerpos (CD16). Por su parte, los extremos donde se emparejan los dominios V_L y C_L con los de la cadena pesada conforman los fragmentos de unión a antígeno (Fab). Imagen tomada de (O’Kennedy et al., 2016).

Hay diferentes clases de anticuerpos, llamadas isotipos. Según sus cadenas pesadas hay 5 isotipos: IgD, IgM, IgG, IgE e IgA. Cada uno de ellos puede ser a su vez isotipo λ o κ en función de sus cadenas ligeras. La predominancia de cada isotipo varía según la zona o situación del organismo. Las IgD son un marcador de maduración de los linfocitos; las IgM se encuentran principalmente intravascularmente, además de expresadas como BCR; las IgG son el principal anticuerpo presente en la sangre y los tejidos; las IgE se encargan de la respuesta contra parásitos y alérgenos y las IgA se encuentran en secreciones, proporcionando inmunidad a las mucosas (Nicholson, 2016).

Ambos tipos de cadenas se componen de dominios estructurales globulares conectados por uniones flexibles. Estos dominios pueden ser constantes, o en el caso de ser producto de las recombinaciones genéticas, variables. Cada cadena pesada consta de varios dominios constantes en tándem, cuyo número depende de cada isotipo, y un único dominio variable. Las cadenas ligeras en cambio son más cortas y sólo tienen un dominio de cada tipo.

La base de las cadenas pesadas constituye el fragmento cristalizable (Fc), capaz de interaccionar con el receptor de anticuerpos (CD16). Por su parte, los extremos de la Y donde se

emparejan las cadenas pesadas y ligeras son los fragmentos de unión a antígeno (Fab). Los Fab incluyen un dominio constante de cada cadena y los dominios variables de ambas. Estos últimos son los que constituyen la zona de reconocimiento de los antígenos (parátomos). En caso de aislar un único Fab, éste se denomina scFv (*single-chain variable Fragment*). Los antígenos de los anticuerpos no requieren procesamiento previo ni molécula presentadora, ya que son estructuras conformacionales (epítomos). Por ello la mayoría de anticuerpos reconocen de forma libre proteínas enteras en su estado nativo (Nicholson, 2016; Parkin & Cohen, 2001).

Los linfocitos B también sufren en la médula ósea varios procesos de selección para eliminar por apoptosis aquellos linfocitos cuyo BCR reconoce autoantígenos. El BCR expresado en membrana es una IgM, que al principio del desarrollo de los linfocitos actúa como receptor de antígeno. El BCR es capaz de inducir transducción de señal además de internalizar el antígeno para procesarlo y presentarlo a los linfocitos T expuesto en el MHC-II. Este punto es importante para la correcta activación de los linfocitos B, ya que además de reconocer su antígeno específico necesitan la coestimulación de un linfocito T_h que tenga la misma especificidad de antígeno.

Cuando la activación tiene lugar (principalmente en los nódulos linfáticos), ocurre la hipermutación somática que produce una mayor variabilidad en los anticuerpos. Aquellas células a cuyo anticuerpo de superficie se une más ávidamente el antígeno proliferan más eficientemente, con lo que la respuesta madura y gana afinidad. Además, se produce un cambio de isotipo y las células empiezan a secretar los anticuerpos producidos. Llegados a ese punto los linfocitos B activados abandonan el tejido linfoide como células plasmáticas, cuya función es la producción de anticuerpos.

Los anticuerpos secretados circulan por la sangre y se encuentran en órganos y fluidos intersticiales, actuando de esa forma en sitios adonde los linfocitos T no pueden llegar. Sirven para neutralizar toxinas, prevenir la adhesión de organismos a las mucosas y potenciar elementos del SI innato tales como:

- Activación del complemento: la región Fc del anticuerpo inicia la ruta clásica, desencadenando la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (Parkin & Cohen, 2001).
- Opsonización de bacterias para su fagocitosis: los macrófagos también expresan una variante del receptor CD16, reconociendo así la región Fc de los anticuerpos que han recubierto a una bacteria e induciendo su fagocitosis (Parkin & Cohen, 2001). Este proceso se conoce como fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP).
- Inducción de la muerte de tumores y de células infectadas por virus a través de las células NK: la interacción del receptor CD16 con la región Fc sirve de fuerte señal de activación para las células NK, que proceden a eliminar la célula marcada por el anticuerpo mediante la ADCC (Parkin & Cohen, 2001).

1.3.3.3 Homeostasis de la respuesta adaptativa y generación de la memoria inmunitaria

Durante la respuesta inmunitaria las distintas células implicadas, especialmente los linfocitos, empiezan a proliferar una vez que son activadas. Cada uno de los linfocitos puede llegar a generar una progenie de hasta 1.000 nuevas células (Parkin & Cohen, 2001). El propósito es aumentar el número de defensas y conseguir una respuesta amplificada que elimine el estímulo que la ha desencadenado. Si la respuesta no es lo suficientemente potente, la infección podría llegar a matar al individuo; pero si la respuesta es demasiado fuerte, también podría matarlo ella misma. En casos no tan extremos, una respuesta deficiente puede llevar al desarrollo de infecciones graves o tumores, mientras que una sobreactividad puede producir alergias o enfermedades autoinmunes.

Por lo tanto, esta respuesta tiene que alcanzar un punto intermedio apropiado, provocando la suficiente muerte celular para manejar la infección o amenaza, pero no demasiada como para comprometer al organismo atacando tejidos sanos. Además, una vez eliminada la infección eficazmente y superada la prioridad de salvar el organismo, el exceso de células inmunitarias generadas gastaría muchos recursos y supondría un potencial peligro si no son eliminadas.

Por ambas razones, el SI termina autorregulándose tras un tiempo activado tanto si ha tenido éxito como si no (caso de las enfermedades crónicas). La mayor parte de los linfocitos expandidos durante la respuesta inmunitaria adaptativa son eliminados a través de la apoptosis. Esta homeostasis se debe a que los linfocitos activados expresan los DRs, aunque inicialmente son resistentes a la apoptosis mediada por sus ligandos. Conforme pasan ciclos de activación (sobreactivación), los linfocitos se van haciendo progresivamente más susceptibles a los ligandos mortales expresados o secretados por muchas de las otras células inmunitarias (Martínez-Lorenzo et al., 1998). Por otra parte, los linfocitos (y otras células que no forman parte del SI adaptativo como las células NK) también aumentan la expresión en membrana de receptores inhibitorios que regulan negativamente sus funciones citotóxicas (puntos de control inmunitarios, ver apartado 1.3.6.1 y apartado 1.3.6.2). Además, la expansión de linfocitos reguladores específicos del antígeno (T_{reg} y B_{reg}) lleva a la secreción de citoquinas antiinflamatorias que limitan la respuesta inmunitaria y promueven la curación de los tejidos (Nicholson, 2016).

Los pocos linfocitos que sobreviven se convierten en células de memoria inmunitaria, la última y una de las más significativas características del SI. Estas células de memoria tienen mayor esperanza de vida, una respuesta más rápida, mayor tasa de proliferación y mayor acceso a los tejidos, permaneciendo, de forma latente, preparadas para una posible reinfección (Yatim & Lakkis, 2015).

En el caso de los linfocitos T de memoria, se incrementa la fracción de población que expresa un TCR capaz de reconocer la infección, y algunas subpoblaciones migran a los tejidos donde se originó la misma. Otras permanecen en los nódulos linfáticos pudiendo llegar a vivir 10 o más años (Parkin & Cohen, 2001). Además, las células que ya han interactuado con el

antígeno son más fáciles de activar, responden a menores concentraciones de antígeno, reaccionan más rápido y tienen un tiempo de división más corto.

En cuanto a los linfocitos B de memoria, son células plasmáticas que mantienen el potencial de desarrollar anticuerpos de alta afinidad durante muchos años. Parte se localizan en la médula ósea y las mucosas, y otras se mantienen en circulación a largo plazo (Nicholson, 2016). Además, todos los anticuerpos secretados y con afinidad mejorada circulan por la sangre y se distribuyen por todo el cuerpo. La medición de la memoria inmunitaria generalmente se centra en la respuesta de anticuerpos (Nicholson, 2016).

Todo esto permite que cuando se produzca un segundo encuentro con el mismo antígeno la respuesta sea más rápida y eficaz (por ejemplo, el pico máximo de producción de anticuerpos se reduce de 10 a 1-3 días), protegiendo en muchos casos al individuo de la reinfección y limitando la propagación dentro de una comunidad (Nicholson, 2016). Dicha protección puede ser de plazo muy largo. Por ejemplo, en un estudio sobre las infecciones de sarampión vieron que la memoria inmunitaria generada decaía tan lentamente, que se habrían necesitado 300 años para perder la mitad de ella (Nicholson, 2016). Estos beneficios de la memoria inmunitaria son el fundamento detrás de las estrategias de vacunación.

1.3.4 Interacción entre el Sistema Inmunitario innato y el Sistema Inmunitario adaptativo

La respuesta inmunitaria más deseable sería aquella que detuviese la infección incluso antes de producirse. La piel y las membranas mucosas del SI innato, como primera línea de defensa, dificultan el aproximamiento y entrada de los microorganismos y patógenos al organismo. En caso de tratarse de una reinfección, esas barreras se verán reforzadas por los anticuerpos producto de la memoria del SI adaptativo. Los anticuerpos pueden unirse a los patógenos y neutralizarlos conforme entran (por ejemplo, interrumpen la transmisión de los virus entre células al bloquear las proteínas de superficie necesarias). Su gran sensibilidad facilita una respuesta rápida y dirigida capaz de detener una infección antes de que llegue a provocar ningún síntoma.

Si la infección supera estas defensas y llega a establecerse dentro del organismo, entonces los fagocitos del SI innato son generalmente la primera oleada de respuesta. Activados y reclutados por las moléculas secretadas a raíz de la detección de los DAMPs y PAMPs, los neutrófilos y macrófagos fagocitan microorganismos y los eliminan. Esta ingestión y eliminación es 100 veces más eficaz si las dianas han sido previamente opsonizadas (Parkin & Cohen, 2001). La opsonización puede ocurrir tanto por la presencia de anticuerpos (que inducirían la ADCP) como por la acción del sistema del complemento, el cual está presente actuando en paralelo. Éste último también puede verse potenciado por los anticuerpos gracias a la CDC.

Si estas medidas no bastan para eliminar la infección, al menos frenan su propagación dando tiempo a la activación del SI adaptativo. De hecho, algunas infecciones como las causadas por *Mycobacterium tuberculosis* y *Legionella pneumophila* son capaces de escapar del SI innato resistiendo los mecanismos citotóxicos intracelulares de los fagocitos (Nicholson, 2016). Para

poder eliminarlas es precisa la participación del SI adaptativo para que los linfocitos T reconozcan las señales de la infección a través del MHC-I.

Si el SI adaptativo entra en juego es en realidad debido a que, a la par de neutrófilos y macrófagos, hay otras células fagocíticas del SI innato actuando, las APC. Estas células, principalmente las DCs, fagocitan a los patógenos o a los restos que quedan de ellos y producen antígenos que presentan asociados tanto al MHC-I como al MHC-II. De esa forma se aseguran que cualquier péptido extraño sea presentado a los linfocitos. Para que el encuentro que produce la activación no quede al azar, las DCs migran a través de los vasos linfáticos hasta los nódulos linfáticos, donde se encuentran los linfocitos T y B que no están circulando en la sangre (Yatim & Lakkis, 2015). También hay linfocitos B presentes en el bazo, al que las DCs y los antígenos libres llegan a través de la sangre (Nicholson, 2016; Parkin & Cohen, 2001). A raíz de ese encuentro, las DCs proporcionan las señales de activación y coestimulación que requieren los linfocitos T_h . Éstos subsecuentemente aportan las señales adicionales que requieren los linfocitos T_c y B para garantizar su completa proliferación y diferenciación, tras lo cual llevan a cabo sus funciones (eliminación de los patógenos y producción de anticuerpos, respectivamente) y generan la memoria inmunitaria. No sólo eso, los linfocitos T_h también estimulan al SI innato a través de la producción de diversas citoquinas, como por ejemplo IFN γ , que activa la eliminación intracelular de los macrófagos e induce la citotoxicidad de las células NK (Parkin & Cohen, 2001).

Por su parte, las células NK del SI innato están continuamente controlando que todos los tejidos expresen el MHC-I, ya que la estrategia de algunas infecciones o células tumorales es inhibir su expresión para escapar del SI adaptativo. En caso de encontrar células sin MHC-I, las células NK se activan y las eliminan mediante rápidas respuestas inmunitarias en ausencia de presentación de antígenos y de anticuerpos (Y. Zhu et al., 2016). Además, en presencia de anticuerpos son capaces de eliminar la correspondiente diana mediante la ADCC. Adicionalmente, las células NK también producen citoquinas pleiotrópicas como IFN γ , el cual activa y conecta las respuestas innatas y adaptativas (Dunn et al., 2006; Sportoletti et al., 2021).

Por último, el SI se autoregulará para inhibir la actividad inmunitaria y eliminar el exceso de células producidas. Solamente quedará un pequeño remanente de células de memoria preparadas ante una posible reinfección.

1.3.5 El Sistema Inmunitario y la muerte celular

El SI responde de manera distinta a las células en función de qué tipo de muerte han sufrido. Puede permanecer inalterado como en el caso de la apoptosis, que en condiciones normales se considera un proceso silencioso a nivel inmunitario. La razón es que a pesar de las alteraciones que sufre la membrana plasmática durante el proceso, ésta mantiene su integridad. Esto, sumado a la rápida eliminación de las células apoptóticas por los fagocitos permite que el proceso se realice sin inflamación o minimizando la activación del SI (D. Tang et al., 2019; R. C. Taylor et al., 2008). Teniendo en cuenta la desorbitada cantidad de células del organismo que mueren por apoptosis (se estima que un millón por segundo (Ichim & Tait, 2016)) y el coste de

iniciar una respuesta inmunitaria, esto es de gran relevancia. No interesa que el SI reaccione a todas esas muertes, no solo por el gasto de recursos sino también por las posibles consecuencias que esas respuestas pudieran tener sobre los tejidos sanos. Además, varios de los mecanismos de las células del SI terminan induciendo apoptosis en sus células diana, por lo que su propia acción generaría bucles de respuestas.

Respecto a los fagocitos que eliminan a las células apoptóticas, es llamativo su papel en el proceso ya que normalmente están implicados en eventos de reconocimiento y eliminación de lo extraño (R. C. Taylor et al., 2008). Además, pueden llevar a cabo presentación cruzada de péptidos de las células apoptóticas: los péptidos antigénicos producidos a partir de las células apoptóticas fagocitadas pueden entrar en la ruta de presentación del MHC-I (R. C. Taylor et al., 2008).

En cambio, otros tipos de muerte celular tienen la capacidad de activar al SI, o, dicho de otra manera, tienen potencial inmunogénico. La muerte celular inmunogénica es un concepto originado en 2005 según el cual la muerte celular inducida por determinados estímulos puede alertar al SI generando inmunidad contra los antígenos de las células muertas (D. Tang et al., 2019). Se caracteriza por la liberación al medio extracelular o la exposición en la superficie celular de diferentes DAMPs que inician una respuesta inmunitaria (por ejemplo, moléculas como la calreticulina, el ATP y HMGB1). Aquí las DCs ejercen una actividad esencial en la presentación cruzada vía MHC-I de antígenos exógenos que han capturado previamente a partir de los restos celulares implicados (Jaime-Sánchez et al., 2020; Minute et al., 2020).

Las células muertas accidentalmente por necrosis (ya sea por un trauma o una infección) desencadenan casi invariablemente una inflamación vía neutrófilos, macrófagos y otras células del SI innato. Esto es debido a que al perder la integridad de membrana se produce la liberación de DAMPs al espacio extracelular que estimulan uno o más PRRs en los macrófagos, DCs y células NK. Las DCs adquieren antígenos para presentar y activar a los linfocitos T que inician respuestas inmunitarias mayores. La presencia de células necróticas en un tejido es interpretada frecuentemente como algo peligroso por parte del SI, y la respuesta generada puede llevar a una mayor muerte celular (R. C. Taylor et al., 2008).

De manera similar, la necroptosis, piroptosis y ferroptosis al ser de carácter lítico están entre las modalidades inmunogénicas de la muerte celular programada (Jaime-Sánchez et al., 2020). De hecho, sus funciones conocidas se encuentran vinculadas con el SI:

- Necroptosis: su principal papel fisiológico parece ser el control de infecciones durante la respuesta innata del SI. Es un mecanismo de refuerzo de la apoptosis, creando un robusto componente proinflamatorio que alerte al SI. También tiene un papel controlando la homeostasis de los linfocitos T_c (de Miguel et al., 2022).
- Piroptosis: esta ruta está conectada con la muerte celular activada en macrófagos y células epiteliales como mecanismo protector del anfitrión contra infecciones bacterianas intracelulares (de Miguel et al., 2022).

- **Ferroptosis:** se ha descrito que los linfocitos T_c CD8⁺ inducen ferroptosis en células tumorales durante el tratamiento con inhibidores de los puntos de control inmunitarios (ver apartado 1.3.6.1 y apartado 1.3.6.2). En dichos casos la peroxidación fue mediada aparentemente por el IFN γ secretado por los linfocitos T_c (de Miguel et al., 2022).

La conexión entre estos tipos de muerte celular inmunogénica con la apoptosis (ver apartado 1.2.1) y el SI podría explicarse nuevamente desde un punto de vista evolutivo. Cuando se produce la infección de un patógeno, las defensas inicialmente activarían la apoptosis dependiente de caspasas. Su activación completa y exitosa eliminaría el foco infeccioso y además inhibiría la inducción de las modalidades inflamatorias de la necroptosis y piroptosis. Sin embargo, en situaciones en las que los patógenos o tumores hayan desarrollado formas de bloquear o inactivar la primera línea de defensa para permitir la supervivencia, la necroptosis y/o piroptosis se activarían en función del contexto celular, dando pie a una inflamación capaz de iniciar una respuesta inmunitaria. Actuarían así como un mecanismo protector, desarrollado por los organismos pluricelulares como producto de millones de años de co-evolución con patógenos que han evolucionado para evadir los mecanismos de muerte celular (de Miguel et al., 2022).

1.3.6 El Sistema Inmunitario y el cáncer

Una vez vistas sus características, queda claro que el SI es muy sofisticado. Tanto, que a veces hasta es un problema. Es el caso de los trasplantes de órganos. Salvo que el órgano transplantado tenga un perfil genético muy parecido al original, el SI adaptativo lo reconocerá como extraño, lo atacará y se producirá un rechazo, aunque eso comprometa la vida del organismo (Yatim & Lakkis, 2015).

A pesar de ello, el funcionamiento del SI no es perfecto. Una prueba es que el cáncer se desarrolla porque el tumor termina escapando de la vigilancia de las células del SI (células NK y linfocitos). De hecho, en algunos casos se aprovecha de los mecanismos de autoregulación del SI para su propio beneficio. No obstante, la evasión no es inmediata, sino algo progresivo resultado de la variación de la capacidad inmunogénica del tumor (O'Donnell et al., 2019).

1.3.6.1 Inmunoedición del cáncer

El proceso por el cual el SI puede tanto frenar como promover el desarrollo tumoral se denomina inmunoedición del cáncer. En su forma más compleja consta de 3 fases: eliminación, equilibrio y escape (ver Figura 1.7) (Mittal et al., 2014; O'Donnell et al., 2019):

- **Eliminación:** durante la fase de eliminación, el SI innato y el SI adaptativo cooperan en reconocer y eliminar las células transformadas que han escapado de los mecanismos celulares intrínsecos de control y supresión tumoral (reparación genética, apoptosis, etc.). Por ejemplo, si las células transformadas dañan los tejidos liberando DAMPs, esto reclutará células del SI y se podrá iniciar una respuesta. Por su parte, las células NK eliminan a las células transformadas que han perdido la expresión del MHC-I o que expresan ligandos de estrés a raíz de su transformación. En cuanto a los linfocitos,

también podrán reconocerlas y eliminarlas si las células transformadas expresan antígenos específicos de tumor contra los que no se ha producido tolerancia inmunitaria (por ejemplo, neoantígenos producto de proteínas aberrantes por la traducción de genes con mutaciones somáticas debido a carcinógenos o defectos de reparación) (Mittal et al., 2014; O'Donnell et al., 2019). Si la destrucción de las células tumorales es completa, eliminando el tumor sin que sea clínicamente detectable, ésta es la única fase.

- **Equilibrio:** sin embargo, hay ocasiones que la eliminación no es completa. Esto ocurre debido a que la presión constante del SI adaptativo junto a la inestabilidad genética de las células tumorales puede seleccionar determinados subclones tumorales con una capacidad inmunogénica reducida. De esa forma se evaden del reconocimiento y destrucción del SI, sobreviviendo a la primera fase y entrando en la fase de equilibrio. En este punto, aunque el SI no haya podido eliminarlas, todavía es capaz de controlar el crecimiento de la red tumoral, viéndose éste limitado o incluso estancado durante un período de tiempo indefinido, que puede llegar a ser de años (Mittal et al., 2014; O'Donnell et al., 2019).
- **Escape:** no obstante, durante la fase de equilibrio el SI sigue ejerciendo su presión y en consecuencia puede seguir inmunoeeditando el tumor. En el momento en el que las modificaciones adquiridas por el tumor permiten que su crecimiento ya no esté restringido, entra en la fase de escape. A partir de este punto el tumor empezará a proliferar de forma descontrolada y la enfermedad se convertirá en evidente desde el punto de vista clínico (Mittal et al., 2014; O'Donnell et al., 2019). De hecho, cuando se detecta el tumor clínicamente significa que ya se han superado las fases de eliminación y de equilibrio.

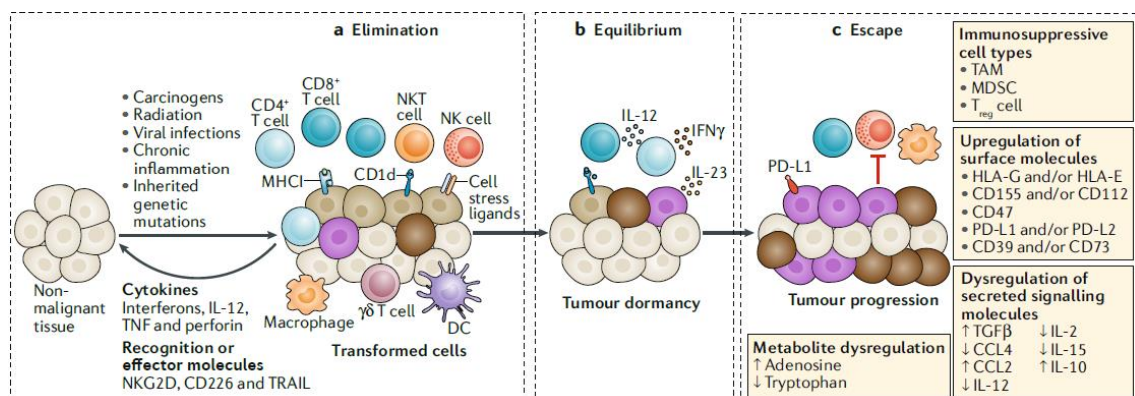


Figura 1.7. Fases de la inmunoección del cáncer. a) Durante la fase de eliminación el SI innato y el SI adaptativo cooperan para reconocer las células que han sido capaces de evadir los mecanismos intrínsecos supresores de tumores y eliminarlos. b) Los tumores que sobreviven a la fase de eliminación progresan a la fase de equilibrio, durante la cual su crecimiento está limitado y su inmunogenicidad es editada por el SI adaptativo. c) Los tumores editados logran pasar a la fase de escape, donde su crecimiento deja de estar restringido (principalmente por la activación de rutas inmunosupresoras). Los tumores que escapan son aquellos clínicamente detectables y visibles. Imagen modificada de (O'Donnell et al., 2019).

A lo largo de estas fases la capacidad inmunogénica del tumor es editada continuamente, y existe la posibilidad y el riesgo de que se adquieran mecanismos inmunosupresores que permitan el progreso de la enfermedad (O'Donnell et al., 2019). Entre dichos mecanismos de escape se pueden describir:

- Menor expresión del MHC-I: al reducirse su expresión hay menos presentación de antígenos y se disminuye la posibilidad de que los linfocitos reconozcan al tumor y lo ataquen. Una de las posibles formas por las que se regula negativamente su expresión es a través de la insensibilización al IFN γ secretado por los linfocitos T y las células NK (O'Donnell et al., 2019; J. S. Weber & Rosenberg, 1988). Además, si se pierde su expresión de manera parcial pero no total, se impide que las células NK ataquen al tumor (Watson et al., 2006).
- Menor expresión de ligandos y receptores activadores de las células NK: de forma similar a lo que ocurre con el MHC-I y los linfocitos, también puede verse reducida la expresión de elementos como MIC-A, MIC-B o ULBP1, por ejemplo. Esto afecta negativamente a la activación de las células NK (Schmiedel & Mandelboim, 2018).
- Alteración de las rutas de apoptosis: por un lado, está descrito que pueden expresarse en los tumores variantes truncadas de los DRs, lo cual imposibilita que se transduzca la señal apoptótica (Vesely et al., 2011). Por otra parte, es muy frecuente que se produzca un aumento de la expresión de las proteínas antiapoptóticas, dificultando a varios niveles el curso de la apoptosis. De todas las proteínas antiapoptóticas, las que más se sobreexpresan habitualmente son c-FLIP en la ruta extrínseca (Y. Kim et al., 2002), Bcl-xL, Bcl-2 o Mcl-1 en la ruta intrínseca (Hata et al., 2015) y XIAP en ambas rutas (Krajewska et al., 2003). Con respecto a la ruta intrínseca, también es típico la regulación negativa o inactivación de las proteínas proapoptóticas incluyendo Bim, Bid, Bad, Noxa, PUMA y Hrk, o de las proteínas formadoras de poro Bax y Bak (Carneiro & El-Deiry, 2020; Singh et al., 2019).
- Refuerzo de los puntos de control inmunitario: estos puntos son receptores expresados en las células inmunitarias que producen su agotamiento al interactuar con sus respectivos ligandos. El agotamiento se entiende como un estado potencialmente permanente de disfunción caracterizado por la ausencia o reducción de la función efectora de la célula y la inhibición de su proliferación. Estas interacciones permiten prevenir fisiológicamente una reacción excesiva del SI y evitar dañar al tejido normal, manteniendo la homeostasis inmunitaria durante las respuestas antimicrobianas o antivíricas, así como limitando la extensión de la inflamación autoinmune (Cai et al., 2021; Johnson et al., 2022). No obstante, este mecanismo de control puede ser explotado por las células tumorales para mantener la tolerancia inmunitaria. Al expresar o imitar los ligandos de los puntos de control inmunitario inhiben a las células inmunitarias y evaden la inmunovigilancia. Los principales puntos de control son PD-1 (*Programmed cell Death protein 1*) y su ligando PD-L1 (*Programmed Death-Ligand 1*), CTLA-4, TIM-3

y LAG-3. Son particularmente relevantes en los linfocitos T, aunque pueden afectar a otras células del SI como las células NK (Cai et al., 2021; Johnson et al., 2022).

El inmunoeditado ocurre originalmente durante la progresión natural del tumor, pero vuelve a producirse en respuesta a determinados tratamientos, ya que se terminan seleccionando subclones que causan la resistencia (O'Donnell et al., 2019). Estos mecanismos de resistencia a las terapias parecen solapar con los que usan los cánceres conforme van sufriendo la inmuoedición para evadir la detección del SI (O'Donnell et al., 2019).

Además de lo previamente mencionado, las propias células tumorales pueden crear progresivamente un microambiente tumoral inmunosupresor en función de cómo van modelando las células de su entorno y del reclutamiento de células del SI favorables a su crecimiento. Entre esas células inmunitarias se encuentran los linfocitos T_{reg}, neutrófilos asociados al tumor, macrófagos asociados al tumor (cambian su perfil de secreción de M1, proinflamatorio, a M2 que favorece la regeneración de tejidos y del tumor) y células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) que promueven la angiogénesis. Todas estas células en su conjunto influyen negativamente en la respuesta inmunitaria contra el tumor (Hui & Chen, 2015; Janssen et al., 2017; O'Donnell et al., 2019). Entre los mecanismos que generan dicho microambiente tumoral se encuentran la hipoxia y la producción de metabolitos solubles por parte de las células tumorales que alteran al resto de células (O'Donnell et al., 2019).

1.3.6.2 Inmunoterapia del cáncer

Dado que el SI del organismo queda comprometido conforme se va desarrollando el tumor, se han ideado estrategias para mejorarlo o reponerlo y así recuperar una actividad antitumoral adecuada que permita frenarlo o eliminarlo. Este tipo de tratamiento se conoce como inmunoterapia del cáncer y suele centrarse en potenciar la respuesta inmunitaria adaptativa.

La inmunoterapia es un campo en auge y continua evolución. Durante los últimos años ha ganado mucha repercusión y notoriedad en los medios de comunicación gracias a que ha demostrado buenos resultados en multitud de ensayos clínicos en pacientes con distintos tipos de cáncer. De hecho, fue seleccionada en el año 2013 por la revista *Science* como el “Avance del año” (H. Zhang & Chen, 2018). Aunque esto pueda hacer creer que se trata de una técnica novedosa, en realidad el concepto de inmunoterapia se originó en la década de 1890 cuando William B. Coley inyectó bacterias en tumores (Coley, 1893). Dentro de la inmunoterapia, existen varias modalidades distintas en función del enfoque con el que aborden la reactivación del SI:

- Uso de anticuerpos monoclonales (mAbs) contra dianas tumorales: tal y como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos tienen un papel potenciador sobre el sistema del complemento (CDC), las células NK (ADCC) y los macrófagos (ADCP). Al utilizar mAbs diseñados contra marcadores o antígenos tumorales, se consigue reorientar dichos elementos del SI innato para que reconozcan y eliminen las células tumorales que los expresen. Este tipo de inmunoterapia se ha convertido en clave para el éxito del tratamiento de muchos cánceres. El principal ejemplo es rituximab, un anticuerpo

- quimérico anti-CD20. Fue el primero utilizado en la clínica y supuso un éxito y una revolución en el tratamiento de varias neoplasias de linfocitos B como el linfoma folicular o el linfoma no-Hodgkin (Frerichs et al., 2018; Maloney, 2003; W. Wang, 2015). Hoy en día existe una amplia lista de mAbs aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) y utilizados en clínica contra distintos cánceres, como por ejemplo cetuximab (cáncer colorrectal), pertuzumab y trastuzumab (cáncer de mama), dinatuximab (neuroblastoma) y daratumumab (mieloma múltiple, MM) (Zahavi & Weiner, 2020). También se pueden usar mAbs indirectamente para que reconozcan y bloqueen ILs o factores de crecimiento solubles necesarios para el tumor (Zahavi & Weiner, 2020).
- Inhibidores de los puntos de control inmunitarios: para evitar que el tumor regule negativamente la actividad de las células del SI a través de los puntos de control inmunitarios, se han desarrollado diversos inhibidores. En general, se tratan de mAbs diseñados contra los ligandos de las células tumorales o contra los receptores de las células del SI que forman parte de estos puntos de control. A diferencia de los anticuerpos del apartado anterior que buscan eliminar las células diana, estos anticuerpos persiguen bloquear la interacción entre ambos elementos del punto de control inmunitario. Por ejemplo, ipilimumab y tremelimumab son anticuerpos anti-CTLA-4 que al interaccionar con él impiden su unión con CD80/CD86; y pembrolizumab y nivolumab son anticuerpos anti-PD-1 que al unirse a él bloquean su unión con PD-L1. También existen anticuerpos anti-PD-L1 como atelizumab y avelumab (Webb et al., 2019; Zahavi & Weiner, 2020). Ante el éxito de este tipo de inmunoterapia (sobre todo en cáncer de pulmón y melanomas avanzados), Tasuku Honjo y Jim Allison recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina del año 2018 por su investigación sobre PD-1/PD-L1 y CTLA-4 respectivamente.
 - Factores inmunomoduladores: tanto las citoquinas como otras moléculas pueden estimular o inhibir la actividad de diferentes componentes del SI. Entre ellas, el uso de IL-2 está aprobado en distintos tipos de cáncer (melanoma avanzado y cáncer renal metastásico). El IFN- γ también está aprobado, aunque en este caso para la tricoleucemia. Otras citoquinas como IL-12 o IL-15 continúan siendo evaluadas en la clínica. A diferencia de los tipos de inmunoterapia descritos previamente, en este caso los resultados no han sido tan positivos o incluso han sido indeseados. Esto se debe a que no siempre se alcanzan las concentraciones adecuadas en el microambiente tumoral. Además, al tratarse en muchos casos de moléculas pleiotrópicas con efecto sobre muchos tipos celulares, pueden generar efectos secundarios. Por todo ello se está investigando combinarlas con otras modalidades de terapia anti-tumoral (Waldmann, 2018).
 - Vacunas terapéuticas: aparte de las vacunas existentes para prevenir cánceres inducidos por infecciones víricas (virus oncogénicos como el virus del papiloma humano o el virus de la hepatitis B), se está investigando inyectar vacunas que contengan antígenos tumorales adyuvantes que generen una respuesta inmunitaria antitumoral.

Muchos de los antígenos tumorales seleccionados consisten en péptidos derivados de proteínas que pueden estar presentes en las células sanas, pero que se sobreexpresan en las células tumorales. Se han llevado a cabo varios ensayos clínicos durante las dos últimas décadas, aunque por el momento sin demasiado éxito (Finn, 2018).

- Terapia celular adoptiva: debido a la relevancia que tiene esta estrategia en esta tesis doctoral, se le dedica una sección entera (ver apartado 1.3.6.2.1)

1.3.6.2.1 Terapia celular adoptiva

Este tipo de terapia consiste en aislar células del SI del paciente o de donantes sanos para estimularlas y expandirlas *ex vivo*. De esta forma se consigue activar las células inmunitarias y que tengan más capacidad de atacar al tumor cuando se reinyecten en el paciente. Puede realizarse con:

- Linfocitos T: del paciente infiltrados en el tumor, expandiéndolos *in vitro* y reinyectándolos después (Rosenberg et al., 1986).
- Células NK: en este caso alogénicas (es decir, de un donante), para que su acción no se vea contrarrestada por el HLA-I del tumor del paciente (Morvan & Lanier, 2016). Pueden aislarse a partir de sangre periférica o de sangre de cordón umbilical (Calvo et al., 2020; Pittari et al., 2017; Reina-Ortiz et al., 2020) y después ser activadas y expandidas más de 1.500 veces (en promedio) *in vitro* (Pittari et al., 2017; Sánchez-Martínez et al., 2018; Sánchez-Martínez et al., 2016). La inmunoterapia basada en células NK es una aproximación terapéutica prometedora, ya que se consiguen potentes respuestas antitumorales de forma selectiva respetando a la vez a las células sanas. Aun así, el microambiente tumoral representa un potencial obstáculo ya que contribuye a la adquisición de resistencia a las terapias (Mahaweni et al., 2018).

Inicialmente, la terapia celular adoptiva se realizaba directamente con las células extraídas del propio paciente, una vez activadas y expandidas. Actualmente ha evolucionado y por ingeniería genética se modifican las células para que expresen un receptor de antígeno quimérico (CAR) (Köhler et al., 2018).

Los CAR son receptores sintéticos capaces de reconocer antígenos e inducir la activación de las células inmunitarias que los expresan. Consisten en proteínas de fusión que comprenden un dominio extracelular de unión a antígeno (generalmente un scFv), un dominio espaciador, un dominio transmembrana y uno o más dominios intracelulares (An et al., 2018; N. Kim et al., 2019; Köhler et al., 2018; Lee et al., 2012; Sadelain et al., 2013). El número y tipo de dominios intracelulares varía en función de la generación a la que corresponda el CAR (Figura 1.8).

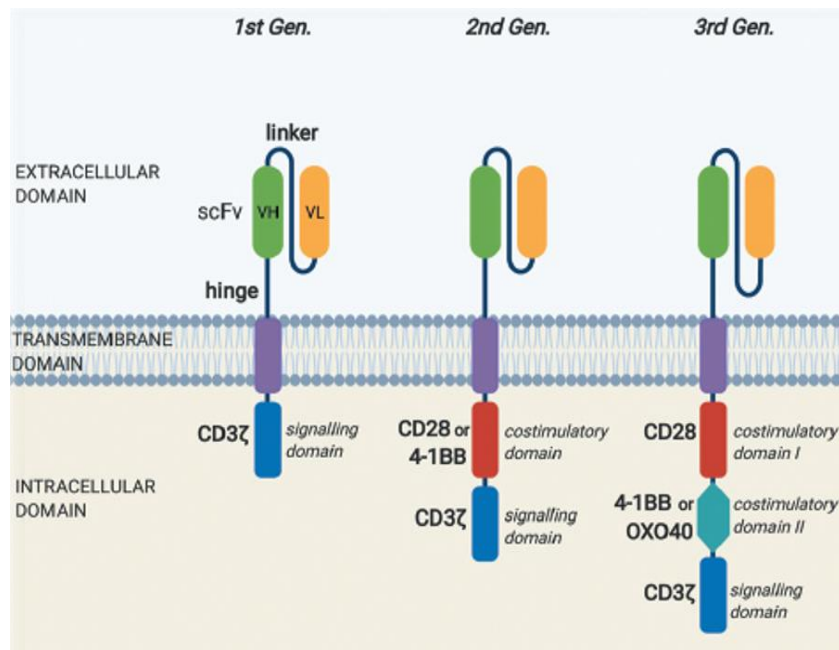


Figura 1.8. Estructura de las 3 primeras generaciones de un receptor de antígeno quimérico (CAR). Las distintas generaciones de CAR parten de la misma base de un dominio extracelular con el scFv (single-chain variable Fragment) específico de antígeno, un dominio espaciador (hinge), un dominio transmembrana y una parte intracelular encargada de transducir la señal de activación. El número de dominios intracelulares ha ido aumentando desde tener sólo el dominio de señalización de CD3 ζ a que éste esté acompañado por uno o varios dominios coestimuladores como CD28, 4-1BB u OX40. Imagen modificada de (Rallis et al., 2021).

Los CAR de primera generación únicamente poseen el dominio de señalización de CD3 ζ . Este dominio está presente en todos los tipos de CAR, ya que es esencial para que se transduzca la señal de activación una vez se ha unido el CAR a su antígeno. Los CAR de segunda generación incorporan otro dominio intracelular coestimulador, derivado de proteínas tales como CD28 o 4-1BB, y los CAR de tercera generación incluyen los tres dominios intracelulares (An et al., 2018; Jayaraman et al., 2020; Köhler et al., 2018; Lee et al., 2012; Rallis et al., 2021). Tras tres décadas de desarrollo, los CAR son un campo en el que se sigue innovando y siguen produciéndose nuevas generaciones basadas en cambios tanto en los dominios extracelulares como en los intracelulares.

Los CAR fueron desarrollados originalmente en los linfocitos T (CAR-T) para redirigir su especificidad contra antígenos de superficie expresados en la superficie de las células tumorales diana. Gracias al reconocimiento a través de un receptor artificial la activación de los CAR-T es independiente de la molécula MHC/HLA, solventando así una de las principales limitaciones de los linfocitos T (Eshhar et al., 1993; Friedmann-Morvinski et al., 2005; Gross et al., 1989; N. Kim et al., 2019; Köhler et al., 2018; Pule et al., 2003).

Esto les convierte en una estrategia prometedora contra muchos cánceres (An et al., 2018; N. Kim et al., 2019). De hecho, los impresionantes resultados de un CAR-T anti-CD19 en

neoplasias de linfocitos B fueron un hito en la historia de la inmunoterapia contra el cáncer (Brentjens et al., 2013; Grupp et al., 2013; Jackson et al., 2016; Kochenderfer et al., 2010; Maude et al., 2014; Porter et al., 2011; Turtle et al., 2016). Sin embargo, a pesar de su tremenda eficacia, los CAR-T presentan una serie de problemas tales como toxicidad, síndrome de liberación de citoquinas, aplasia medular prolongada, enfermedad de injerto contra huésped y daños celulares colaterales (en tejidos sanos que expresen el mismo antígeno) (Pittari et al., 2017). Por eso, uno de los primeros desafíos en el desarrollo de un CAR-T efectivo y seguro es identificar un antígeno que esté expresado uniformemente en las células tumorales y ausente o expresado en niveles significativamente inferiores en tejidos normales (Köhler et al., 2018).

De todas formas, se ha postulado que varios de estos problemas podrían solucionarse modificando y expresando los CAR en células NK. Las células CAR-NK presentan potenciales ventajas, como por ejemplo no tener excesivas toxicidades (Pittari et al., 2017), ni producir enfermedad de injerto contra huésped, y tener menos costes (H. Klingemann et al., 2016). Ya se han diseñado diversas células CAR-NK y se están evaluando en ensayos clínicos (Albinger et al., 2021). Aun así, todavía quedan varias etapas para optimizar su paso a la clínica. En particular, la elección de la fuente más óptima de células NK.

Este es un problema común con las terapias adoptivas con células NK normales. Al ser una población tan minoritaria en sangre y con bastantes requisitos para activarse y expandirse, resulta difícil obtener grandes cantidades de ellas para los tratamientos *in vivo*, sobre todo si se plantea su uso a gran escala. Todo ello, junto con el hecho de que el genotipo de cada individuo afecta a la funcionalidad de sus células NK, provoca una gran variabilidad en los resultados dependiendo del donante que se utilice para su activación y expansión. Las líneas inmortalizadas de células NK, como las células NK-92, son una fuente más estable, independiente de donante y pueden ser eficientemente transfectadas y expandidas (H. Klingemann et al., 2016; Pittari et al., 2017; Suck et al., 2016).

1.3.6.2.1.1 Línea celular NK-92

La línea celular NK-92 fue establecida en 1992 a partir de células de sangre periférica de un paciente de 50 años diagnosticado con un linfoma no-Hodgkin de células NK. Estas células crecen formando agregados esféricos en suspensión y al ser de origen tumoral su capacidad de expansión es casi ilimitada (Gong et al., 1994; Shimasaki et al., 2020; Suck et al., 2016; Williams et al., 2017; Yan et al., 1998).

Aun así, su crecimiento y también sus funciones citotóxicas son dependientes de la presencia de IL-2 exógena. Su privación conduce a la pérdida de citotoxicidad a las 24 horas y a la muerte de estas células a las 72 horas. Una dosis mínima de 10 Unidades Internacionales (UI)/ml de IL-2 humana recombinante es suficiente para mantener la proliferación, aunque comúnmente se mantienen a 100 UI/ml para asegurar una alta actividad citotóxica (Gong et al., 1994; Maki et al., 2001; Suck et al., 2016; Williams et al., 2017; Yan et al., 1998).

De su inmunofenotipo destaca que son CD3⁻, CD56^{bright} y CD16⁻, por lo que no son capaces de mediar una respuesta ADCC (Gong et al., 1994; H. Klingemann et al., 2016; Maki et al., 2001; Shimasaki et al., 2020; Suck et al., 2016; Williams et al., 2017; Yan et al., 1998). Este fenotipo es típico de un subconjunto de células NK de la sangre periférica con funciones inmunomoduladoras. A pesar de ello, las células NK-92 son altamente citotóxicas, por lo que se cree que estas células derivan de un progenitor temprano indiferenciado de las células NK (Suck et al., 2016). Expresan en gran cantidad las moléculas de las rutas citotóxicas, tales como perforina y granzima B (Maki et al., 2001; Suck et al., 2016), mientras que la expresión de otras moléculas como los ligandos mortales no está tan clara (Iannello et al., 2009; Maki et al., 2001; Song et al., 2016; Yu et al., 2009).

De forma similar a las células CD56^{bright}, las células NK-92 carecen de casi todos los receptores de la familia KIR y por lo tanto apenas tienen receptores inhibitorios (Maki et al., 2001; Suck et al., 2016; Williams et al., 2017). Los únicos que expresan son KIR2DL4 (CD158d) y las moléculas NKG2A y NKG2B, todos ellos receptores de moléculas de HLA no clásicas (Maki et al., 2001; Suck et al., 2016). En cambio, tienen un alto número de receptores activadores incluyendo NKp46, NKp30, NKG2D, NKG2E, DNAM-1 y 2B4 (Maki et al., 2001; Suck et al., 2016). Por último, también tienen una elevada expresión de moléculas ICAM (*Intercellular Adhesion Molecules*), implicadas en la adhesión a sus dianas (Maki et al., 2001). La combinación de los niveles de expresión de las moléculas de adhesión y de los receptores activadores, así como la falta de receptores inhibitorios produce que las células NK-92 estén activadas constitutivamente (H. Klingemann et al., 2016; Shimasaki et al., 2020; Williams et al., 2017). Esto explica su alta citotoxicidad y que sean altamente efectivas contra un amplio espectro de dianas tumorales (tanto tumores primarios como líneas establecidas), que incluye leucemias, leucemias mieloides agudas, linfomas, el mieloma múltiple y tumores sólidos como el cáncer de próstata, el cáncer de mama, el neuroblastoma y el glioblastoma (Gong et al., 1994; H. Klingemann et al., 2016; Suck et al., 2016; Yan et al., 1998).

En general, las células NK-92 tienen características funcionales y fenotípicas similares a las células NK humanas activadas o a las células NK primarias (Gong et al., 1994; Maki et al., 2001; Shimasaki et al., 2020; Yan et al., 1998; Yu et al., 2009). No obstante, su alta actividad citotóxica resulta superior a ellas (a ratios iguales de células efector-diana, las células NK-92 matan más de 20 veces más rápido que las células NK primarias recién aisladas (Y. Zhu et al., 2016)). Otro aspecto destacable de su fuerte actividad citotóxica es que es robusta y universal (H. Klingemann et al., 2016). De hecho, es la única de las siete líneas de células NK conocidas (NK-92, NK-YS, KHYG-1, NKL, NKG, SNK-6 e IMC-1) que han mostrado alta citotoxicidad antitumoral de forma consistente y reproducible (H. Klingemann et al., 2016).

La suma de estos factores hace que las células NK-92 sean interesantes como modelo de investigación. Además, presentan ventajas en comparación con otras terapias como las células NK autólogas o las células CAR-T: están constitutivamente activadas, no tienen ni limitaciones de expansión ni variaciones específicas de los donantes (Williams et al., 2017), no

producen enfermedad de injerto contra huésped, y su manipulación es más sencilla (no necesitan células estimuladoras) y sobre todo, más barata (unas diez veces menos de coste de preparación y administración que los CAR-T) (H. Klingemann et al., 2016; Suck et al., 2016). Todo esto en conjunto hace que tengan un gran potencial para la inmunoterapia adoptiva por generar grandes cantidades de células efectoras con elevada citotoxicidad potencial para su uso en clínica (Maki et al., 2001; Suck et al., 2016; Yan et al., 1998).

Aunque administrar células de origen maligno a los pacientes de cáncer pueda parecer contradictorio, existen muchas evidencias que indican que es un proceso seguro. Entre ellas hay un gran número de ensayos en ratones inmunocomprometidos SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) con tumores xenotransplantados en los que las células NK-92 no sólo los eliminan y prolongan la supervivencia de los ratones, sino que ellas tampoco resultan tumorigénicas (Chu, Deng, et al., 2014; Suck et al., 2016; Tam et al., 1999; Yan et al., 1998; G. Zhang et al., 2013). En otros estudios se ha comprobado la ausencia de toxicidad contra células sanas, como células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) o células hematopoyéticas de sangre periférica, y la ausencia de riesgo de que se produzcan complicaciones de injerto contra tejido (H. G. Klingemann, 2013; Suck et al., 2016).

A raíz de estos resultados preclínicos, a partir del año 2001 las células NK-92 han sido utilizadas en varios ensayos clínicos (NCT00900809, NCT00990717, NCT02727803) (Reina-Ortiz et al., 2022; Suck et al., 2016). Los ensayos de fase I (NCT00900809 y NCT00990717) se completaron demostrando seguridad y una expansión a gran escala de las células NK-92 (H. Klingemann et al., 2016; Swift et al., 2012). Además, se observaron beneficios clínicos tales como una mayor citotoxicidad que terapias con células NK primarias autólogas y alogénicas (Swift et al., 2012) y efectos secundarios mínimos (H. Klingemann et al., 2016).

En todos estos ensayos, a pesar de la seguridad que mostraron preclínicamente, las células NK-92 fueron administradas por infusión sanguínea habiendo sido previamente irradiadas. De esa forma se previene su proliferación *in vivo* dentro del paciente, a la par que se mantiene su capacidad citotóxica (H. Klingemann et al., 2016; Suck et al., 2016). Aunque *in vitro* y preclínicamente se han probado distintas dosis de irradiación (H. Klingemann et al., 2016; Liu et al., 2020; Yan et al., 1998), en los ensayos clínicos se han utilizado irradiadas a 10 Gy (X. Tang et al., 2018; Williams et al., 2017). Por ejemplo, en el ensayo NCT00990717 las células NK-92 irradiadas a 10 Gy se administraron a dosis muy altas en pacientes que habían sufrido recaídas de cánceres hematológicos (entre los que había MM) produciendo toxicidades mínimas (Williams et al., 2017). La conclusión de dicho ensayo fue que la terapia a altas dosis de células NK-92 es segura y muestra algunas evidencias de eficacia en dichos pacientes (Williams et al., 2017). De todas formas, dada su habilidad para actuar sobre células clonogénicas resistentes a los fármacos, se piensa que la terapia con células NK pueda ser más útil erradicando la enfermedad mínima residual que quede tras la quimioterapia (Swift et al., 2012).

Por otra parte, su crecimiento robusto y continuo de forma clonal como línea celular establecida supone una atractiva plataforma para la modificación genética (Suck et al., 2016).

Sobre todo, teniendo en cuenta que pueden ser manipuladas genéticamente utilizando métodos no víricos de manera más fácil que las células NK primarias aisladas de muestras sanguíneas (H. Klingemann et al., 2016).

Por lo tanto, se están desarrollando versiones de estas células que expresen el receptor CD16 para permitir el reconocimiento de antígenos tumorales al combinar con mAbs (H. Klingemann et al., 2016; Suck et al., 2016). Estas nuevas células podrían a su vez volver a modificarse con uno o dos scFv o mAbs, obteniendo así células NK-92 bi- o trispecíficas (BiKEs o TriKEs) (Suck et al., 2016).

También se han generado diversos CAR-NK-92 específicos de distintos tumores con propósitos clínicos (Shimasaki et al., 2020; Suck et al., 2016; C. Zhang et al., 2017). Entre las dianas utilizadas se encuentran CD19, CD20, CD33, CD38 (para MM), CD138 (para MM) EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*), EBV, HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*), y SLAMF7 (*Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family member 7*, para MM) (Chu, Deng, et al., 2014; Rezvani et al., 2017; Shimasaki et al., 2020; Suck et al., 2016; X. Tang et al., 2018; C. Zhang et al., 2017). Estos CAR-NK tienen mejores resultados que las células NK activadas parentales y algunas ventajas respecto a los CAR-T, como por ejemplo ser independientes de donantes, ya que es una línea establecida (H. Klingemann et al., 2016). La mayoría se tratan por el momento de estudios preclínicos, pero algunos de ellos ya se encuentran en ensayos clínicos (X. Tang et al., 2018; Williams et al., 2017).

Su limitación, compartida con los CAR-T, sería que son específicos para el antígeno contra el que se han diseñado. Por ello también se están empezando a estudiar CAR-NK-92 con moléculas adaptadoras que permitan con un mismo CAR reconocer distintos antígenos, como por ejemplo UniCAR (*Universal CAR*) y AdCAR (*Adapter CAR*) (Grote et al., 2021; Mitwasi et al., 2020).

1.4 MIELOMA MÚLTIPLE

1.4.1 Características generales

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células plasmáticas monoclonales diferenciadas a partir de linfocitos B (Kumar et al., 2017; van de Donk et al., 2021). Se trata, por tanto, de un cáncer hematológico. En los países desarrollados es el segundo más frecuente de este tipo, únicamente por detrás del linfoma no-Hodgkin (R. L. Siegel et al., 2016); y globalmente supone el 1% de todas las malignidades (Cowan et al., 2018). Los pacientes afectados tienen una media de edad en torno a los 70 años (Cowan et al., 2018) y su incidencia anual se ha incrementado en un 126% en las últimas décadas (desde 1990 a 2016), alcanzando una incidencia de 4,5-6 por cada 100.000 habitantes (Cowan et al., 2018).

Las células plasmáticas malignas residen inicialmente en la médula ósea, donde se acumulan de forma latente (van de Donk et al., 2021). Conforme la enfermedad progresa,

también pueden encontrarse en sangre periférica y en sitios extramedulares tales como tejidos blandos y órganos (Gonsalves et al., 2014). Dichas células plasmáticas anómalas se caracterizan por expandirse de manera clonal, tener un índice proliferativo bajo a la vez que un ciclo de vida extenso, y, sobre todo, por secretar en la mayoría de pacientes una inmunoglobulina monoclonal (también conocida como proteína M o proteína monoclonal) (Kumar et al., 2017; van de Donk et al., 2021).

1.4.2 Origen y patogénesis

Existen evidencias de que el MM siempre va precedido por una gammapatía monoclonal precursora, que a pesar de compartir características como la infiltración de células plasmáticas clonales en la médula ósea y la secreción de proteína M, es asintomática (Kumar et al., 2017; Landgren et al., 2009; van de Donk et al., 2021).

El más frecuente de estos desórdenes es la gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS) (Kumar et al., 2017; Landgren et al., 2009). También existe un estado intermedio conocido como mieloma múltiple latente (SMM) (Kumar et al., 2017; Kyle et al., 2007). Ante la ausencia de signos o síntomas, sólo una minoría de casos son detectados (Kumar et al., 2017). En el plazo de 5 años tras ser diagnosticados, el 5-7% de pacientes con MGUS y alrededor del 50% de pacientes con SMM terminarán desarrollando MM (Kyle et al., 2006, 2007).

Es importante detectar con antelación estos estados precursores del MM y desarrollar modelos eficaces de progresión, ya que se ha demostrado que conocerlo previamente y tratarlo de forma temprana tiene efectos positivos sobre la supervivencia y puede prolongar el tiempo de desarrollo a MM (Kumar et al., 2017; Mateos et al., 2022).

Dicho desarrollo es un proceso que consta de múltiples etapas (Kumar et al., 2017), la suma de las cuales conduce a la mencionada evolución clonal (*ver Figura 1.9*). Los principales cambios genéticos ocurren de manera temprana en la evolución de la enfermedad, con menos modificaciones identificadas entre el SMM y el MM que entre la MGUS y el SMM (Bolli et al., 2018).

La mayoría de todos esos eventos genéticos convergen en la desregulación del ciclo celular (Bergsagel et al., 2005). Las principales rutas de señalización que también se ven afectadas, induciendo la proliferación celular, son la de NF- κ B (sobre todo la no canónica) y la de las MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), pudiendo verse desregulada también la apoptosis (Kumar et al., 2017; van de Donk et al., 2021).

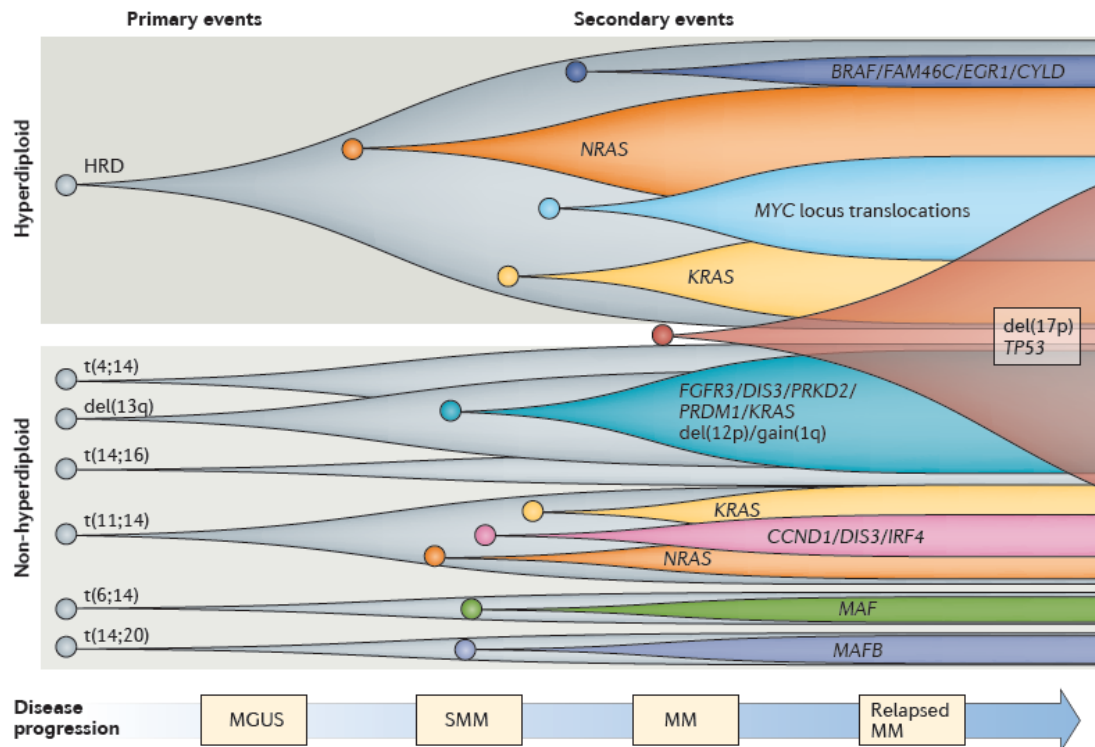


Figura 1.9. Modelo de evolución clonal del mieloma múltiple. Este modelo representa las mutaciones coexistentes más frecuentes que dan pie a la evolución clonal desde una gammapatía de significado incierto (MGUS) hasta el mieloma múltiple (MM). Los eventos genéticos primarios que afectan a determinados clones (ilustrados en gris) incluyen las translocaciones de los genes que codifican las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IGH), las hiperdiploidías (HRD) y la delección 13q. Los eventos genéticos secundarios (clones coloreados) están representados en el fondo de los eventos primarios con los que están asociados. Imagen tomada de (Manier et al., 2017).

1.4.2.1 Eventos genéticos primarios

Hay dos tipos de alteraciones genéticas que conducen al desarrollo de la MGUS, el SMM y el MM (Alagpulinsa et al., 2020; Kumar et al., 2017; Kumar & Rajkumar, 2018; Manier et al., 2017; van de Donk et al., 2021):

- **Translocaciones cromosómicas:** se trata de translocaciones que afectan al locus del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGH, 14q32.33) (Alagpulinsa et al., 2020; González et al., 2007; Kumar et al., 2017; Kumar & Rajkumar, 2018). Para generar la amplia diversidad de inmunoglobulinas del SI, los linfocitos B inmaduros llevan a cabo en la médula ósea entre otros procesos el reordenamiento de los segmentos VDJ y, posteriormente, la rotura en las dos hebras del DNA en el locus IGH (Kumar et al., 2017).

Cuando esas roturas se fusionan con otras presentes en distintas partes del genoma, dan lugar a fusiones aberrantes con translocaciones entre cromosomas (Kumar et al., 2017). Si alguna de ellas implica a algún oncogén, éste pasa a estar controlado por el

enhancer fuerte del gen IGH. Es el caso de las translocaciones t(11;14), t(4;14), t(14;16), t(14;20) y t(6;14), cuya información se recoge en la *Tabla A.1* en el *Apéndice*. Como resultado, la expresión del oncogén se ve aumentada otorgando una ventaja para el crecimiento del clon y pudiendo llevar al desarrollo de los estados patológicos mencionados previamente (MGUS, SMM y MM) (Bergsagel et al., 1996; Bergsagel & Kuehl, 2005; Manier et al., 2016; Morgan et al., 2012; van de Donk et al., 2021).

- Adquisición de aneuploidía: el otro tipo de alteración genética inicial posible es el desequilibrio de la dotación cromosómica. El 35% de pacientes de MM tienen hipodiploidía (<46 cromosomas), el 13% pseudodiploidía (46 cromosomas), y el 52% restante hiperdiploidía (HRD, >47 cromosomas) (Kumar et al., 2017). Ésta última es el tipo de aneuploidía más frecuente, y se caracteriza por varias trisomías co-existentes entre los cromosomas 3, 5, 7, 9, 11, 15 y 19 (Kumar et al., 2017; Manier et al., 2017).

1.4.2.2 Eventos genéticos secundarios

A diferencia de los eventos primarios, las alteraciones genéticas secundarias se encuentran en las poblaciones subclonales, y con mayor frecuencia según evoluciona la enfermedad (desde la MGUS a SMM y luego a MM, incluyendo sus recaídas) (Kumar et al., 2017; Morgan et al., 2012; van de Donk et al., 2021). Estos eventos adicionales, además de ser responsables de la progresión del MM, lo convierten en una enfermedad clínica y biológicamente heterogénea (Kumar et al., 2017; Morgan et al., 2012). En este grupo de modificaciones se distinguen tres tipos:

- Pérdida o ganancia de regiones cromosómicas: se terminan produciendo debido a la existencia en muchos pacientes de anomalías en el número de cromosomas. Por ejemplo, es frecuente la pérdida de genes supresores tumorales (van de Donk et al., 2021).
- Alteraciones epigenéticas: este tipo de defectos incluye alteración de la metilación del DNA (mayor hipometilación en el MM) (Agirre et al., 2015; Heuck et al., 2013), de la estructura de la cromatina y de los niveles de miRNA (*micro Ribonucleic Acid*) (Kumar et al., 2017). Se ha observado que los pacientes con este tipo de desórdenes tienen mayor riesgo de progresión de la enfermedad (Kumar et al., 2017).
- Mutaciones somáticas: en el MM no existe una mutación universal desencadenante, sino que hay presencia de subclones coexistentes con mutaciones únicas que se solapan entre sí (Kumar et al., 2017). Los ratios de mutaciones son altamente variables, pero las más frecuentes ocurren en los genes de la ruta Ras/MAPK (aproximadamente el 50% de pacientes la tienen afectada) (Kumar et al., 2017; van de Donk et al., 2021).

En la *Tabla A.1* del *Apéndice* se recoge la información de los principales tipos de estas alteraciones secundarias.

1.4.3 Papel del microambiente tumoral

En el microambiente de la médula ósea se encuentra una gran variedad de tipos celulares (linfocitos B y T, células NK, MDSCs, osteoclastos, osteoblastos, fibroblastos, células del estroma, células endoteliales y adipocitos) (Ghobrial et al., 2018; Schinke et al., 2018), además de matriz extracelular y vasos sanguíneos (Reina-Ortiz et al., 2022). Todas ellas, individual o colectivamente, pueden interaccionar de manera directa o a través de factores secretados con las células de MM, resultando cruciales para el desarrollo, tratamiento y progresión de la enfermedad (*Figura 1.10*) (Kumar et al., 2017).

Por ejemplo, las células de MM migran a la médula ósea a causa de factores como CXCL12 y ciclofilina A, que son secretados por el microambiente (Cyster, 2003; D. Zhu et al., 2015). Por otra parte, la interacción de las células de MM con las células del estroma favorece la proliferación y supervivencia de las primeras (Mahindra et al., 2010). Como resultado de esa interacción también se produce la secreción de factores como RANKL e IL-6, que activan a los osteoclastos (encargados de la resorción ósea), o factores como DKK1 y SOST que inhiben a los osteoblastos (encargados de la formación ósea). El desequilibrio que se genera entre el número y actividad de estas dos poblaciones celulares produce la pérdida de hueso y el desarrollo de enfermedad ósea (Kumar et al., 2017; Roodman, 1997; van de Donk et al., 2021). Además, como producto de la resorción ósea se liberan IGF1 (*Insulin-like Growth Factor 1*) y TGF- β . Estas citoquinas ocasionan una mayor proliferación del MM y la pérdida de la función inmunitaria en la zona, generando un ambiente inmunosupresor (Pérez-Persona et al., 2007; Terpos et al., 2018).

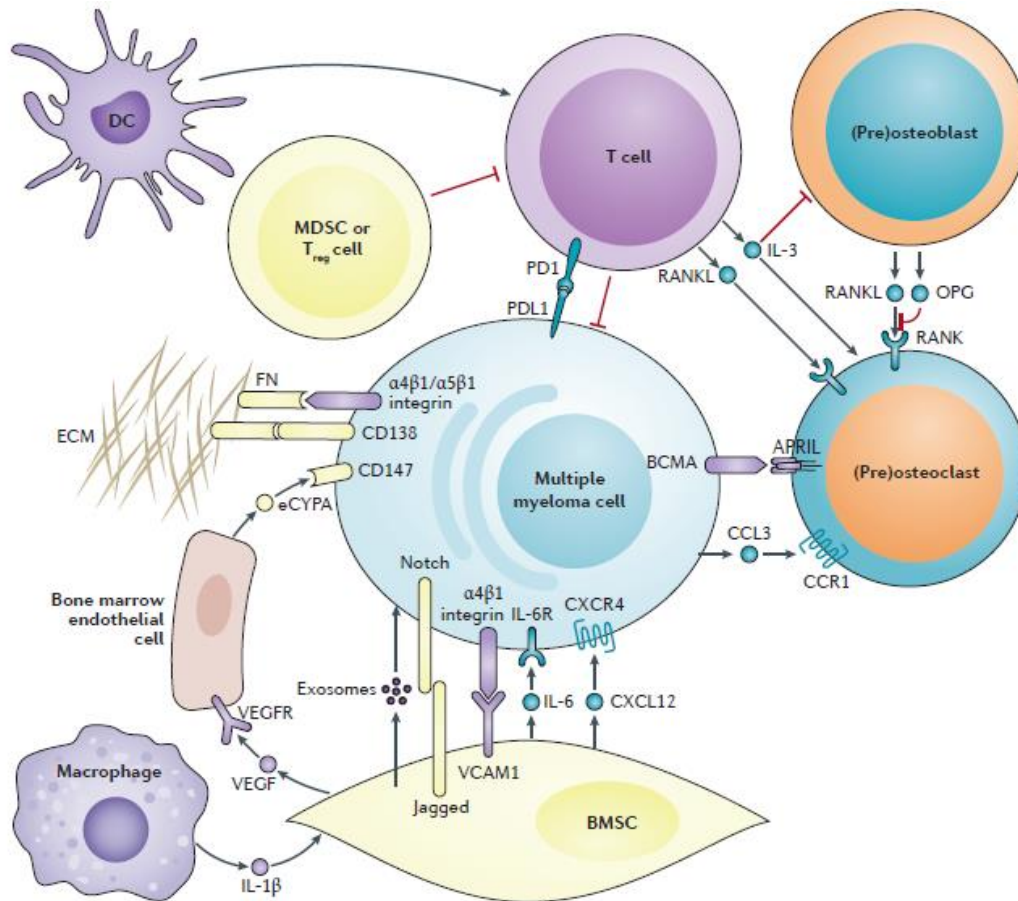


Figura 1.10. Microambiente tumoral de la médula ósea. En esta imagen se muestran las interacciones más importantes que tienen lugar en el microambiente tumoral entre las células de mieloma múltiple (MM) y la gran variedad de tipos celulares presentes: células dendríticas (DCs), linfocitos T, células NK, células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs), osteoclastos, osteoblastos, fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, células del estroma, etc. Las células del estroma de la médula ósea (BMSCs) tienen un papel central, creando un nicho favorable para el crecimiento del MM. Producen quimioquinas (tales como CXCL12) importantes para la migración de las células de MM a la médula ósea. Los osteoclastos, diferenciados por factores como RANKL y CCL3, están implicados en la destrucción del hueso. Células de perfil inmunitario como los linfocitos T y B y los monocitos producen IL-6, la cual promueve la proliferación de las células de MM y resistencia a la apoptosis. Las células de MM, que expresan PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1), inhiben la actividad de los linfocitos T, evadiendo la acción del Sistema Inmunitario. Imagen tomada de (Kumar et al., 2017).

Dicho ambiente inmunosupresor incapacita a las células presentes del SI y permite la progresión del tumor. Además de los comentados previamente, otros factores que contribuyen al desarrollo de un microambiente tumoral supresor son: expresión de ligandos de los puntos de control inmunitarios en las células plasmáticas y de sus receptores en las células del SI (Ray et al., 2015), hipoxia, prostaglandina E2, lactato, galectina-3, PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), TGF- β 1 (Mahaweni et al., 2018), adenosina y/o niveles elevados de receptores de adenosina (Deaglio et al., 2007; Zarek et al., 2008) y presencia de otras células inmunitarias

como las MDSCs y los linfocitos T_{reg} (Binsfeld et al., 2014; Feyler et al., 2009; Roeven et al., 2014; Serrano Del Valle et al., 2022).

Además de disminuir la reactividad de las células del SI contra el tumor, este microambiente o la interacción del MM con las células del estroma también puede contribuir a la adquisición de resistencia a ciertas terapias (Damiano et al., 1999; Mahaweni et al., 2018). Aparte de los ya citados, otros elementos del microambiente tumoral que juegan un papel son los exosomas, en los que se observan diferencias en el contenido en miRNAs y proteínas entre pacientes de MM e individuos sanos, y factores angiogénicos como VEGFA (*Vascular Endothelial Growth Factor A*) que empeoran el pronóstico (Rajkumar et al., 2002).

En el caso concreto de las células NK, hay maneras adicionales por las que el microambiente tumoral las inhibe (*Figura 1.11*). Ya se ha explicado previamente que para que las células NK actúen dependen de un balance de señales en el que predominen las activadoras (*ver apartado 1.3.2.1.2*). El ligando del receptor activador NKG2D más expresado por el MM es MIC-A, pero conforme la enfermedad progresa MIC-A es retirado de la superficie celular del MM. Como consecuencia, NKG2D se internaliza en las células NK y se impide la activación por esa vía (Bedel et al., 2011; Jinushi et al., 2008; Lazarova & Steinle, 2019; Reina-Ortiz et al., 2022). Asimismo, la expresión de DNAM-1 también se ve reducida conforme el MM progresa mientras su ligando PVR se regula positivamente. De la misma forma, también se ha observado menor expresión de SLAMF7 y CD16 en las células NK infiltradas en los pacientes con respecto a controles sanos (Pazina et al., 2021; Reina-Ortiz et al., 2022). De manera inversa, las células NK ven aumentada la expresión de PD-1, volviéndose susceptibles a la inhibición a través de PD-L1 si está expresado en el MM.

Por último, una de las citoquinas más abundantes en el microambiente tumoral es IL-6 (Lad et al., 2019; Reina-Ortiz et al., 2022). Esta citoquina, además de estimular la proliferación celular del tumor, la metástasis y su supervivencia (Konjević et al., 2019; Reina-Ortiz et al., 2022), ejerce un efecto inmunosupresor en las células NK reduciendo la expresión de perforina y otros factores citotóxicos (Cifaldi et al., 2015; Fisher et al., 2014).

Como consecuencia de todo lo aquí mencionado, las células NK presentes en el microambiente tumoral se encuentran incapacitadas y su activación y funcionalidad decrecen conforme la enfermedad progresa (Jurisic et al., 2007; Reina-Ortiz et al., 2022). De hecho, se ha observado que estos cambios producidos en las células NK están implicados en el progreso de la MGUS a MM (Bernal et al., 2009).

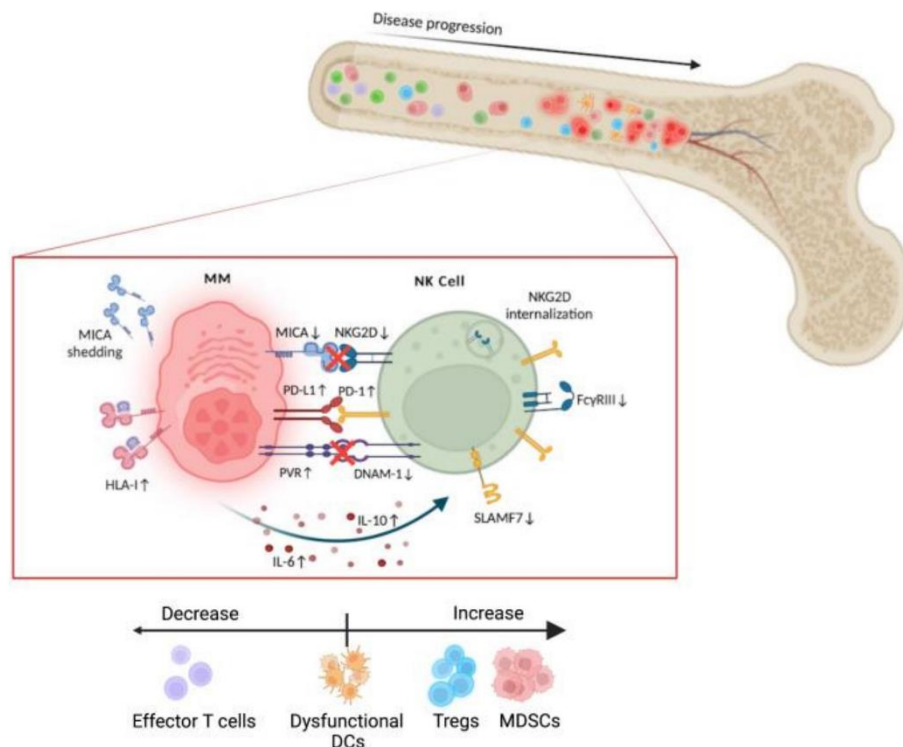


Figura 1.11. Efecto inhibitorio del microambiente tumoral de la médula ósea sobre las células NK. Las células de mieloma múltiple (MM) pueden incapacitar la activación y funcionalidad de las células NK a través de la reducción de la expresión de ligandos activadores de las células NK como MIC-A (MHC class I polypeptide-related sequence A), aumento de la expresión de ligandos inhibitorios como HLA-I (Human Leukocyte Antigen) o de puntos de control inmunitarios como PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1), y/o producir citoquinas como IL-6 e IL-10. Imagen tomada de (Reina-Ortiz et al., 2022).

1.4.4 Sintomatología y diagnóstico

Los pacientes pueden ser identificados circunstancialmente al detectar la proteína M en análisis rutinarios de sangre u orina, en cuyo caso se requiere un diagnóstico detallado para discernir entre MM o sus estados precursores (van de Donk et al., 2021). La mayoría de casos en realidad se detectan a raíz de presentar síntomas y daños en órganos (Kumar et al., 2017; van de Donk et al., 2021).

Las distintas manifestaciones clínicas se producen principalmente a causa de la proteína M, de las células malignas o de las citoquinas que éstas secretan. Los cuatro síntomas predominantes son hipercalcemia, insuficiencia renal (los riñones se saturan por los altos niveles de proteína M circulantes) (Kumar et al., 2017), anemia y fracturas patológicas o lesiones líticas en los huesos (en este caso se producen por un desequilibrio entre la resorción y reparación ósea) (Roodman, 1997). Todos ellos colectivamente se denominan características CRAB (Kumar et al., 2017; van de Donk et al., 2021).

Actualmente, el criterio de diagnóstico más aceptado es el criterio actualizado del IMWG (*International Myeloma Working Group*). Se basa en los niveles de proteína M, la infiltración en la médula ósea de las células plasmáticas, las características CRAB y nuevos biomarcadores validados tales como el nivel de cadenas ligeras libres en el suero (Kumar et al., 2017).

1.4.5 Tratamiento

Con el paso del tiempo los resultados clínicos y la supervivencia de los pacientes de MM ha mejorado considerablemente (van de Donk et al., 2021). Esto se debe a una comprensión cada vez mejor de la biología de la enfermedad y a la introducción de nuevos agentes terapéuticos (Kumar et al., 2017). Entre ellos destacan los inhibidores del proteasoma (bortezomib, carfilzomib e ixazomib) y los fármacos inmunomoduladores (IMiDs: talidomida, lenalidomida y pomalidomida) (Frerichs et al., 2018; Kumar et al., 2017; Nooka et al., 2019; van de Donk et al., 2021).

Debido a su gran impacto en la última década, estos dos tipos de compuestos son actualmente los pilares de la terapia del MM (van de Donk et al., 2021). Su combinación es una de las aproximaciones más eficaces en pacientes recién diagnosticados (Kumar et al., 2017) y en los ensayos clínicos son normalmente el estándar de cuidado sobre el que añadir nuevos fármacos (van de Donk et al., 2021). Por ejemplo, suelen administrarse junto a esteroides (dexametasona o prednisona) y/o agentes alquilantes (ciclofosfamida y melfalán) (Kumar et al., 2017; van de Donk et al., 2021). Otro tipo de fármacos aprobados por la FDA para tratar el MM son los inhibidores de las histona deacetilasas (panobinostat) (Nooka et al., 2019).

Pero no todo son nuevos tratamientos. Terapias como el trasplante autólogo de células madre (ASCT) se siguen utilizando tras más de dos décadas desde su introducción. Esta técnica, en la que células madre hematopoyéticas del paciente son reinyectadas tras someterle a 1-2 días de altas dosis de quimioterapia, continúa siendo un factor crucial a la hora de decidir la terapia inicial (Kumar et al., 2017; van de Donk et al., 2021). Esto es debido a que la media de supervivencia global en los pacientes seleccionables para ASCT (generalmente aquellos en buena forma y menores de 70 años) se estima en 10 años aproximadamente (Attal et al., 2017; Cavo et al., 2020; Ntanasis-Stathopoulos et al., 2020), frente a los 4-5 años de media en los pacientes no seleccionables (Attal et al., 1996; Child et al., 2003; Palumbo et al., 2014; Rosinol Dachs et al., 2018; Tacchetti et al., 2018).

No obstante, ningún tratamiento para el MM es en realidad verdaderamente curativo todavía (van de Donk et al., 2021). Debido al aumento de la complejidad genómica de los tumores con el paso del tiempo, por la adquisición de nuevas mutaciones y alteraciones subclonales, la mayoría de los pacientes terminan padeciendo recaídas y necesitando terapias adicionales. A medida que los pacientes sufren múltiples recaídas, éstas son cada vez más frecuentes y la eficacia de los tratamientos se va reduciendo a causa del aumento de resistencias (Kumar et al., 2017; van de Donk et al., 2021).

Una vez se produce una recaída, el nuevo tratamiento debe iniciarse si hay síntomas relacionados con el MM (características CRAB) o si hay un rápido incremento de la proteína M (duplicación de sus niveles en 2 meses) (van de Donk et al., 2021). El tratamiento de las recaídas está condicionado por la terapia inicial recibida. Si los pacientes recaen sin haber sido tratados con lenalidomida, entonces se les administran regímenes que la contengan. En cambio, si ya han desarrollado resistencia a dicho fármaco, son cambiados a tratamientos basados en los inhibidores del proteasoma (M. Dimopoulos et al., 2007). Los regímenes duales establecidos para el tratamiento de la primera recaída son lenalidomida-dexametasona (M. Dimopoulos et al., 2007; D. M. Weber et al., 2007), bortezomib-dexametasona (Richardson et al., 2005) y carfilzomib-dexametasona (M. A. Dimopoulos, Moreau, et al., 2016; M. A. Dimopoulos et al., 2017). Actualmente también hay aprobados 4 regímenes triples basados en la lenalidomida, incluyendo 2 con un inhibidor del proteasoma: carfilzomib-lenalidomida-dexametasona (D. S. Siegel et al., 2018) e ixazomib-lenalidomida-dexametasona (Moreau et al., 2016).

Aparte del tratamiento propio para las células malignas, los pacientes pueden necesitar también tratamiento para los síntomas subyacentes de la enfermedad, en especial el dolor. Éste debe ser controlado regularmente en todos los estadios de la enfermedad, evitando mientras sea posible los analgésicos opioides (Kumar et al., 2017). Las principales complicaciones o morbilidades asociadas que pueden presentar los pacientes incluyen infecciones, enfermedad ósea, enfermedad cardiovascular, tromboembolia pulmonar, neuropatía periférica y fallo renal (van de Donk et al., 2021).

Cuando la enfermedad no puede seguir siendo tratada, los cuidados paliativos ayudan a los pacientes a vivir de la forma más activa posible y aliviando en lo posible el dolor y estrés (Kumar et al., 2017). Finalmente, mueren debido a la propia enfermedad o a las complicaciones relacionadas con ella o con el tratamiento (van de Donk et al., 2021), siendo las infecciones, las enfermedades cardiovasculares y el fallo renal las principales causas de muerte temprana en el MM (Augustson et al., 2005; Blimark et al., 2015).

1.4.5.1 Nuevos agentes quimioterapéuticos

La ausencia de un tratamiento definitivo que resulte realmente curativo deja patente que todavía queda un largo camino que recorrer para combatir al MM. Se necesitan nuevos fármacos que por sí mismos o combinados con otros convencionales prevengan o eviten el desarrollo de clones resistentes (van de Donk et al., 2021). Es por ello que en los últimos años están siendo sometidas a ensayos clínicos como monoterapia o en combinación una gran variedad de nuevas moléculas. Entre ellas se encuentran nuevos fármacos de los principales grupos terapéuticos nombrados en el apartado anterior, tal y como se puede ver en la *Tabla 1.1*.

Fármaco	Combinado con:	Mecanismo	Fase	Identificador del ensayo clínico
Marizomib	Pomalidomida y dexametasona	Inhibidor del proteasoma	I-II	NCT02103335
Selinexor*	Carfilzomib y dexametasona	Inhibición de la proteína de exporte nuclear	III	NCT03110562
Ricolinostat	Bortezomib y dexametasona	Inhibidor de la histona deacetilasa 6	II	NCT01323751
Melflulen	Dexametasona	Agente alquilante	II	NCT02963493

*Tabla 1.1. Fármacos combinados en ensayos clínicos durante los últimos años. *Selinexor ya ha sido aprobado recientemente. Información extraída de (Kumar et al., 2017; van de Donk et al., 2021).*

Debido a que la ruta de la apoptosis está alterada de forma negativa en muchos tumores humanos (ver apartado 1.2.1.4), ésta se ha convertido en una diana para nuevas estrategias terapéuticas (Carneiro & El-Deiry, 2020). Por ejemplo, se han desarrollado agonistas de DR4 y DR5 para tratar de inducir la apoptosis extrínseca de las células tumorales. Para ese mismo propósito se ha utilizado TRAIL recombinante soluble (sTRAIL), aunque éste presenta una actividad limitada, probablemente por tener una menor capacidad de inducir el agrupamiento de receptores necesario para iniciar la señalización (Carneiro & El-Deiry, 2020).

No obstante, la principal atención recae sobre la ruta intrínseca de la apoptosis. Debido a que muchas proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 o la familia IAP están frecuentemente sobreexpresadas, se han producido fármacos que las inhiben (Carneiro & El-Deiry, 2020). Entre ellos destacan los miméticos BH3, pequeñas moléculas que imitan la unión de las proteínas proapoptóticas sólo BH3 a las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2. De esa forma bloquean la actividad de éstas últimas y liberan a las proteínas sólo BH3, facilitando la inducción de apoptosis (Carneiro & El-Deiry, 2020).

Estos agentes han tenido resultados prometedores en los estudios preclínicos (Singh et al., 2019) y algunos como venetoclax, un inhibidor selectivo de Bcl-2, ya han sido aprobados como línea principal de tratamiento para pacientes con leucemia linfocítica crónica (Carneiro & El-Deiry, 2020; Roberts et al., 2016). En el caso del MM existen varios de estos compuestos en ensayos clínicos, tal y como se puede ver en la *Tabla 1.2*.

Fármaco	Mecanismo	Fase	Identificador del ensayo clínico
S55746	Mimético BH3 (inhibidor selectivo de BCL-2)	I	NCT02920697 NCT02603445
AMG 176	Mimético BH3 (inhibidor de MCL1)	I	NCT03797261 NCT02675452
MIK665	Mimético BH3 (inhibidor de MCL1)	I	NCT02992483 NCT02979366 NCT03672695
AZD5991	Mimético BH3 (inhibidor de MCL1)	I	NCT03218683
LCL161	Mimético de SMAC (inhibidor de proteínas IAP)	I/II	NCT02649673 NCT03111992 NCT02098161

Tabla 1.2. Nuevos fármacos en ensayos clínicos y sus mecanismos de acción (Carneiro & El-Deiry, 2020).

1.4.5.2 Nuevos agentes inmunoterapéuticos

Además de estos nuevos agentes químicos, las inmunoterapias constituyen actualmente una aproximación innovadora y prometedora contra el MM (Frerichs et al., 2018; Kumar et al., 2017; van de Donk et al., 2021). El primer tratamiento de inmunoterapia antitumoral fue el anticuerpo anti-CD20 rituximab, que se introdujo en el tratamiento del linfoma no-Hodgkin en 1997 (Coiffier, 2003; Frerichs et al., 2018; Maloney, 2003; Maloney et al., 1997).

Pese a su revolucionario éxito en los casos mencionados, los linfocitos B al diferenciarse a células plasmáticas pierden la expresión de CD20, por lo que rituximab resulta ineficaz contra el MM (de Weers et al., 2011). Como consecuencia, los antígenos diana óptimos para el desarrollo de inmunoterapias contra el MM han sido objeto de amplia discusión (Nooka et al., 2019). Existe una gran cantidad de marcadores de superficie de MM identificados: SLAMF7, CD38, CD138, CD74, CD162, BCMA (*B-Cell Maturation Antigen*), β 2-microglobulina y GM-2 (van de Donk & Lokhorst, 2013; van de Donk et al., 2012). Para que las terapias sean efectivas las dianas no solo tienen que estar altamente sobreexpresadas en las células malignas, también deben ser moléculas que jueguen un papel importante en su crecimiento y/o supervivencia (de Weers et al., 2011).

Entre las principales dianas potenciales para la inmunoterapia del MM se encuentran:

- **BCMA**: esta proteína transmembrana de tipo I, de ≈ 20 kDa de peso molecular, es miembro de la superfamilia del receptor de TNF (Raje et al., 2019). Está implicada en la diferenciación de linfocitos B inmaduros a células plasmáticas y tiene un papel importante en su proliferación y supervivencia (Cho et al., 2018). Por lo tanto, está expresada exclusivamente en el linaje de linfocitos B y altamente expresada en las células de MM (Bu et al., 2018; Köhler et al., 2018; Raje et al., 2019).
- **SLAMF7**: también conocida como CS1, CRACC y CD319, es una glicoproteína transmembrana de tipo I de ≈ 37 kDa de peso molecular. Forma parte de la superfamilia

de las Ig y de la familia SLAMF (*Signaling Lymphoytic Activation Molecule Family*) (Malaer & Mathew, 2017; Pittari et al., 2017). Aunque inicialmente no se asoció con las células de MM, está altamente expresada de forma prácticamente universal (>95%) en la membrana de las células de MM de la médula ósea (Hsi et al., 2008; Mahaweni et al., 2018; Pittari et al., 2017). En lo que respecta a los tejidos normales, su expresión está restringida a los linfocitos B, a los linfocitos T CD8⁺, a las células NK y a las DCs (Hsi et al., 2008; Mahaweni et al., 2018; Malaer & Mathew, 2017; Pittari et al., 2017).

Este receptor participa en la regulación de la respuesta inmunitaria, en la adhesión celular y en la supervivencia de los linfocitos B, estando implicado en la proliferación descontrolada de las células de MM (Friend et al., 2017; Malaer & Mathew, 2017). En lo que respecta a las células NK, es un receptor que puede inducir tanto señales activadoras como inhibitoras, en función de la expresión o no del adaptador EAT-2 (Malaer & Mathew, 2017; Pittari et al., 2017).

- CD38: es una glicoproteína transmembrana de tipo II, de 45-46 kDa de peso molecular (de Weers et al., 2011; Deaglio et al., 2001; Malavasi et al., 2008; Quarona et al., 2015; van de Donk et al., 2016). Consta de una cola amino-terminal citoplasmática de 21 residuos de aa, un dominio transmembrana de 21 residuos, y un dominio extracelular de 258 residuos (Frerichs et al., 2018).

Debido a su alta y ubicua expresión en las células plasmáticas (Köhler et al., 2018; Krejcik et al., 2016; Nooka et al., 2019), CD38 es un marcador de superficie validado para identificar las células de MM (Plesner & Krejcik, 2018). No obstante, en condiciones normales se expresa también a niveles relativamente bajos en otras células y tejidos, en particular: linfocitos T y B, células NK, monocitos, MDSCs, leucocitos, eritrocitos, plaquetas, células inmaduras de la médula ósea, células neuronales, células gliales del sistema nervioso central, nervios periféricos, islotes pancreáticos, osteoclastos, células del músculo esquelético y cardíaco, epitelio de la próstata, epitelio de los bronquios, etc. (An et al., 2018; de Weers et al., 2011; Frerichs et al., 2018; Krejcik et al., 2016; Malavasi et al., 1994; Plesner & Krejcik, 2018).

Esta circunstancia generó un cierto debate a la hora de decidir usarlo como diana terapéutica. La razón para seguir adelante y desarrollar agentes inmunoterapéuticos contra él fue que los niveles de expresión de CD38 en las células de MM son muy altos (Plesner & Krejcik, 2018).

CD38 tiene varias funciones en las células que lo expresan. Se trata de un receptor de membrana que promueve señales de activación y proliferación (Köhler et al., 2018; Nooka et al., 2019). Por ejemplo, en los linfocitos T al interactuar con CD31 induce una cascada de señalización intracelular que los activa e induce la secreción de IL-6, IFN γ y otras citoquinas (Nooka et al., 2019). Además, es una molécula de adhesión al endotelio (Deaglio et al., 2008; Frerichs et al., 2018; Nooka et al., 2019; Y. Wang et al., 2018). Por

otra parte, es una ectoenzima multifuncional implicada en el catabolismo de nucleótidos extracelulares (Deaglio et al., 2001; Frerichs et al., 2018; Horenstein et al., 2013; Malavasi et al., 2008). En concreto, procesa la síntesis e hidrólisis de la reacción de NAD⁺ a adenosin difosfato (ADP) ribosa (Krejci et al., 2016; Malavasi et al., 2008; Plesner & Krejci, 2018), un proceso con implicaciones importantes en la adhesión celular, en la regulación de los niveles de calcio intracelulares y en la modulación de la respuesta inmunitaria (Deaglio et al., 2008; Malavasi et al., 1994, 2008).

1.4.5.2.1 Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) ya están siendo utilizados para tratar otros muchos tipos de tumores, a los cuales pueden eliminar en la mayoría de los casos vía CDC, ADCC y/o ADCP (van de Donk et al., 2012; van de Donk et al., 2016). En lo que respecta al MM, existen varios mAbs contra algunas de las dianas descritas en el apartado anterior.

Elotuzumab es un mAb humanizado, de tipo IgG1κ, dirigido contra SLAMF7 (Köhler et al., 2018; Pittari et al., 2017; van de Donk et al., 2021). Fue aprobado por la FDA y la EMA (*European Medicines Agency*) para el tratamiento del MM en los pacientes con recaídas, combinado con lenalidomida y dexametasona, o con pomalidomida y dexametasona (Köhler et al., 2018; Pittari et al., 2017; van de Donk et al., 2021). Actúa vía ADCC y ADCP (Köhler et al., 2018; Pittari et al., 2017; van de Donk et al., 2021), además de inhibir las interacciones del MM con el estroma (van de Donk et al., 2016) e inducir la activación de las células NK al unirse a su propio SLAMF7 (Köhler et al., 2018; Pittari et al., 2017; van de Donk et al., 2021). Curiosamente, a pesar de que las células NK expresan SLAMF7, no se observa fratricidio con elotuzumab (Y. Wang et al., 2018).

En el caso de CD38, hay una mayor variedad de mAbs producidos. Daratumumab, el primero que fue desarrollado y por ello el más utilizado en el ámbito clínico, es objeto de estudio en esta tesis doctoral. Por esa razón se le dedica un apartado específico más adelante (*ver apartado 1.4.5.2.1.1*).

Respecto a los demás, isatuximab es un mAb quimérico de tipo IgGκ dirigido contra CD38 que puede inducir directamente una potente actividad proapoptótica (Deckert et al., 2014; van de Donk et al., 2021). Esta capacidad probablemente se debe al epítipo específico al que se une. También tiene mecanismos inmunitarios clásicos dependientes de la región Fc, tales como ADCC y ADCP, y efectos inmunomoduladores. Pese a la alta actividad demostrada en monoterapia (Frerichs et al., 2018), por el momento está aprobado por la FDA y la EMA para el tratamiento de recaídas en combinación con otros agentes (van de Donk et al., 2021).

Otros mAbs anti-CD38 son MOR202 y TAK-079. El primero de ellos, a pesar de tener resultados esperanzadores induciendo muerte tumoral por CDC, ADCC y ADCP (Frerichs et al., 2018), ha visto interrumpido su desarrollo (Nooka et al., 2019). El segundo ha demostrado preclínicamente que mata eficazmente células del linaje de linfocitos B humanas vía tanto CDC y ADCC, aunque todavía no ha sido evaluado en pacientes de MM (Frerichs et al., 2018).

1.4.5.2.1.1 Daratumumab

1.4.5.2.1.1.1 Datos técnicos

Es el primer mAb humanizado de clase IgG1 y subclase κ dirigido contra el antígeno CD38 para el tratamiento de MM (Frerichs et al., 2018; Krejcik et al., 2016; Kumar et al., 2017; Nooka et al., 2019; Pittari et al., 2017; van de Donk et al., 2021; Viola et al., 2021).

Elegido entre 42 candidatos diseñados para unirse a CD38 (Frerichs et al., 2018), fue desarrollado por la compañía biotecnológica danesa Genmab en colaboración con científicos del Hospital Universitario de Utrecht (Plesner & Krejcik, 2018). Daratumumab es producido actualmente en la línea celular CHO (*Chinese Hamster Ovary*) mediante tecnología de DNA recombinante (de Weers et al., 2011) y suministrado por Janssen como solución para perfusión bajo el nombre comercial Darzalex®.

El análisis combinado de los primeros ensayos clínicos (GEN501 y SIRIUS) de daratumumab como monoterapia para recaídas de MM permitió establecer la dosis efectiva en 16 mg/kg (Frerichs et al., 2018; Krejcik et al., 2017; Lokhorst et al., 2015; Plesner & Krejcik, 2018). Los estudios farmacocinéticos determinaron que a esa dosis se podía conseguir la saturación de la diana (Plesner & Krejcik, 2018) así como mantener la concentración en suero de daratumumab por encima de 10 $\mu\text{g/ml}$ más de 190 días después de la primera dosis del régimen completo (Clemens et al., 2017).

Los ratios de respuesta total en ambos estudios fueron similares. Un 36% de los pacientes en GEN501 y un 29% en SIRIUS alcanzaron al menos una respuesta parcial (Krejckik et al., 2016; Lokhorst et al., 2015; Lonial et al., 2016; Usmani et al., 2016; van de Donk et al., 2012). Hubo un 5% de pacientes que llegaron a conseguir una respuesta completa (Lokhorst et al., 2015; Lonial et al., 2016; van de Donk et al., 2012). Todas estas respuestas fueron duraderas, con una media de supervivencia libre de progresión de 6,9 y 7,4 meses respectivamente (Frerichs et al., 2018; Lokhorst et al., 2015; Lonial et al., 2016), y un 65% de pacientes no mostraron progresión durante los 12 meses posteriores (Frerichs et al., 2018). Además, la fracción de pacientes que no llegó a alcanzar una respuesta también tuvo una prolongación significativa de la supervivencia (Plesner & Krejcik, 2018).

Después de haber demostrado una alta y prometedora actividad como agente en solitario en esos primeros resultados (Krejckik et al., 2016; Nijhof, Casneuf, van Velzen, et al., 2016), daratumumab fue aprobado inicialmente en noviembre de 2015 por la FDA como monoterapia de cuarta línea (Frerichs et al., 2018; Köhler et al., 2018; Nijhof, Casneuf, van Velzen, et al., 2016; Nooka et al., 2019). Su eficacia y buena tolerancia llevó rápidamente a combinarlo con estándares de cuidado anti-MM (Plesner & Krejcik, 2018), con los que también ha resultado eficaz (Frerichs et al., 2018). Junto a IMiDs o inhibidores del proteasoma ha llegado a conseguir respuestas de enfermedad mínima residual negativas en pacientes con recaídas previas (M. A. Dimopoulos, Oriol, et al., 2016; Lokhorst et al., 2015; Palumbo et al., 2016). En el año 2019 había

más de una treintena de ensayos clínicos en marcha con daratumumab combinado con distintos agentes (Nooka et al., 2019).

Actualmente está aprobado por la FDA y la EMA para el tratamiento de MM recién diagnosticado combinado con bortezomib-melfalan-prednisona, lenalidomida-dexametasona o bortezomib-talidomida-dexametasona (van de Donk et al., 2021; Viola et al., 2021). Para el tratamiento de MM que ha sufrido recaídas también está aprobado como monoterapia o combinado con lenalidomida-dexametasona, bortezomib-dexametasona, pomalidomida-dexametasona o carfilzomib-dexametasona (van de Donk et al., 2021; Viola et al., 2021). Esta inmunoterapia ha resultado muy eficaz, especialmente en los pacientes que han sufrido recaídas, con una mejora muy importante de la supervivencia libre de progresión cuando daratumumab se combina con bortezomib-melfalán-prednisona (Frerichs et al., 2018).

1.4.5.2.1.1.2 Mecanismos de acción

Daratumumab comparte mecanismos inmunoefectores clásicos dependientes de la región Fc tales como CDC, ADCC y ADCP (van de Donk et al., 2012; van de Donk et al., 2016) con el resto de mAbs anti-CD38 aprobados o en desarrollo (van de Donk et al., 2021). No obstante, se diferencia por ejercer efectos adicionales (Deckert et al., 2014; Touzeau et al., 2017). Los múltiples mecanismos de acción de daratumumab, recogidos en la *Figura 1.12*, son:

- Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC): daratumumab ha demostrado en distintos ensayos poseer una gran eficacia para matar a las células tumorales vía CDC (Alegre et al., 2020; de Weers et al., 2011; Frerichs et al., 2018; Köhler et al., 2018; Krejcik et al., 2016, 2017; Nijhof, Casneuf, Van Velzen, et al., 2016; Nooka et al., 2019; Plesner & Krejcik, 2018). Esta circunstancia se debe a que daratumumab se une específicamente a un epítipo de CD38 diferente al del resto de anticuerpos (residuos 233-246 y 267-280) (de Weers et al., 2011; Frerichs et al., 2018).

Esto promueve que la región Fc del anticuerpo se posicione y agrupe de una manera que facilita la unión y activación óptima de las proteínas del complemento (de Weers et al., 2011). De hecho, es tan alta su capacidad de inducir CDC que daratumumab es eficaz incluso bajo condiciones que limitan el complemento (de Weers et al., 2011).

- Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC): este mecanismo es uno de los principales modos de acción de daratumumab (Alegre et al., 2020; Frerichs et al., 2018; Köhler et al., 2018; Krejcik et al., 2016, 2017; Nijhof et al., 2015; Nijhof, Casneuf, Van Velzen, et al., 2016; Plesner & Krejcik, 2018). Está mediado por las células NK CD38⁺ y CD16⁺ (Viola et al., 2021; Y. Wang et al., 2018). Daratumumab induce una activación sustancial de las células NK a través de la señalización de CD16 al unirse a la región Fc del anticuerpo, potenciando su citotoxicidad (Viola et al., 2021; Y. Wang et al., 2018). Además de desencadenar la degranulación de los gránulos citotóxicos de las células NK, también se libera IFN γ tras incrementarse sus niveles de RNA mensajero (mRNA) y proteína (Viola et al., 2021).

Se ha observado que daratumumab es capaz de inducir ADCC contra el MM incluso en presencia de BMSCs, lo que sugiere que también podría inducir ADCC en el microambiente de la médula ósea (de Weers et al., 2011). También ha resultado efectivo bajo ciertas condiciones que imitan el microambiente supresor, potenciando la muerte en células tumorales mediada por células NK en presencia de hipoxia, hipoxia/lactato e hipoxia/prostaglandina E2 (Mahaweni et al., 2018).

- Fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP): en este caso son los macrófagos presentes en el microambiente tumoral los que actúan (Alegre et al., 2020; Frerichs et al., 2018; Köhler et al., 2018; Krejcik et al., 2016, 2017; Nijhof, Casneuf, Van Velzen, et al., 2016; Overdijk et al., 2015; Plesner & Krejcik, 2018). Dichos macrófagos engullen a las células opsonizadas por daratumumab, unido a CD38, al reconocer su región Fc que queda expuesta (Frerichs et al., 2018; Overdijk et al., 2015).
- Apoptosis: este efecto es directo (Alegre et al., 2020; Frerichs et al., 2018; Köhler et al., 2018; Krejcik et al., 2016, 2017; Nijhof, Casneuf, Van Velzen, et al., 2016; Y. Wang et al., 2018) y se produce cuando varias moléculas de daratumumab se han unido a CD38 y sufren entrecruzamiento. El entrecruzamiento puede producirse por anticuerpos anti-Fc o por células que expresen el receptor Fcγ (Köhler et al., 2018; Krejcik et al., 2016; Overdijk et al., 2016). Como resultado se induce la apoptosis en las células sobre las que se ha unido y entrecruzado daratumumab.
- Inmunoregulacion: el MM está asociado a una situación de disfunción inmunitaria (Dosani et al., 2015) debido a los distintos factores inmunosupresores del microambiente tumoral. Por esa razón el efecto inmunomodulador de daratumumab supone un mecanismo de acción muy importante en la terapia.

Las células inmunosupresoras que expresan CD38 son eliminadas de la misma forma que las células de MM (Krejci et al., 2016; Nooka et al., 2019; Plesner & Krejcik, 2018; Y. Wang et al., 2018). Este conjunto de células inmunitarias CD38⁺ con papel regulador incluye a las MDSCs, a los linfocitos B_{reg} y a los linfocitos T_{reg} (Krejci et al., 2016, 2017; Nooka et al., 2019; Plesner & Krejcik, 2018). Los dos primeros tipos de células están presentes en el microambiente tumoral contribuyendo al crecimiento del tumor, a la evasión inmunitaria, a la angiogénesis, a la metástasis y a la producción de citoquinas supresoras (Qu et al., 2016). Por su parte, los linfocitos T_{reg} se infiltran en la médula ósea (Serrano Del Valle et al., 2022) y suprimen la proliferación del resto de linfocitos T (Krejci et al., 2016).

Por otra parte, la activación y degranulación de las células NK mediada por daratumumab durante la ADCC induce a su vez la activación y polarización de monocitos, incrementando su actividad anti-MM (Viola et al., 2021). Como consecuencia de esto, se ha observado un aumento significativo en la médula ósea de células CD14⁺ (monocitos y macrófagos) e incremento de la expresión de los antígenos CD80/CD86 en su superficie (Viola et al., 2021).

El aumento de expresión de estos ligandos, necesarios para la coestimulación de los linfocitos T a través de la unión a CD28, así como la eliminación de las células inmunoregulatoras que inhibían su proliferación resulta en la activación y expansión clonal de los linfocitos T, tanto T_c como T_h (Alegre et al., 2020; Frerichs et al., 2018; Krejcik et al., 2016; Nooka et al., 2019; Viola et al., 2021). Todo esto puede reducir la supresión inmunitaria local dentro del microambiente y permitir a las células inmunitarias efectoras positivas expandirse y contribuir a mejorar la respuesta inmunitaria adaptativa antitumoral del paciente (Krejci et al., 2016).

- Modulación de funciones de CD38: como ya se ha comentado previamente, CD38 es una ectoenzima multifuncional. Cuando daratumumab se une a esta proteína es capaz de modular directamente sus actividades enzimáticas comprometiendo al MM (Köhler et al., 2018; Nooka et al., 2019).

Además, CD38 contribuye a la generación de adenosina en el microambiente tumoral. La adenosina es una molécula inmunosupresora que bloquea la actividad de las células efectoras (Frerichs et al., 2018; Plesner & Krejcik, 2018). Ese proceso puede ser inhibido por daratumumab (Costa et al., 2017; Horenstein et al., 2015), contribuyendo así a potenciar la actividad antitumoral del SI (Plesner & Krejcik, 2018).

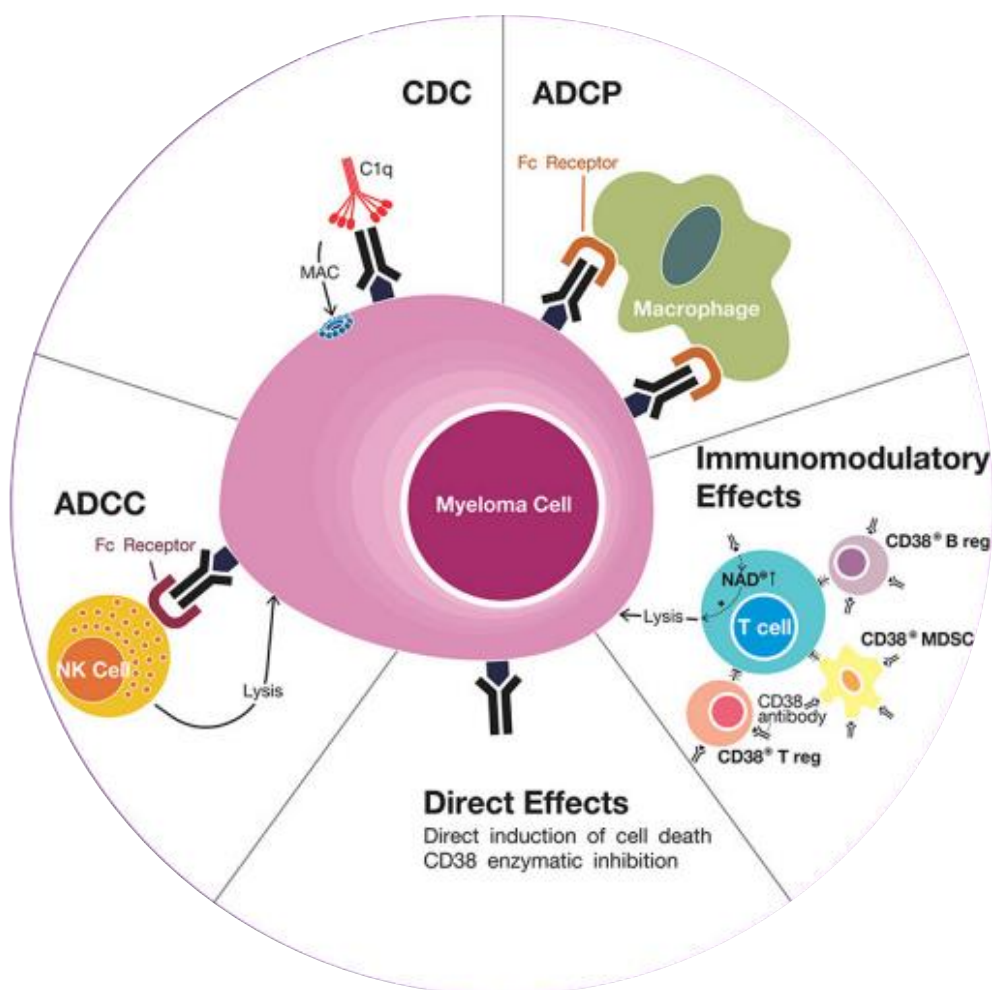


Figura 1.12. Mecanismos de acción de daratumumab. Daratumumab tiene mecanismos inmunoefectores dependientes del reconocimiento de su región Fc: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). En la ADCC las células NK tienen una gran importancia, aunque se desconoce la posible acción adicional de otras células efectoras como los macrófagos, los neutrófilos o los eosinófilos. Daratumumab también tiene efectos inmunomoduladores a través de la eliminación de los linfocitos T_{reg} , los linfocitos B_{reg} y las células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) que sean $CD38^+$, produciendo una mejor respuesta inmunitaria antitumoral. Además, daratumumab puede inducir de manera directa la apoptosis de las células diana mediante el entrecruzamiento de varias moléculas de CD38, o influir negativamente sobre las células de mieloma múltiple (MM) inhibiendo la actividad enzimática de CD38. Imagen modificada de (van de Donk & Usmani, 2018).

1.4.5.2.1.1.3 Efectos adversos, negativos y resistencia al tratamiento

La administración de daratumumab tiene buena tolerancia, siendo el principal efecto secundario las reacciones alérgicas relacionadas con la primera infusión intravenosa (Frerichs et al., 2018; Plesner & Krejcik, 2018). Para evitarlas actualmente los pacientes reciben medicación previa (Plesner & Krejcik, 2018). Los efectos adversos más frecuentes aparecidos en los ensayos

clínicos fueron linfopenia, trombocitopenia, neutropenia y anemia (Alegre et al., 2020). Otros también comunes pueden ser fatiga, náuseas, tos, diarrea, espasmos musculares, fiebre e hipertensión. (Nooka et al., 2019). El tratamiento con daratumumab puede interferir también en la monitorización de la proteína M (Plesner & Krejcik, 2018).

A pesar de los diversos mecanismos por los que puede actuar daratumumab y su alta eficacia, al final se terminan produciendo recaídas. La mayoría de los pacientes que reciben daratumumab mueren debido a la progresión de la enfermedad (Nooka et al., 2019).

Al comienzo del uso clínico de daratumumab, se observó que se reducían considerablemente los niveles de expresión de CD38 en la superficie de las células de MM tanto circulantes como de las presentes en la médula ósea (Frerichs et al., 2018; Nijhof et al., 2015; Nijhof, Casneuf, Van Velzen, et al., 2016; Nooka et al., 2019; Plesner & Krejcik, 2018). Al principio se creyó que este fenómeno podría causar resistencia del MM a daratumumab y planteó la posibilidad de contrarrestarla combinándolo con fármacos que aumentasen la expresión de CD38, como por ejemplo panobinostat (Nooka et al., 2019), lenalidomida o pomalidomida (Krejci et al., 2017), con los que, de hecho, consigue sinergia (Krejci et al., 2017).

No obstante, se determinó que esa pérdida de CD38 se produce en todos los pacientes, incluidos los que responden al tratamiento, excluyendo así la posibilidad de que fuera un mecanismo de resistencia (Krejci et al., 2017). Es más, los pacientes resistentes a daratumumab suelen mantener la expresión de CD38 en las células de MM, por lo que éstas deben estar rodeadas de células inmunitarias efectoras con función alterada (Viola et al., 2021).

Posteriormente, ese descenso se ha atribuido en parte a la muerte preferencial de las células con mayor expresión de CD38 (Frerichs et al., 2018), a la endocitosis y degradación de complejos daratumumab-CD38 (Plesner & Krejcik, 2018) y a la trogocitosis (R. P. Taylor & Lindorfer, 2015). La trogocitosis es un proceso que se caracteriza por la transferencia activa de complejos de daratumumab y CD38 junto a fragmentos de la membrana celular, desde las células de MM a los granulocitos y monocitos (Frerichs et al., 2018; Joly & Hudrisier, 2003; Plesner & Krejcik, 2018; R. P. Taylor & Lindorfer, 2015) u otras células efectoras como los linfocitos T (Dopfer et al., 2011). Este suceso no es exclusivo de daratumumab. Otros anticuerpos como epratuzumab (anti-CD22), daclizumab (anti-CD25) o rituximab (anti-CD20) también regulan negativamente sus proteínas diana por medio de la trogocitosis (Krejci et al., 2017).

En relación a esta variación, la correlación entre los niveles de CD38 y la respuesta obtenida en el tratamiento es todavía motivo de controversia (Viola et al., 2021). Si bien es cierto que la respuesta a daratumumab es parcialmente dependiente del nivel basal de CD38 en las células tumorales (Nijhof, Casneuf, Van Velzen, et al., 2016), no se puede usar CD38 como marcador de respuesta (Nooka et al., 2019).

Un proceso que está realmente comprobado es el incremento de la expresión de CD55 y CD59 que acompaña a la aparición de resistencias (Nijhof, Casneuf, Van Velzen, et al., 2016). Estas proteínas actúan como inhibidoras del complemento (CIP) interfiriendo con la CDC (Nijhof, Casneuf, Van Velzen, et al., 2016; Nooka et al., 2019; Plesner & Krejcik, 2018).

En cuanto a las células NK, por un lado, daratumumab las activa y potencia su citotoxicidad vía ADCC. Pero por otro, también expresan niveles altos de CD38 y daratumumab termina induciendo su fratricidio (Mahaweni et al., 2018; Y. Wang et al., 2018). Esto se traduce en una reducción del número de células NK en sangre periférica y médula ósea de los pacientes tratados con daratumumab, pudiendo alterarse a largo plazo de forma perjudicial la eficacia de la ADCC contra el MM (Mahaweni et al., 2018; Y. Wang et al., 2018). Curiosamente, elotuzumab no induce fratricidio a pesar de que las células NK también expresan SLAMF7 (Benson & Byrd, 2012; van de Donk et al., 2012).

Finalmente, el fratricidio no es la única forma por la que la ADCC puede perder eficacia. Se ha demostrado que las células estromales del microambiente tumoral confieren protección contra la ADCC mediada por daratumumab (de Haart et al., 2016; Frerichs et al., 2018).

1.4.5.2.2 Otros agentes inmunoterapéuticos

Además de los mAbs mencionados dirigidos contra los antígenos específicos del MM, existen otras estrategias inmunoterapéuticas. Algunas de ellas son los anticuerpos bi- o tri-específicos, capaces de reconocer dos o tres antígenos distintos, y los conjugados fármaco-anticuerpo. Un ejemplo de esto último es belantamab-mafodotín (van de Donk et al., 2021), un inmunoconjugado ya aprobado, compuesto por un mAb anti-BCMA y un fármaco que altera la estabilidad de los microtúbulos de las células (van de Donk et al., 2021).

Por otra parte, en el microambiente tumoral de la médula ósea se pueden expresar puntos de control inmunitario. Por ejemplo, junto al incremento en la expresión de PD-L1 en las células de MM, las células NK también presentan regulación positiva en la expresión de PD-1 (Benson et al., 2010). Por lo tanto, también se han hecho ensayos sobre el MM con mAbs dirigidos contra estas moléculas, entre ellos: durvalumab (anti-PDL1), nivolumab (anti-PD1) y pembrolizumab (anti-PD1).

Sin embargo, la FDA tuvo que interrumpir uno de esos ensayos clínicos en fase III por un exceso de mortalidad en el grupo de pacientes tratados con los mAbs inhibidores de los puntos de control inmunitarios (Plesner & Krejcik, 2018; Reina-Ortiz et al., 2022). Los ensayos clínicos que se realizaron combinando dichos inhibidores de los puntos de control inmunitarios e IMiDs para el tratamiento del MM (NCT02579863, NCT02576977, NCT02726581 y NCT02431208) también han resultado decepcionantes y se han interrumpido (Costa et al., 2021; Jelinek et al., 2018; Reina-Ortiz et al., 2022).

Rompiendo esta tendencia negativa, un estudio reciente combinando pembrolizumab con lenalidomida-dexametasona y ASCT sí consiguió proporcionar buenos resultados (Biran et

al., 2021). A pesar de todo ello, cuando el eje PD-1/PD-L1 está bloqueado gracias a estos inhibidores de los puntos de control inmunitarios no se consigue un incremento de la actividad citotóxica de las células NK, porque la expresión de PD-1 parece ser un marcador de agotamiento (Beldi-Ferchiou et al., 2016; Reina-Ortiz et al., 2020).

Al margen de los mAbs, también existen terapias basadas en linfocitos T, como los BiTE (*Bi-specific T cell Engagers*) y los CAR-T (Kumar et al., 2017; van de Donk et al., 2021). Tras el gran éxito del CD19-CAR-T en el tratamiento de leucemias y linfomas, se han desarrollado un gran número de CAR-T dirigidos específicamente contra antígenos expresados en las células plasmáticas malignas (Mikkilineni & Kochenderfer, 2021; Rodríguez-Otero et al., 2020; Simon & Riddell, 2020). Aunque los CAR-T anti-BCMA son el centro de atención en los últimos tiempos, con resultados preliminares prometedores (Ali et al., 2016; Berahovich et al., 2018; Carpenter et al., 2013; Ormhøj et al., 2017; Smith et al., 2018), también hay CAR-T anti-CD38 (Drent et al., 2016; Mihara et al., 2012), anti-CD138 (Guo et al., 2016; Jiang et al., 2014), anti-SLAMF7 (Chen et al., 2018; Chu, He, et al., 2014; Gogishvili et al., 2017), anti-NKG2D (Leivas et al., 2021) y anti-Cd44v6 (Casucci et al., 2013) en evaluación en ensayos clínicos. Dado que estas terapias tampoco son completamente curativas, se están desarrollando CAR duales contra dos dianas distintas para tratar de limitar el escape del tumor (Fernández de Larrea et al., 2020; Mikkilineni & Kochenderfer, 2021; Simon & Riddell, 2020). Todos los CAR-T generados para el MM que han entrado o están en ensayos clínicos han sido CAR-T de segunda generación (Köhler et al., 2018).

Por último, como alternativa a los problemas que presentan las terapias basadas en linfocitos T, están emergiendo las basadas en células NK. Aparte de los ensayos hechos con células NK expandidas a partir de sangre periférica o de sangre de cordón umbilical, se ha propuesto usar mAbs bloqueantes de los KIR con el objetivo de aumentar su actividad (Pittari et al., 2017). No obstante, los ensayos en marcha con SMM se han interrumpido porque los bloqueantes, al contrario de lo esperado, terminan produciendo anergia en las células NK al ser eliminados los receptores KIR de su superficie por trogocitosis (Carlsten et al., 2016).

Yendo un paso más allá, se ha conseguido modificar genéticamente con lentivirus las líneas de células NK humanas NKL y NK-92 para generar CAR-NK anti-SLAMF7 y anti-CD138, los cuales han mostrado buenos resultados preclínicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Chu, Deng, et al., 2014; Pittari et al., 2017; C. Zhang et al., 2017). Aunque todavía se deben implementar varias etapas para optimizar y validar los CAR a partir de células NK modificadas antes de ser evaluados en clínica, el posible uso de estas células abre nuevas perspectivas.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Aunque las terapias contra el cáncer han avanzado mucho en los últimos años, el mieloma múltiple (MM) continúa siendo una enfermedad incurable. Entre los últimos avances terapéuticos destaca la inmunoterapia, un campo en pleno auge y continua evolución que persigue mejorar o estimular al Sistema Inmunitario (SI) comprometido del paciente para que recupere la actividad antitumoral óptima. Existen diferentes modalidades de inmunoterapia en función del enfoque que se utilice para reactivar al SI (*ver apartado 1.3.6.2*).

Una de esas modalidades, que ha mostrado buenos resultados en multitud de ensayos clínicos en pacientes con distintos tipos de cáncer, es el uso de anticuerpos monoclonales (mAbs) terapéuticos. Los mAbs están siendo utilizados para tratar una gran variedad de tumores, a los que pueden eliminar vía citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) (van de Donk et al., 2012; van de Donk et al., 2016). En el caso particular del MM, de entre los varios mAbs existentes se destaca daratumumab, un anti-CD38. En el momento de iniciarse esta tesis doctoral, este mAb era el más avanzado clínicamente, ya que estaba aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) y la EMA (*European Medicines Agency*) para el tratamiento de casos de nuevo diagnóstico y para recaídas. Daratumumab tiene mejores efectos que la mayoría de mAbs anti-CD38 y aunque puede actuar a través de varias vías (*ver apartado 1.4.5.2.1.1.2*), la más relevante es sin duda la mediada por células asesinas naturales (*Natural Killer*, NK), que son la base de este trabajo.

Precisamente las células NK se utilizan también en otra modalidad de la inmunoterapia, concretamente en la terapia celular adoptiva. Esta estrategia se basa en aislar células del SI del paciente o de donantes sanos, estimularlas y expandirlas *ex vivo* y reinyectarlas al paciente con una mayor capacidad de atacar al tumor. Si bien para este tipo de terapia se usan sobre todo linfocitos T, existen también numerosos estudios y ensayos clínicos basados en células NK, las cuales presentan ventajas respecto a los linfocitos T, como por ejemplo no requerir un encuentro previo con su diana para su sensibilización y activación (Kennedy et al., 2000; Lodolce et al., 1998; Reina-Ortiz et al., 2022; Scoville et al., 2019; Sportoletti et al., 2021).

Las células NK llevan años formando parte de las líneas de trabajo de nuestro grupo de investigación. Durante la última década nuestro grupo, en colaboración con el de Martín Villalba (INSERM, Montpellier), ha desarrollado un protocolo que produce una potente activación y expansión *in vitro* de células NK a partir de muestras de sangre periférica, lo que permitiría utilizarlas seguidamente *in vivo* (Calvo et al., 2020; Reina-Ortiz et al., 2020; Sánchez-Martínez et al., 2018). Siguiendo este protocolo, las células NK se pueden activar y expandir *in vitro* más de 1.500 veces en promedio, consiguiendo una media de $2,5 \cdot 10^8$ células efectoras activas y que, en la mayor parte de los casos, no expresan PD-1 (*Programmed cell Death protein 1*), lo que evita que reciban señalización inhibitoria si las células diana expresan PD-L1 (*Programmed Death-Ligand 1*) (Reina-Ortiz et al., 2020; Sánchez-Martínez et al., 2018; Sánchez-Martínez et al., 2016).

Teniendo en cuenta que uno de los principales problemas que surgen a la hora de trasladar a la clínica los tratamientos con células NK es encontrar una fuente óptima que permita obtener grandes cantidades de estas células, protocolos como el desarrollado por nuestros grupos suponen una aportación interesante. Una alternativa a esta fuente podría ser la línea celular NK-92, que presenta a su vez ventajas como su alta actividad citotóxica, su activación constitutiva y su homogeneidad y reproducibilidad (*ver apartado 1.3.6.2.1.1*).

Además, la terapia celular adoptiva también ha evolucionado. Actualmente buena parte de las células utilizadas son modificadas genéticamente para que expresen un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido contra el tumor al que se van a enfrentar. Al igual que en la terapia original, la opción más extendida utiliza linfocitos T (CAR-T), pero también existe la posibilidad de emplear células NK (CAR-NK) (Liu et al., 2020), que de nuevo presentan algunas ventajas. Por ejemplo, éstas últimas tienen menos efectos adversos (Pittari et al., 2017), no producen enfermedad de injerto contra huésped, y son más baratas de desarrollar: los CAR-T cuestan del orden de 250.000 \$ por tratamiento, mientras que los CAR-NK a partir de células NK-92 supondrían menos de 20.000 \$ (Klingemann et al., 2016).

Teniendo en cuenta toda la información mencionada a lo largo de este apartado, se plantearon los siguientes objetivos para la presente tesis doctoral:

- Estudiar la muerte celular producida por daratumumab en combinación con células NK, y la implicación de cada uno de sus mecanismos citotóxicos.
- Generar un modelo de terapia celular basado en células NK combinadas con daratumumab a partir de las células NK activadas y expandidas (eNK), obtenidas según el protocolo de nuestro grupo de investigación, o bien a partir de líneas celulares establecidas como las células NK-92.
- Previamente a su utilización con fines terapéuticos, las células NK-92 deberían modificarse genéticamente para conseguir en ellas una expresión estable de CD16 (línea NK-92-CD16). El comportamiento y la actividad citotóxica de esta nueva línea transfectante NK-92-CD16 deberían ser caracterizados.
- Una vez establecido el modelo de terapia celular, producir un CAR anti-SLAMF7 a partir de él (células CAR-NK-92-CD16 anti-SLAMF7).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CULTIVOS CELULARES

A lo largo de esta tesis doctoral se han utilizado diversos cultivos celulares humanos, incluyendo tanto líneas celulares inmortalizadas como cultivos primarios.

3.1.1. Líneas celulares

De forma generalizada, en base a su modo de crecimiento, las líneas celulares inmortalizadas se pueden dividir entre cultivos adherentes y cultivos en suspensión.

- Líneas celulares adherentes: este tipo de cultivos crecen formando una monocapa sobre la superficie de los frascos y placas de cultivo, a la cual se adhieren mediante la interacción de proteínas de su membrana. Esto implica que su crecimiento está limitado por el área de la superficie en la que se encuentren, y que manipularlas requiere un paso previo para despegarlas. La única línea celular empleada con estas características ha sido:
 - o HEK-293T: células embrionarias humanas de riñón que expresan el antígeno SV40 T y tienen una morfología de tipo fibroblasto. Dada su facilidad para transfectarse, se han utilizado como células empaquetadoras para la producción de sobrenadantes virales con los que transfectar otras líneas celulares más complicadas. Esta línea celular fue proporcionada por el Dr. José Alberto Carrodegua, del Departamento de Bioquímica (Universidad de Zaragoza, España).
- Líneas celulares en suspensión: este tipo de células, a diferencia de las anteriores, crecen flotando en el medio de forma individual o agrupadas según las características de cada línea o cultivo. En este caso su manipulación es más sencilla y su crecimiento se ve limitado por la concentración o densidad celular.
 - o NCI-H929: línea celular humana de mieloma múltiple (MM) establecida a partir del derrame pleural maligno de una paciente de 62 años. La proteína M que produce esta línea celular es de isotipo IgAk (Gazdar et al., 1986). Estas células fueron cedidas por el Dr. Antonio Campos del Hospital Puerta del Mar (Cádiz, España).
 - o MM.1S: línea celular humana de MM que deriva de otra establecida previamente en 1986 a partir de sangre periférica de una paciente de 42 años (MM.1). En este caso, la proteína M que produce es de isotipo IgA λ . Pese a crecer en suspensión, presenta la característica de crecer en semi-adherencia (Goldman-Leikin et al., 1989; Greenstein et al., 2003). Estas células fueron adquiridas del ATCC (*American Type Culture Collection*).
 - o MM.1S-GFP-Luc: línea celular humana de MM generada al modificar genéticamente la línea MM.1S para que exprese la proteína fluorescente verde (GFP) y la enzima luciferasa (Luc). Esta línea fue cedida amablemente por el Dr. Ignacio Melero y la Dra. M^a del Carmen Ochoa (Centro de Investigación Médica Aplicada, Pamplona, España).

- RPMI 8226: línea celular humana de MM establecida en 1966 a partir de la sangre periférica de un paciente de 61 años. En lo que respecta a la proteína M, no hay evidencias de producción de cadenas pesadas, pero sí de cadenas ligeras λ (Matsuoka et al., 1967). Esta línea celular fue proporcionada por la Dra. Martine Amiot del INSERM U463 (Nantes, Francia)
- 721.221: línea inmortalizada humana de células B linfoblastoides. Se caracteriza por estar transformada por el EBV (*Epstein-Barr Virus*) y carecer de la expresión de las moléculas de HLA-I (*Human Leukocyte Antigen*). Estas células fueron proporcionadas por el Dr. Carlos Vilchez.
- NK-92: línea inmortalizada de células asesinas naturales (*Natural Killer*, NK) humanas. Establecida en 1992 a partir de muestras de un paciente de 50 años con linfoma No-Hodgkin, se caracteriza por su alta citotoxicidad basal, así como por no expresar ni CD16 ni los principales receptores inhibitorios de las células NK (Gong et al., 1994; Yan et al., 1998). Estas células crecen formando entre ellas agregados esféricos no adherentes (*clusters*). Esta línea celular fue cedida amablemente por el Dr. Julián Pardo (Centro de Investigación Biomédica de Aragón, Zaragoza, España).
- NK-92-CD16: línea celular generada a lo largo de esta tesis doctoral modificando genéticamente con sobrenadantes lentivirales la línea NK-92 para que exprese la proteína fluorescente ZsGreen y el receptor CD16.
- CAR-NK-92-CD16: línea celular obtenida en el transcurso de esta tesis doctoral tras modificar genéticamente a su vez con sobrenadantes retrovirales la línea NK-92-CD16 para que exprese un CAR anti-SLAMF7.

3.1.2. Cultivos primarios

Además de las líneas celulares mencionadas en el apartado anterior, a lo largo de esta tesis doctoral también se han utilizado células primarias extraídas de muestras de donantes sanos y de pacientes:

- Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs): cultivos primarios generados a partir de muestras de sangre de donantes sanos proporcionadas por el Banco de Sangre y Tejidos de Aragón. El procedimiento se detalla más adelante (*ver apartado 3.1.7*). Debido a su origen hematológico, estas células crecen en suspensión.
- Células NK expandidas (eNK): células NK primarias activadas y expandidas a partir de cultivos de PBMCs. El protocolo de activación y expansión se explica más adelante (*ver apartado 3.1.7.1*). Estas células crecen en suspensión, formando agregados celulares entre ellas (*clusters*).
- Linfocitos activados con PHA (blastos): células derivadas a su vez a partir de los cultivos de PBMCs, tal y como se explica más adelante (*ver apartado 3.1.7.2*). Al igual que las PBMCs de las que provienen, crecen en suspensión.

- Células plasmáticas de pacientes de MM: cultivos primarios humanos de distintos estadios de MM obtenidas a partir de aspirados de médula ósea de pacientes, tal y como se describe más adelante (ver apartado 3.1.8). Las muestras fueron proporcionadas por los Servicios de Hematología del Hospital Universitario Miguel Servet y del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, España), gracias a la Dra. Rosana Díez y a la Dra. Gemma Azaceta, respectivamente. Igual que las líneas establecidas de MM, éstas células también crecen en suspensión.

3.1.3. Medios de cultivo

Debido a la variedad de cultivos celulares con los que se ha trabajado, también se han utilizado distintos medios de cultivo, todos ellos de Gibco, Invitrogen:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): suplementado con un 10% en volumen de suero fetal bovino (SFB, Gibco), 1% de GlutaMAX™ (Gibco) y 1% de antibiótico (AB, penicilina 100 UI/ml y estreptomicina 100 µg/ml, PAN Biotech). Al medio suplementado se le denominó medio "DMEM completo". Este medio, generalmente utilizado para las células adherentes, fue el empleado para el cultivo de las células HEK-293T.
- Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI-1640): suplementado de la misma manera que el medio DMEM (10% SFB, 1% de GlutaMAX™ y 1% AB), dando lugar a lo que se denominó medio "RPMI-1640 completo". Este medio, empleado normalmente para las células en suspensión, fue el utilizado para el cultivo de las líneas celulares de MM, así como para las células 721.221, eNK y las PBMCs y los blastos. En el caso particular de las células plasmáticas de pacientes de MM, el medio RPMI-1640 se suplementó con un 10% en volumen de SFB de complementado y 1% de GlutaMAX™, sin AB. En este caso el medio resultante se denominó "RPMI-1640 primario".
- Opti-Minimum Essential Medium™ (Opti-MEM): medio optimizado para su uso en las transfecciones. Se utilizó suplementado sólo con un 10% en volumen de SFB (Gibco), ya que el AB puede interferir en la eficacia de la transfección. Tal y como se puede deducir de su descripción, solo fue usado en determinados pasos de los experimentos de transfección (ver apartado 3.3.1.1 y apartado 3.3.1.2).
- Minimum Essential Medium Alpha (MEMα): suplementado con un 12,5% en volumen de SFB (Sigma), 12,5% de suero de caballo inactivado por calor (HS, Gibco), 1% de GlutaMAX™ (Gibco) y 1% de AB (penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml, PAN Biotech). Al medio suplementado se le denominó medio "MEMα completo". Este fue el medio utilizado para las células NK-92 y las líneas celulares generadas a partir de ellas.

3.1.4. Materiales y productos utilizados para cultivos celulares

Dado que esta tesis doctoral gira en torno a los cultivos celulares, todo el material fungible empleado para su mantenimiento y experimentación se utilizó en condiciones estériles. Parte de él se comercializa directamente estéril y sellado, como es el caso de frascos de cultivo (TPP), placas de cultivo de 6, 12 y 96 pocillos (tanto de fondo cónico como plano, TPP), placas

de Petri (TPP), pipetas (Colstar), tubos de fondo cónico (Corning™, Cultek), y criotubos (Nunc®, Thermo Scientific). En cuanto al resto de materiales, como los tubos de microcentrífuga o microtubos de 1,5 ml (Deltalab), las puntas de micropipeta (Daslab) y el material de vidrio, se esterilizaron en un autoclave (Autester 4376, Selecta, España) durante 20-30 minutos a 1,2 atmósferas de presión antes de ser utilizados. En caso de no poder autoclavar alguna solución o reactivo, se esterilizaron con filtros de 0,22 µm de tamaño de poro (Acrodisc®, Pall Corporation) y jeringuillas (Terumo).

Todas las manipulaciones de los cultivos celulares se realizaron en cabinas de flujo laminar vertical para mantener la esterilidad. En general se trabajó en una cabina de clase I (PV-100, TELSTAR), a excepción de cuando fue necesario manipular sobrenadantes virales para las transfecciones. En dichas ocasiones se trabajó en una cabina de clase II (Bio-II-A/P, TELSTAR). Por su parte, las células fueron cultivadas en un incubador de CO₂ termostatzado Hera-Cell 150 (Heraeus Cell) manteniendo unas condiciones constantes de 37 °C y 5% de CO₂.

A lo largo del mantenimiento continuo de los cultivos celulares y a la hora de llevar a cabo los distintos experimentos de esta tesis doctoral se han empleado las siguientes centrífugas:

- Centrífuga para microtubos: Microfuge® 16 (Beckman Coulter)
- Centrífuga para microtubos con regulación de temperatura: Microfuge® 22R (Beckman Coulter)
- Centrífuga para tubos de fondo cónico: SL8 Centrifuge (Thermo Scientific)
- Centrífuga para tubos de fondo cónico con regulación de temperatura: Allegra® X-15R (Beckman Coulter)

3.1.5 Determinación de la viabilidad y densidad celular de los cultivos celulares

De cara al mantenimiento continuo de los cultivos y a la hora de preparar un experimento, es preciso conocer su estado, entendiendo como ello su viabilidad y la cantidad de células presentes. Ambos parámetros se determinaron mediante un recuento con el colorante azul trypan (Sigma-Aldrich). Este colorante tiene la capacidad de penetrar en las células que han perdido la integridad de su membrana plasmática, tiñéndolas así de color azul.

De esta manera, al observarlas en el microscopio óptico (Optiphot, Nikon) se puede distinguir entre células azul trypan negativas (sin teñir) y azul trypan positivas (teñidas). Las primeras, al conservar la integridad de su membrana se consideran células vivas o viables, mientras que las segundas, por el contrario, se consideran células muertas.

Para llevar a cabo el recuento, se mezclaron volúmenes de la suspensión celular en cultivo (previamente resuspendida) y de la solución de azul trypan. Los volúmenes se decidieron según cada caso, siendo generalmente iguales para contar las líneas celulares (50 µl de ambos, dilución 1/2). Para contar cultivos primarios se hicieron diluciones mayores. La mezcla resultante se colocó en una cámara de Neubauer o hemocitómetro, y ésta a su vez en el microscopio óptico

para establecer la cantidad de cada tipo celular en base a su color o estado (teñidas o sin teñir). Los valores obtenidos en cada recuento se utilizaron en las siguientes fórmulas:

Determinación de la densidad celular:

$$\text{Densidad celular} \left(\frac{\text{células}}{\text{ml}} \right) = \frac{N^{\circ} \text{ de células viables} \cdot \text{factor de dilución} \cdot 10^4}{N^{\circ} \text{ de cuadrantes contados}}$$

En esta ecuación se tienen en cuenta dos parámetros además de las células que se hayan contado. Por un lado, 10^4 es el factor de corrección correspondiente al volumen de la muestra presente en el hemocitómetro para obtener la densidad con respecto a los ml de cultivo. Por su parte, el factor de dilución se utiliza para corregir la proporción entre el volumen de muestra y el volumen de azul trypan mezclados. Es decir, en el ejemplo mencionado de una dilución $\frac{1}{2}$, el factor de dilución utilizado sería 2.

Determinación de la viabilidad celular:

$$\% \text{ de células viables} = \frac{N^{\circ} \text{ de células contadas viables}}{N^{\circ} \text{ de células contadas totales}} \cdot 100$$

Todos los experimentos de este trabajo fueron realizados partiendo de células con una viabilidad celular de, como mínimo, el 90%.

3.1.6 Mantenimiento de las líneas celulares y detección de micoplasmas

Las distintas células utilizadas en el proyecto se cultivaron de manera rutinaria en frascos de cultivo de 25 o 75 cm² (T25 y T75, respectivamente), en función de la cantidad de células que se fueran a necesitar para cada experimento. De forma habitual se comprobó el buen estado de los cultivos observándolos en un microscopio invertido (Eclipse Ts2, Nikon). El cultivo de las distintas células primarias se detalla en sus respectivos apartados, en los que también se explica la obtención de cada una.

Las células HEK-293T, dada su condición de células adherentes, para cada subcultivo o manipulación primero fue necesario despegarlas del frasco incubándolas 5 minutos a 37 °C con tripsina/EDTA (PAN Biotech). Posteriormente, la acción de la tripsina se inhibió añadiendo un volumen equitativo de medio complementado con SFB. Los pasajes se realizaron al encontrarse las células confluentes, reajustándolas de nuevo bajo el punto de confluencia.

Las líneas celulares en suspensión se sembraron a una densidad inicial de $2 \cdot 10^5$ - $3 \cdot 10^5$ células/ml según las necesidades de cada experimento, y cada 2-3 días se ajustaron de nuevo a esa densidad. Las centrifugaciones realizadas en general con estas células fueron a 233 xg.

En cuanto a las células NK-92 y las líneas generadas a partir de ellas, se cultivaron en presencia de 25 UI/ml de IL-2 (PeproTech), renovándola cada 48-72 horas junto al medio de cultivo MEMα completo. Las células se mantuvieron a una densidad entre $2 \cdot 10^5$ y $6 \cdot 10^5$ células/ml procurando siempre manipularlas lo menos posible para no deshacer los *clusters* que forman, ya

que afectaría a la viabilidad del cultivo. Las centrifugaciones realizadas en general con estas células fueron a 114 xg.

De forma periódica se analizó la presencia o no de micoplasmas, una de las mayores fuentes de contaminación de los cultivos celulares. Para comprobarlo se empleó un kit comercial (*Mycoplasma Gel Detection Kit*, Biotools) basado en la amplificación de su DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). En caso de detectarse contaminación y ser necesario eliminarla en vez de poder descongelar un nuevo cultivo, se empleó durante 3 semanas una combinación comercial de ABs (*BM Cyclin*, Sigma).

3.1.7 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), tal y como su nombre indica, se encuentran en la circulación sanguínea y poseen un único y redondeado núcleo. Este grupo de células en humanos está compuesto principalmente por linfocitos T, linfocitos B y células NK, y en menor medida por monocitos. Para su aislamiento, primero se preparó en tubos de fondo cónico de 50 ml un volumen de HistoPaque®-1077 (*Ficoll*) equivalente al volumen de sangre proporcionado en las muestras. Seguidamente las muestras de sangre se diluyeron a la mitad en tampón fosfato salino (PBS: NaCl 150 mM; K₂HPO₄·3H₂O 8 mM; K₂PO₄ 1,6 mM; pH 7,4) y se añadieron con sumo cuidado sobre el *Ficoll*, procurando que no se mezclaran ambas fases. Los tubos se centrifugaron 15 minutos a 524 xg sin deceleración manual. Una vez detenida la centrífuga, se recogieron los tubos comprobando que se hubiera formado un “anillo blanco” en la interfase, correspondiente a las PBMCs.

Dicho anillo se recogió y trasvasó a otro tubo de fondo cónico, donde las células se lavaron con medio RPMI-1640 sin SFB ni AB y se centrifugaron 5 minutos a 524 xg, en esta ocasión con la deceleración activada. Finalmente, la fracción celular obtenida se resuspendió en medio RPMI-1640 completo y se procedió a determinar la viabilidad y la densidad celular de las PBMCs (*ver apartado 3.1.5*) antes de utilizarlas para ensayos posteriores o para obtener otro tipo de células.

3.1.7.1 Activación y expansión de células eNK a partir de PBMCs

Las PBMCs aisladas previamente contenían una fracción no mayoritaria de células NK, cuantificada gracias al marcaje de la proteína de membrana CD56 por citometría de flujo (*ver apartado 3.5.2*). Para purificar dicha fracción lo máximo posible se realizó una depleción parcial de linfocitos T, utilizando anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-CD3 unidos a partículas magnéticas y una aislación inmunomagnética negativa con MACS (*Magnetic-Activated Cell Sorting*, Miltenyi Biotec). Una vez comprobado por citometría de flujo el enriquecimiento en células NK, 5·10⁷ células totales de la fracción aislada se sembraron a una densidad celular de 2·10⁶ células/ml en presencia de 25 UI/ml de IL-15 (Miltenyi Biotec) y 100 UI/ml de IL-2.

Para estimular la activación de las células NK, éstas fueron co-cultivadas en presencia de células estimuladoras 721.221 inactivadas. Dicho co-cultivo fue a ratio 5-1 (NK-721.221). La

inactivación de las células 721.221 se realizó incubándolas 3 horas a 37 °C con 0,5 mg/ml de mitomicina C (Bionova, Biorbyt). Las células NK se mantuvieron en cultivo durante 20-25 días, cambiando el medio de cultivo y renovando las interleuquinas, así como nuevas células estimuladoras inactivadas cada 5 días. Aprovechando ese cambio cada 5 días, se determinó por citometría de flujo la viabilidad del cultivo y la expansión de las células NK, definida como la fracción CD3⁺ CD56⁺ de la población (*ver apartado 3.5.1 y apartado 3.5.2*). Al final del período de expansión (entre los días 15-22 y/o 18-25) las células NK, ahora células eNK, se aislaron por selección inmunomagnética positiva utilizando partículas magnéticas anti-CD56 (Miltenyi Biotec) para utilizarlas en experimentos de citotoxicidad (*ver apartado 3.4.1*).

3.1.7.2 Activación de linfocitos a partir de PBMCs para generar blastos

Una vez aisladas las PBMCs (*ver apartado 3.1.7*), se sembraron a una densidad celular de 10⁶ células/ml en medio RPMI-1640 completo. Se les añadió 10 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA; Ibi, Medicago) para inducir la activación de los linfocitos presentes por su entrecruzamiento con los receptores de membrana, y se dejó incubar durante la noche (O/N). Al día siguiente las células se lavaron con PBS y se volvieron a sembrar en los frascos de cultivo con medio RPMI-1640 completo, añadiendo en esta ocasión 100 UI/ml de IL-2. Cada 48 horas se renovó el medio y la IL-2, y al 5º día de cultivo sin PHA los blastos generados se utilizaron como dianas en experimentos de citotoxicidad (*ver apartado 3.4.5*).

3.1.8 Obtención de células mononucleares de la médula ósea

En el caso de las muestras primarias de pacientes de MM, éstas eran aspirados de médula ósea en vez de muestras sanguíneas. Se obtuvieron mediante punción de la cresta ilíaca, tras haber sido informados los pacientes adecuadamente y haber firmado el consentimiento para la manipulación de las muestras por parte del grupo de investigación. Generalmente los pacientes eran de nuevo diagnóstico y por tanto no habían sido tratados con ninguna terapia previamente, aunque a veces se trataban de casos de recaídas con resistencias a tratamientos previos.

La médula ósea es el lugar de origen de todas las células hematopoyéticas, por lo que las células plasmáticas de los pacientes de MM se encuentran entre todas las células mononucleares de la médula ósea (BMMCs) así como de los restos de tejido del estroma medular. Para aislarlas se siguió el mismo protocolo empleado para aislar las PBMCs de las muestras de sangre, mediante la centrifugación en gradiente con *Ficoll* (*ver apartado 3.1.7*). El medio utilizado en el procedimiento fue el denominado RPMI-1640 primario.

El volumen de medio y de *Ficoll* se adaptó al volumen de las muestras de aspirado medular, que habitualmente contenían 1-2 ml. Los tubos de fondo cónico utilizados fueron de 15 ml. En este caso, el anillo de células blancas que se formaba en la interfase correspondía a las BMMCs. Una vez recogidas, lavadas y resuspendidas las BMMCs en el medio comentado, se determinó su densidad y viabilidad celular (*ver apartado 3.1.5*).

3.1.9 Congelación y descongelación celular

Con el propósito de tener muestras de reserva de los cultivos utilizados, las distintas líneas celulares se criopreservaron congelándolas y almacenándolas en tanques de N₂ líquido (Air Liquide). Entre 5-7·10⁶ células de cada línea celular se centrifugaron durante 5 minutos a 233 xg y se desechó el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en 1 ml de volumen total, consistiendo en la mayoría de los casos en una mezcla de 40% del medio de cultivo correspondiente, 50% de SFB y 10% de dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma). En el caso de la línea NK-92 y sus derivadas, se resuspendieron en 1 ml de medio MEM α completo, al 10% de DMSO.

La suspensión celular resultante se trasvasó seguidamente a un criotubo de congelación estéril y se guardó lo más rápido posible en un congelador a -80 °C. Tras dejar transcurrir un mínimo de 24 horas para suavizar la curva de descenso de la temperatura, los criotubos se trasladaron a un contenedor de N₂ líquido (-196 °C) donde permanecieron hasta que fuera preciso descongelarlos.

Llegado ese momento, se preparó un tubo de fondo cónico de 15 ml con 10 ml del medio completo correspondiente al cultivo celular. Conforme el contenido del criotubo se fue descongelando, se trasvasó al tubo de fondo cónico para ir diluyendo el DMSO presente y evitar posibles efectos tóxicos. Una vez descongelado por completo, el tubo de fondo cónico se centrifugó durante 5 minutos a 524 xg para eliminar por completo el DMSO. El pellet celular se resuspendió, en función del número de células, con entre 5-10 ml del medio completo correspondiente para sembrarlas a la densidad habitual.

3.2 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.2.1 Preparación de medios y cultivos bacterianos

Todo el trabajo relacionado con cultivos bacterianos se llevó a cabo con material estéril (en caso necesario, autoclavado al igual que el material para cultivos celulares, *ver apartado 3.1.4*), y al amparo del ambiente estéril que proporciona la llama de un mechero de alcohol. Esto incluye tanto la manipulación de las bacterias y la preparación de los medios de cultivos necesarios de este apartado, como procedimientos de los siguientes apartados.

Para expandir los cultivos bacterianos se preparó medio Luria-Bertani (LB) líquido disolviendo en 1 L de H₂O destilada 10 g de triptona (PanReac, AppliChem), 5 g de extracto de levadura (PanReac, AppliChem) y 5 g de NaCl (PanReac, AppliChem). La disolución resultante se repartió en 4 botellas de vidrio de 250 ml. Una vez esterilizadas las botellas y su contenido en el autoclave, se guardaron a 4 °C en la cámara fría hasta el momento de su uso.

Para obtener los cultivos bacterianos en forma de colonias y así poder aislar clones de interés, se prepararon placas de LB-agar. En este caso se disolvieron 3,5 g de *Plate Count Agar* (Fluka Analytical, Sigma) en 200 ml de H₂O destilada. La disolución se trasvasó a una botella de

vidrio, se esterilizó en el autoclave y después se dejó atemperar durante 15-20 minutos. Al enfriarse, pero antes de llegar a solidificar, se añadieron 100 µg/ml de ampicilina (Sigma), el AB de selección. La mezcla obtenida de agitar suavemente la botella se vertió en placas de Petri de 60,1 cm², aproximadamente 10 ml por placa, y éstas se dejaron con las tapas semi-abiertas para dejar solidificar el medio. Una vez solidificado, se cerraron las tapas y se sellaron las placas con una película termoplástica (Parafilm®), para después almacenarlas a 4 °C hasta su uso.

3.2.2 Obtención de bacterias competentes y transformación bacteriana

El método empleado para la transformación de bacterias competentes fue el de choque térmico. Dichas bacterias (*Escherichia coli* XLBlue), guardadas en microtubos, se descongelaron en hielo y se les añadieron 200 ng del plásmido de interés en cada caso (pHIV-Luc-ZsGreen y pBaBe-Bax). Después de incubar durante 20 minutos con el plásmido en el hielo, se procedió a realizar el choque térmico.

Éste consistió en incubar primero las bacterias durante 90 segundos a 42 °C, y seguidamente 2 minutos en hielo. Tras ese contraste de temperatura, se añadió a las bacterias 1 ml de medio LB líquido estéril, y se incubaron 1 hora en agitación (700 rpm) a 37 °C en un termobloque (*ThermoMixer confort*, Eppendorf). En ese plazo de tiempo, de ser exitosa la transformación, las bacterias adquieren resistencia al AB de selección gracias al gen codificado en el plásmido.

Finalizada la incubación en agitación, los microtubos con las bacterias se centrifugaron 5 minutos a 461 xg y se eliminó decantando la mayor parte del sobrenadante. Con el volumen restante en el fondo del microtubo (50-100 µl) se resuspendió el pellet bacteriano. Dicha suspensión bacteriana se sembró en una placa de LB-agar con ampicilina. Las placas se incubaron invertidas O/N a 37 °C. Al día siguiente se comprobó si habían crecido colonias, en cuyo caso se seleccionaron varias y se transfirieron a tubos de fondo cónico de 50 ml con 10 ml de medio LB líquido. Para la selección se añadió ampicilina a 100 µg/ml, y se llevaron a un agitador orbital (*Kuhner LT-W Lab Therm Table Top Incubator Shaker*) donde se dejaron expandir O/N a 37 °C y 200 rpm de agitación. Finalmente se recogieron para, o bien extraer los plásmidos, o bien para guardar alícuotas de las bacterias transformadas congeladas en glicerol.

3.2.3 Extracción y cuantificación de DNA plasmídico

Las bacterias expandidas en los 10 ml de medio de cultivo LB líquido se recogieron para recolectar en gran cantidad los plásmidos de interés. Los tubos de fondo cónico se centrifugaron 10 minutos a 1.455 xg y se desechó el sobrenadante. El pellet bacteriano se procesó para extraer el DNA plasmídico con el kit comercial NZYMiniprep (Nzytech), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las eluciones se realizaron con el propio tampón del kit.

La concentración y la pureza del DNA plasmídico aislado se determinaron midiendo la absorbancia de las muestras a 260 y a 280 nm mediante un espectrofotómetro (NanoVue, Healthcare)

3.2.4 Digestión de DNA plasmídico

Los plásmidos producidos, extraídos y cuantificados en los apartados anteriores tenían como propósito emplearse para modificar la línea celular NK-92 y que ésta expresase distintas proteínas de interés. En el caso de pBaBe-Bax, se trataba de una versión del plásmido comercial pBaBe que ya había sido modificado previamente en nuestro grupo de investigación, clonando la secuencia del gen Bax (Figura 3.1). Para comprobar el estado del plásmido antes del nuevo proceso de clonaje se llevó a cabo la digestión del mismo. La digestión se realizó en los sitios de restricción que se eligieron para insertar el gen Bax. 1 µg de plásmido se incubó durante 3 horas a 37 °C en 10 µl de mezcla de reacción. Dicha mezcla se componía de 10 UI de las enzimas de restricción *EcoRI* (Xataka) y *SalI* (Xataka), 1 µl de tampón H 10X (Xataka) y H₂O_{mq} estéril completando el volumen. El resultado de la digestión se analizó mediante una electroforesis de DNA en gel de agarosa (ver apartado 3.2.5) comparando con respecto al plásmido sin digerir.

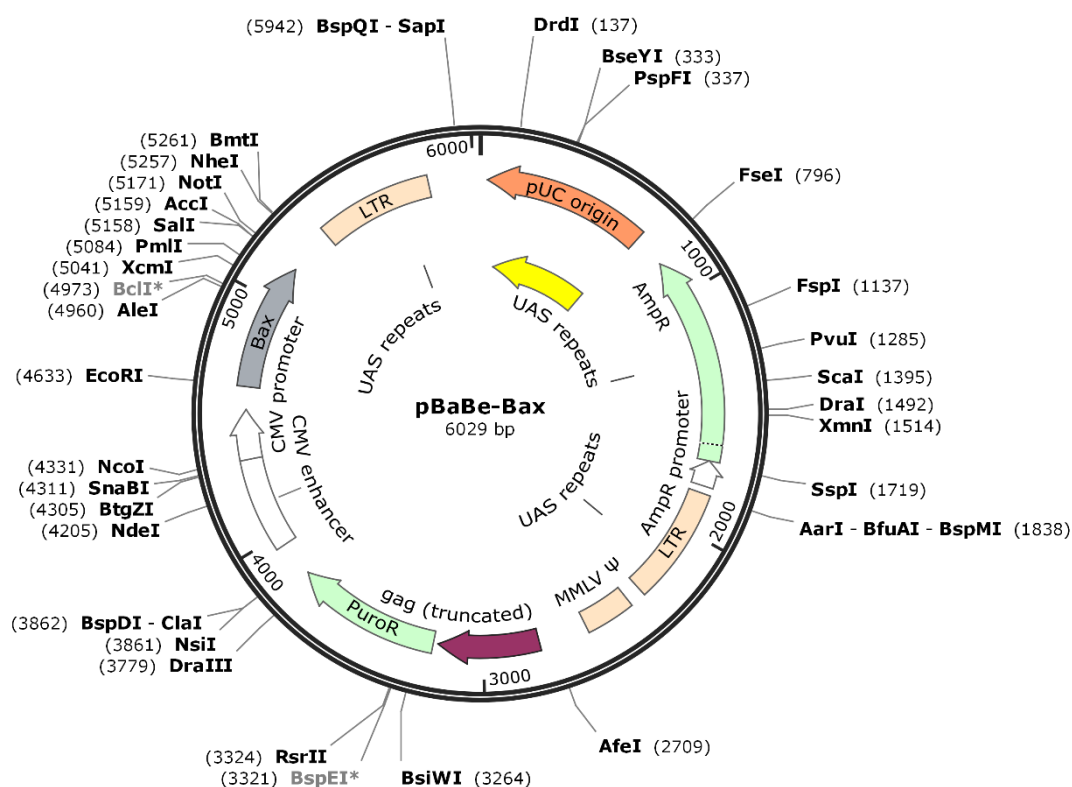


Figura 3.1. Mapa del vector pBaBe-Bax, generado al insertar el gen Bax entre los sitios de restricción *EcoRI* y *SalI* del plásmido pBaBe. Imagen realizada con el programa SnapGene® Viewer v5.0.7.

3.2.5 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

El porcentaje de los geles de agarosa utilizados fue del 1%. Los geles se prepararon disolviendo 0,3 g de agarosa (Sigma) en 30 ml de tampón TAE (Tris-Acetato EDTA, Gibco) mediante agitación y calentamiento. Una vez disuelta la agarosa y tras dejarla enfriar un poco, se añadió *SYBER-safe* (Invitrogen) en una proporción 1-10000 y se mezcló la preparación agitando.

Seguidamente, la disolución se vertió en los moldes, se colocaron los peines para los pocillos y se dejó gelificar. Mientras tanto, a todas las muestras a analizar se les añadió la cantidad correspondiente de tampón de carga 10X (Takara) para que quedase a 1X. Una vez listo el gel, se cargaron las muestras (plásmido digerido y sin digerir) y un marcador de pesos moleculares (λ HindIII, Invitrogen) como referencia del tamaño de los fragmentos de DNA que se pudieran observar. La electroforesis se llevó a cabo durante 45 minutos, a 90 V y 400 mA. Al finalizar, el gel se visualizó en un transiluminador (GelDoc 2000, BioRad)

3.2.6 Clonaje de genes de interés en vectores virales

Para diseñar los genes de interés se consultaron diversas fuentes bibliográficas (Balkhi, 2020; Clémenceau et al., 2006, 2013; Ollier et al., 2017) y bases de datos (GenBank®) con el fin de elegir las secuencias adecuadas. Para la comprobación de las secuencias genéticas y de aminoácidos (aa), así como la visualización de los mapas de los vectores se utilizaron también programas y herramientas informáticas (*EMBOSS Programs*, *Snap Gene® Viewer* v5.0.7 y *CodonCode Aligner* v9.0.2).

Una vez establecidos los genes, se encargó a la empresa GenScript Biotech Corporation (GenScript) su síntesis y clonaje dentro de los dos vectores que se utilizaron a lo largo de esta tesis doctoral. Para ello, 5 µg de cada plásmido se absorbieron en papel de filtro y se enviaron por correo a GenScript. En el caso de pBaBe-Bax, al haber sido modificado previamente, antes de hacer el envío se comprobó la integridad del plásmido mediante una digestión enzimática y una electroforesis en geles de agarosa (*ver apartado 3.2.4 y apartado 3.2.5*).

El primero de los dos vectores empleados fue el plásmido comercial pHIV-Luc-ZsGreen (*Figura 3.2*), de tipo lentiviral. Este plásmido expresaba dos genes reporteros distintos: uno de ellos codificaba la proteína ZsGreen, que tras una excitación apropiada emite fluorescencia verde; y el otro codificaba la proteína luciferasa (Luc), una enzima que al procesar la luciferina genera bioluminiscencia. Destacaba la presencia del promotor constitutivo EF-1 α , el cual induce una fuerte expresión de la proteína codificada tras él. También expresaba el gen de resistencia a ampicilina, para la selección mediante dicho AB a la hora de transformar bacterias.

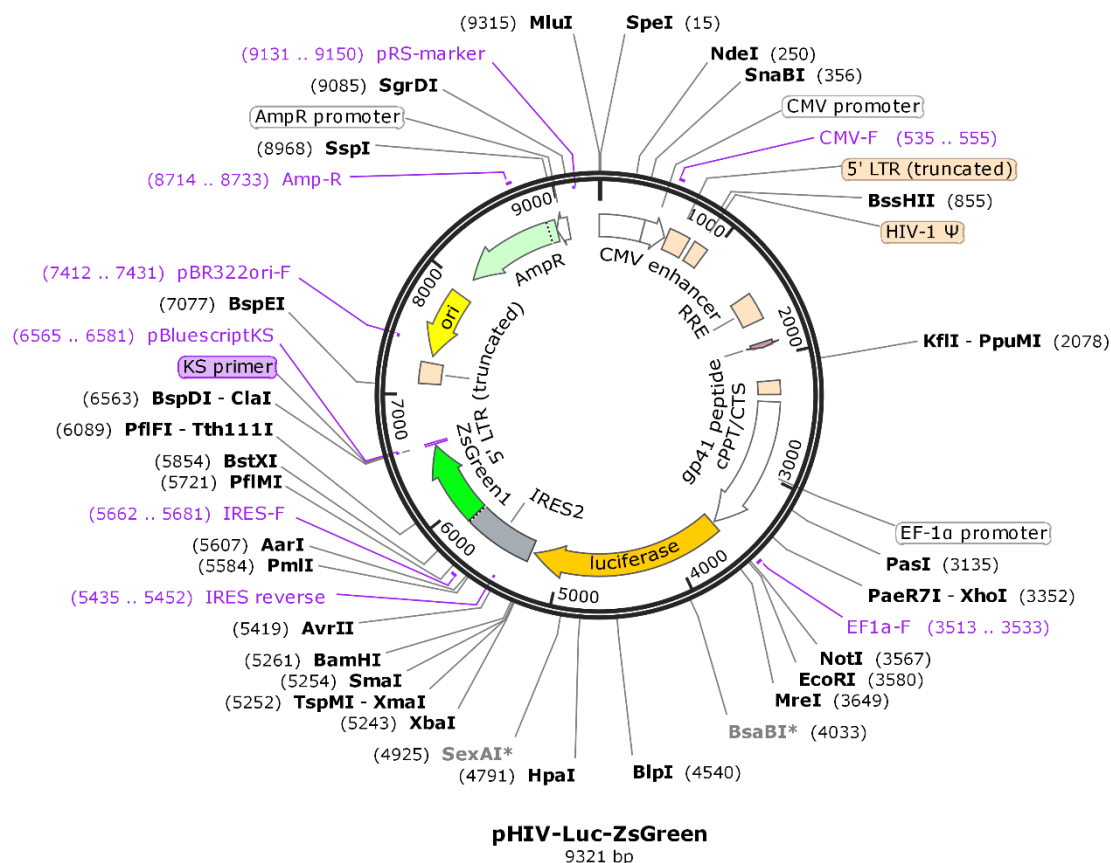


Figura 3.2. Mapa del vector comercial pHIV-Luc-ZsGreen. Imagen realizada con el programa SnapGene® Viewer v5.0.7.

En este vector se insertó la secuencia del gen de la variante de alta afinidad del receptor CD16 (CD16V176), que es la siguiente:

```

ATGTGGCAGCTGCTGCTGCCAACCGCCCTGCTGCTGCTGGTGTCCGCCGGAATGAGGAC
AGAGGACCTGCCAAAGGCCGTGGTGTCTGGAGCCCCAGTGGTACAGAGTGCTGGAGA
AGGACTCTGTGACCCTGAAGTGCCAGGGCGCCTATTCTCCTGAGGATAACAGCACACAGT
GGTTTCACAATGAGAGCCTGATCAGCTCCCAGGCCTCTAGCTACTTCATCGACGCAGCAAC
CGTGGACGATTCCGGAGAGTATCGGTGCCAGACCAACCTGAGCACACTGTCCGATCCAGT
GCAGCTGGAGGTGCACATCGGATGGCTGCTGCTGCAGGCACCTAGATGGGTGTTTAAGGA
GGAGGATCCAATCCACCTGCGCTGTACAGCTGGAAGAATACCGCCCTGCACAAGGTGAC
ATACCTGCAGAACGGCAAGGGCAGGAAGTACTTCCACCACAATTCTGACTTTTATATCCCC
AAGGCCACCCTGAAGGATTCCGGCTCTTATTTCTGCCGCGGCCTGGTGGGCAGCAAGAAC
GTGTCCTCTGAGACCGTGAATATCACCATCACACAGGGCCTGGCCGTGTCCACAATCAGC
TCCTTCTTTCCCCCTGGCTACCAGGTGTCTTTCTGTCTGGTCATGGTGCTGCTGTTTGCCG
TGGACACAGGCCTGTATTTCTCCGTGAAGACCAACATCCGGTCTAGCACAAGAGACTGGA
AGGATCACAAGTTCAAGTGGCGGAAGGACCCTCAGGATAAGTGA
    
```

Dicha secuencia genética se corresponde a la siguiente secuencia de aa:

MWQLLLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFH
 NESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHL
 RCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSSETVNITI
 TQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQD
 K*

Este clonaje se realizó entre los sitios de restricción EcoRI y XbaI, reemplazando al gen de la proteína luciferasa, de manera que el gen del receptor CD16 quedó bajo el control del promotor constitutivo EF-1α. Se obtuvo así el nuevo plásmido pHIV-CD16-ZsGreen (Figura 3.3).

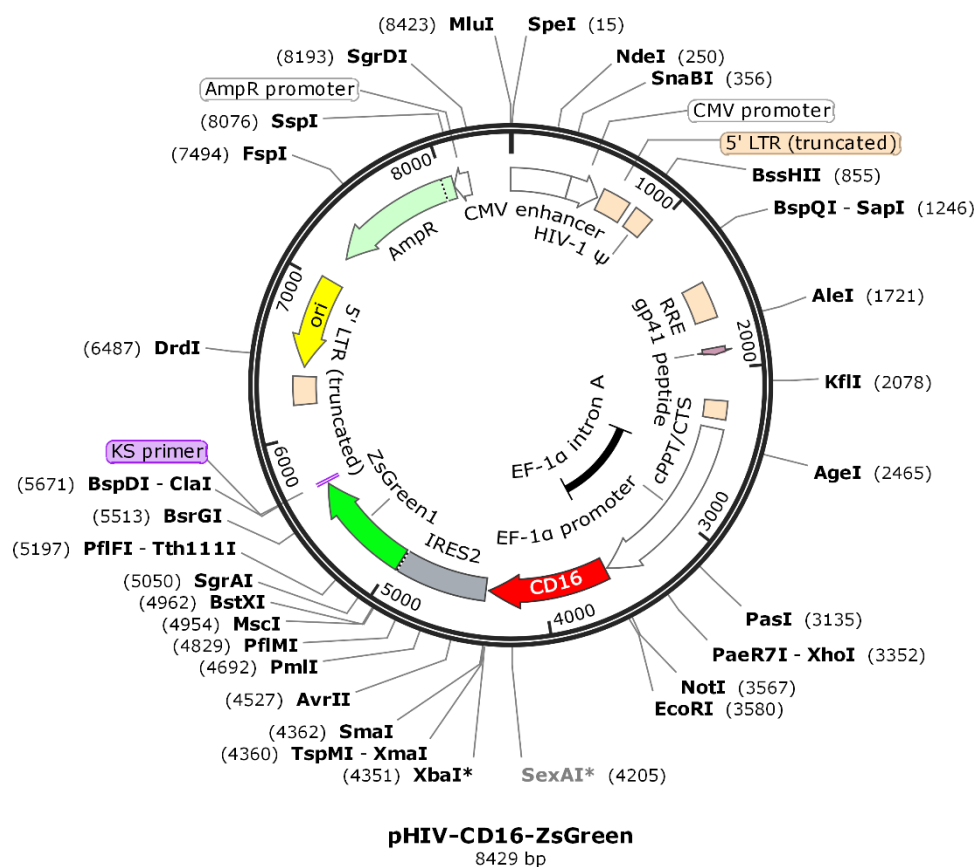


Figura 3.3. Mapa del vector pHIV-CD16-ZsGreen generado al insertar el gen CD16 entre los sitios de restricción EcoRI y XbaI del plásmido pHIV-Luc-ZsGreen. Imagen realizada con el programa SnapGene® Viewer v5.0.7.

El segundo vector utilizado fue el plásmido pBaBe-Bax (ver Figura 3.1), una modificación del plásmido comercial pBaBe que se realizó anteriormente en nuestro grupo de investigación al clonar entre los sitios de restricción EcoRI y Sall el gen de la proteína Bax. A diferencia del anterior, este plásmido era de tipo retroviral y como gen reportero tenía el de resistencia al AB puromicina. Además, expresaba el gen de resistencia a ampicilina, en este caso para la selección de las bacterias transformadas.

En este vector se insertó la secuencia quimérica codificante para un nuevo receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido contra la diana SLAMF7, específica del MM. Dicha construcción genética se basó en los CAR de segunda generación (*ver apartado 1.3.6.2.1*) y para el reconocimiento de la diana se utilizaron las secuencias codificantes de las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo anti-SLAMF7 hSF7.3.26A.

Este clonaje se realizó entre los sitios de restricción EcoRI y Sall, reemplazando al gen de la proteína Bax. Se obtuvo así el nuevo plásmido pBaBe-SLAMF7-CAR (*Figura 3.4*).

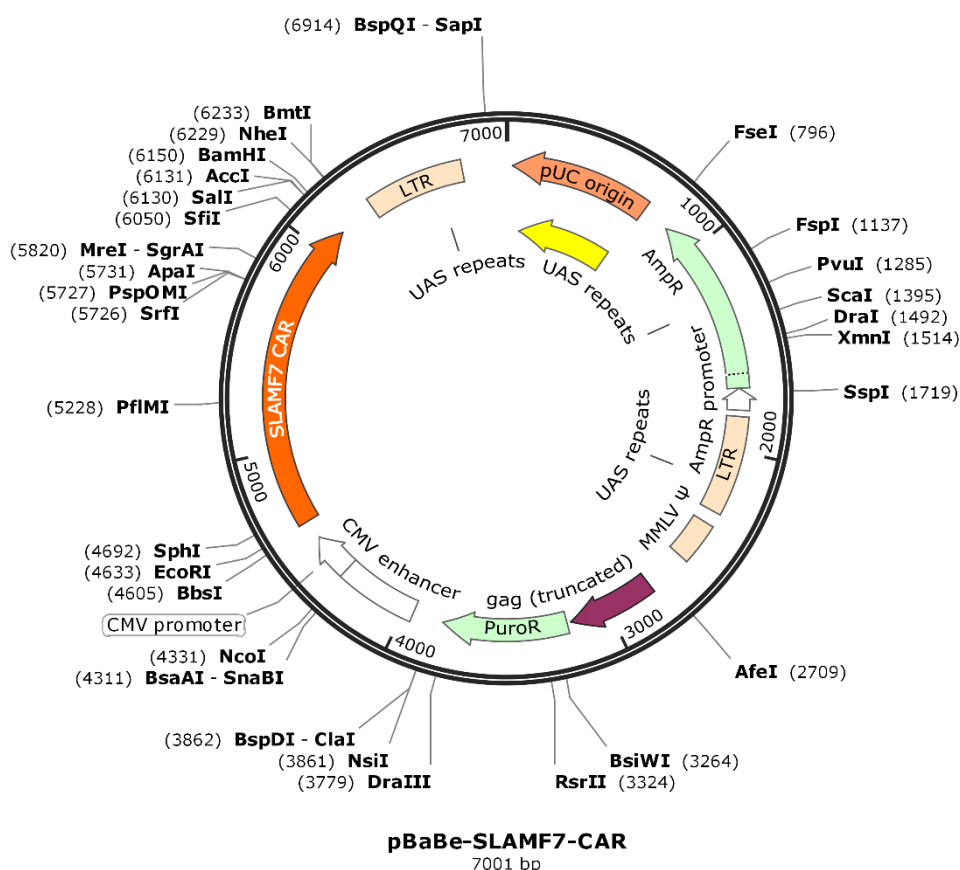


Figura 3.4. Mapa del plásmido pBaBe-SLAMF7-CAR generado al insertar el gen del CAR anti-SLAMF7 entre los sitios de restricción EcoRI y Sall del plásmido pBaBe-Bax. Imagen realizada con el programa SnapGene® Viewer v5.0.7.

3.3. GENERACIÓN DE LÍNEAS ESTABLES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE A PARTIR DE LA LÍNEA CELULAR NK-92

3.3.1 Vectores virales para la sobreexpresión estable de proteínas

Existen virus, tales como los lentivirus y retrovirus, que tienen la capacidad de integrar una porción de su genoma en los cromosomas de aquellas células eucariotas que se encuentren

en división. Esa capacidad puede ser aprovechada para obtener líneas celulares modificadas genéticamente que sobreexpresen un gen de interés de forma estable.

Los virus que se utilizaron para este método habían sido modificados previamente para que al infectar a las células diana inserten en su genoma únicamente el fragmento del vector comprendido entre las secuencias LTR (*Long Terminal Repeat*), que corresponde al gen o genes de interés. De esa forma se impide que los virus puedan continuar propagándose ya que carecen de las secuencias genéticas que codifican los factores de virulencia.

Una vez obtenidos ambos vectores virales (pHIV-CD16-ZsGreen y pBaBe-SLAMF7-CAR) (*ver apartado 3.2.6*), se utilizó la línea celular HEK-293T como células empaquetadoras para producir las partículas virales con las que infectar posteriormente las células a modificar. De manera común tanto para el vector lentiviral como el retroviral, se sembraron $3,8 \cdot 10^6$ células HEK-293T en un volumen de 10 ml de medio DMEM completo en placas de 60,1 cm².

Cuando las células ya se hubieron adherido, se cambió el medio por Opti-MEM 10% SFB sin AB, se añadió cloroquina 25 µM (Sigma-Aldrich) con el fin de evitar el posible transporte autofágico y se incubaron las placas 10 minutos a 37 °C. Aprovechando ese intervalo de tiempo se prepararon las mezclas de transfección. A partir de este momento el protocolo dejó de ser idéntico, ya que la mezcla de transfección fue distinta según el tipo de vector. Para evitar interferencias con la transfección, todos los medios de cultivo utilizados en estos procedimientos fueron sin AB.

3.3.1.1 Vectores lentivirales para la sobreexpresión estable de CD16

Como se ha explicado en la Introducción (*ver apartado 1.3.6.2.1.1*), las células NK-92 no expresan la molécula CD16. Para revertir esa situación y poder combinarlas con mAbs terapéuticos, se propuso modificarlas genéticamente con el gen del receptor CD16. De entre las variantes existentes de CD16, se eligió la de alta afinidad con el objetivo de favorecer todo lo posible la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La secuencia de la variante de alta afinidad se caracteriza por una mutación en la posición 176 de la cadena polipeptídica, produciéndose el cambio de fenilalanina a valina. Para llevar a cabo esta modificación se utilizó el vector lentiviral pHIV-CD16-ZsGreen (*ver Figura 3.3*).

Con respecto a la producción de las partículas lentivirales, se partió de las placas sembradas de células HEK-293T (*ver apartado 3.3.1*). Mientras se incubaban con cloroquina 25 µM, se prepararon las mezclas de transfección, las cuales consistieron en:

- Mezcla A: 500 µl de medio Opti-MEM + 92 µg de polietilenimina (PEI, Sigma-Aldrich)
- Mezcla B: 500 µl de medio Opti-MEM + 10 µg del vector pHIV-CD16-ZsGreen + 10 µg de PAX2 (proteínas de la cápside vírica y las retrotranscriptasas virales encargadas de la replicación) + 3 µg de MDG2 (proteínas de la envuelta del virus)

Una vez preparadas, se añadió con suavidad la mezcla A sobre la mezcla B y se dejó incubar a temperatura ambiente (RT) durante 20 minutos. Transcurrido ese tiempo, la mezcla total se añadió gota a gota sobre las células HEK-293T distribuyéndolas por distintas zonas de la placa. Se homogeneizó agitando las placas suavemente y se incubaron O/N a 37 °C.

Al día siguiente se reemplazó el medio por 10 ml nuevos de medio Opti-MEM 10% SFB sin AB. Se dejaron incubar nuevamente las placas durante 48 horas, para dejar producir los lentivirus. Finalizado ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos, en los que se encontraban los virus, y se filtraron mediante filtros de 0,45 µm (Acrodisc®, Pall Corporation) para eliminar posibles restos celulares.

Al tratarse las células a transfectar de células en suspensión, se utilizaron los sobrenadantes virales filtrados para resuspender las células NK-92. Para cada infección se sembraron 10⁶ células por pocillo en placas de 6 pocillos, en 3 ml de volumen total por pocillo. La distribución por placa fue de un pocillo control con 3ml de medio MEMα completo sin AB, dos pocillos con 3 ml de sobrenadante vírico y dos pocillos con una mezcla de 2 ml de sobrenadante vírico y 1 ml de MEMα completo sin AB. A cada pocillo se añadieron 100 UI/ml de IL-2, 4 µg/ml de polibreno (Merck, Sigma-Aldrich), y a la mitad de ellos 8 µg/ml de dextrano (Sigma-Aldrich).

Las placas se centrifugaron durante 90 minutos a 2.400 xg y 32 °C y seguidamente se dejaron incubar 24 horas con los sobrenadantes virales. Después de ese tiempo se cambiaron los medios por nuevos sobrenadantes virales y se repitieron la centrifugación y la incubación. Transcurridas 24 horas de la segunda infección, las células se trasvasaron a tubos de fondo cónico de 15 ml y se centrifugaron 5 minutos a 58 xg. Se desecharon los sobrenadantes, se lavaron las células con PBS y se sembraron en frascos de cultivos a una densidad de 4·10⁵ células/ml en medio MEMα completo con 100 UI/ml de IL-2.

Durante los días posteriores a la transfección se monitorizó la presencia de fluorescencia verde en los cultivos debida a la expresión de la proteína ZsGreen. Este seguimiento se realizó con un microscopio invertido de fluorescencia (Eclipse TE300, Nikon) y otro microscopio directo de fluorescencia (Eclipse 50i, Nikon). Una semana después de expandir los cultivos infectados se seleccionaron las células transfectadas por citometría de flujo (*ver apartado 3.5.3*). Las células seleccionadas se cultivaron en medio MEMα completo con 100 UI/ml de IL-2 hasta alcanzar una densidad celular alta que permitiera comprobar la expresión de CD16 por citometría de flujo (*ver apartado 3.5.2*). A partir de ese momento el mantenimiento de los cultivos fue similar al de las células NK-92 parentales, volviendo a usar una concentración de IL-2 de 25 UI/ml.

3.3.1.2 Vectores retrovirales para la sobreexpresión estable de un CAR anti-SLAMF7

Una vez que las células NK-92 expresaban CD16 gracias a la transfección con el plásmido pHIV-CD16-ZsGreen, éstas eran capaces de ejercer la ADCC siempre y cuando se añadiera un mAb terapéutico. Para eliminar esa dependencia, se decidió transfectarlas de nuevo para que expresasen un CAR mediante el cual, en teoría, se desencadenaría directamente la

actividad citotóxica de las células transfectadas. Para llevar a cabo esta modificación se empleó el vector retroviral pBaBe-SLAMF7-CAR (ver *Figura 3.4*).

Con respecto a la producción de las partículas retrovirales, se partió de las placas sembradas de células HEK-293T (ver *apartado 3.3.1*). Mientras se incubaban con cloroquina 25 μ M, se prepararon las mezclas de transfección, las cuales consistieron en:

- Mezcla A: 500 μ l de medio Opti-MEM + 42 μ g de PEI.
- Mezcla B: 500 μ l de medio Opti-MEM + 3 μ g del vector pBaBe-SLAMF7-CAR + 5 μ g de pNVUL-MLV-gag-pol (proteínas de la cápside vírica y las retrotranscriptasas virales encargadas de la replicación) + 2,5 μ g de pMDG-VSV (proteínas de la envuelta del virus)

Una vez preparadas, se añadió con suavidad la mezcla A sobre la mezcla B y se dejó incubar a RT 20 minutos. Transcurrido ese tiempo, la mezcla total se añadió gota a gota sobre las células HEK-293T distribuyéndolas por distintas zonas de la placa. Se homogeneizó agitando las placas suavemente y se incubaron O/N a 37 °C.

Al día siguiente se reemplazó el medio por 10 ml nuevos de medio Opti-MEM 10% SFB sin AB y se dejaron incubar nuevamente las placas durante 48 horas, para dejar producir los retrovirus. Finalizado ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos, en los que se encontraban los virus, y se filtraron mediante filtros de 0,45 μ m para eliminar posibles restos celulares.

Al igual que en la primera transfección, al tratarse las células a transfectar de células en suspensión, se utilizaron los sobrenadantes virales filtrados para resuspender las células NK-92-CD16. Para cada infección se sembraron 10^6 células por pocillo en placas de 6 pocillos, en 3 ml de volumen total por pocillo. La distribución por placa fue de un pocillo control con 3ml de medio MEM α completo sin AB, dos pocillos con 3 ml de sobrenadante vírico y dos pocillos con una mezcla de 2 ml de sobrenadante vírico y 1 ml de MEM α completo sin AB. A cada pocillo se añadieron 100 UI/ml de IL-2 y 4 μ g/ml de polibreno. En esta transfección también se añadieron a los pocillos 10 μ g/ml de Vectofusin-1® (Miltenyi Biotec).

Las placas se centrifugaron durante 90 minutos a 2.400 xg y 32 °C y se dejaron incubar 24 horas con los sobrenadantes virales. Tras ese tiempo se cambiaron los medios por nuevos sobrenadantes virales y se repitieron la centrifugación y la incubación. Transcurridas 24 horas de la segunda infección, las células se trasvasaron a tubos de fondo cónico y se centrifugaron 5 minutos a 58 xg. Se desecharon los sobrenadantes, se lavaron las células con PBS y se sembraron en frascos de cultivos a una densidad de $4 \cdot 10^5$ células/ml en medio MEM α completo con 100 UI/ml de IL-2.

Después de 48 horas en cultivo tras la transfección, se añadieron 2 μ g/ml de puomicina (InvivoGen) durante 3 semanas para la selección de las células transfectadas. De manera complementaria también se hizo uso de la citometría de flujo para seleccionarlas mediante un marcaje secundario (ver *apartado 3.5.2* y *apartado 3.5.3*).

3.4 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR

Para estudiar los mecanismos citotóxicos de las distintas células NK involucradas en este trabajo, así como la relevancia de cada uno de ellos, éstas se utilizaron como células efectoras co-incubándolas con varios tipos de células diana (principalmente células de MM, pero también PBMCs y blastos). Estos experimentos consistieron en determinar la muerte inducida por las células efectoras sobre las células diana en diversas condiciones. En algunas variantes de los experimentos, las células diana no fueron co-incubadas con las células NK sino con proteínas o sobrenadantes de ellas.

3.4.1 Citotoxicidad de las células eNK sobre líneas celulares de mieloma múltiple

Una vez aisladas (*ver apartado 3.1.7.1*), las células eNK necesarias para el experimento se centrifugaron 5 minutos a 233 xg y se resuspendieron en PBS dejándolas a una densidad de $2,5 \cdot 10^6$ células/ml. Para poder distinguirlas en el experimento de las células diana, las células eNK se incubaron durante 15 minutos a 37 °C con la sonda fluorescente CTG (*CellTrackerTM Green*, Life Technologies) a una concentración de 0,5 μ M para marcarlas intracelularmente. Con el fin de eliminar el exceso de sonda, las células eNK se centrifugaron después 5 minutos a 233 xg, se resuspendieron en un volumen equivalente de medio RPMI-1640 completo y se incubaron 45 minutos a 37°C en el incubador de CO₂.

Una vez lavadas, las células eNK se centrifugaron de nuevo 5 minutos a 233 xg y se resuspendieron en medio RPMI-1640 completo a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células/ml. En el caso de querer dilucidar la relevancia entre los distintos mecanismos citotóxicos posibles, las células eNK se repartieron en volúmenes iguales en tantos microtubos como condiciones distintas se fueran a ensayar. En aquellas condiciones en las que se utilizaron reactivos bloqueantes de los mecanismos citotóxicos, las concentraciones empleadas fueron:

- EGTA (*ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*, Sigma): 1 mM.
- Fas-Fc: 20 ng/ml.
- RIK-2 (BD PharmingenTM): 5 μ g/ml.

Tras añadir los distintos bloqueantes, las células eNK se incubaron durante 1 hora a 37 °C en el incubador de CO₂ para dejarlos actuar. En el transcurso de ese tiempo, se prepararon las células diana a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células/ml. Después, se sembraron $5 \cdot 10^4$ células diana por pocillo, en placas de 96 pocillos de fondo cónico, en tantos pocillos como correspondiera al diseño del experimento. Siempre que fuera posible, cada condición se sembró por duplicado.

En caso de existir condiciones en las que se ensayase la ADCC, los pocillos de las células diana correspondientes se preincubaron 15 minutos con daratumumab a una concentración final de 5 μ g/ml, antes de ser co-incubadas con las células efectoras.

Al finalizar las distintas incubaciones con los reactivos, se añadió a sus correspondientes pocillos de la placa la cantidad de células eNK requeridas de cada condición en función de los ratios efector-diana establecidos. En caso de ser preciso, los pocillos se completaron con medio

de cultivo RPMI-1640 completo hasta que todos tuvieran un volumen final de 200 μ l/pocillo. Las células permanecieron co-incubadas a 37 °C en el incubador de CO₂ durante 4 horas, tras lo cual se procedió a determinar la muerte celular producida mediante citometría de flujo (*ver apartado 3.5.1*).

En algunos casos, para comprobar si durante la co-incubación se había producido trogocitosis entre las células efectoras y las células diana, se realizó sobre las células eNK el marcaje de proteínas de superficie características del MM, como CD38 (*ver apartado 3.5.2*)

3.4.2 Citotoxicidad de los sobrenadantes de las células NK-92 sobre líneas celulares de mieloma múltiple

Para comprobar si las células NK-92 producían y/o secretaban alguno de los principales ligandos de los receptores mortales, o ambos, dichas células se centrifugaron durante 5 minutos a 114 xg y se recolectó el sobrenadante del medio MEM α completo utilizado durante, al menos, 48 horas de cultivo. Seguidamente, el sobrenadante se filtró con filtros de 0,22 μ m de tamaño de poro para eliminar cualquier posible resto celular.

Se preparó una suspensión de células diana a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células/ml y se sembraron $5 \cdot 10^4$ células diana por pocillo, en placas de 96 pocillos de fondo cónico, en tantos pocillos como correspondiera al diseño del experimento. Siempre que fuera posible, cada condición se sembró por duplicado. Posteriormente, se añadió el sobrenadante recogido y filtrado o los medios control (RPMI-1640 completo y MEM α completo) a los distintos pocillos hasta completar 200 μ l de volumen total por pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C en el incubador de CO₂ durante 4 o 24 horas. Por último, se procedió a determinar la muerte celular, en caso de haberse producido, mediante citometría de flujo (*ver apartado 3.5.1*).

3.4.3 Citotoxicidad de sTRAIL sobre líneas celulares de mieloma múltiple

Las células diana necesarias se resuspendieron a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células/ml y se sembraron $5 \cdot 10^4$ células diana por pocillo, en placas de 96 pocillos de fondo cónico, en tantos pocillos como correspondiera al diseño del experimento. Siempre que fuera posible, cada condición se sembró por duplicado. Los pocillos se completaron con medio RPMI-1640 completo hasta que todos tuvieron un volumen final de 200 μ l por pocillo. A los pocillos pertinentes se añadió 1 μ g/ml de TRAIL recombinante soluble (sTRAIL). Las placas se incubaron a 37 °C en el incubador de CO₂ durante 4 o 24 horas y posteriormente se procedió a determinar la muerte celular producida mediante citometría de flujo (*ver apartado 3.5.1*).

3.4.4 Citotoxicidad de las células NK-92 sobre líneas celulares de mieloma múltiple

Aunque el esquema del procedimiento fue similar al empleado con las células eNK (*ver apartado 3.4.1*), para las células NK-92 se empleó el medio MEM α completo y las centrifugaciones fueron a 114 xg. Debido a su alta capacidad citotóxica, la concentración utilizada de EGTA se aumentó a 5 mM. Al carecer del receptor CD16, no se utilizó daratumumab en estos experimentos.

3.4.5 Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 sobre líneas celulares de mieloma múltiple, PBMCs y blastos

En este caso las propias células NK-92-CD16 eran fluorescentes, gracias a la proteína ZsGreen codificada por el plásmido pHIV-CD16-ZsGreen con el que se transfectaron. Por esa razón no fue necesario marcarlas con la sonda fluorescente CTG para poder distinguirlas de las células diana. Por lo tanto, las células NK-92-CD16 necesarias para el experimento se resuspendieron directamente en medio MEM α completo a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células/ml. A partir de ese punto el protocolo fue igual a lo descrito para las células NK-92 (*ver apartado 3.4.4*), con dos salvedades. Por un lado, entre las distintas condiciones ensayadas con los reactivos bloqueantes de la citotoxicidad, se añadió la siguiente:

- Ferrostatina-1 (Med Chem Express): 1 μ M.

Por otro lado, al expresar estas células el receptor CD16, se pudo ensayar la ADCC en presencia de daratumumab. Para ello, los pocillos de las células diana correspondientes se preincubaron 15 minutos con daratumumab a una concentración final de 5 μ g/ml, antes de ser co-incubadas con las células efectoras.

Cabe destacar que con estas células efectoras se hicieron experimentos co-incubándolas con distintos tipos de células diana, incluyendo las PBMCs y los blastos obtenidos a partir de muestras de sangre (*ver apartado 3.1.7 y apartado 3.1.7.2*). Además, para comprobar si durante la co-incubación se había producido trogocitosis entre las células efectoras y las células diana se procedió como se indica con las células eNK (*ver apartado 3.4.1*).

3.4.6 Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 irradiadas sobre líneas celulares de mieloma múltiple

Las células NK-92-CD16 fueron irradiadas en colaboración con Javier Jiménez, especialista en Radiofísica hospitalaria, y el resto del departamento de Física y Protección Radiológica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

Para la irradiación se utilizó un acelerador lineal de electrones de dicho hospital, modelo *Varian True Beam* con colimador multilámina HD 120. Las distintas dosis administradas (10 y 15 Gy) fueron preparadas con el sistema de planificación de tratamientos *Eclipse v15.6.04*, utilizando el algoritmo *Accuros XB*, por parte del personal radiofísico del mencionado departamento.

Dicho plan de tratamiento se realizó en base a imágenes de tomografía computarizada tomadas con un escáner *General Electric High Speed 120*, consistente en dos haces isocéntricos opuestos en la dirección horizontal (ángulo de Gantry de 90° y 270°, respectivamente) con energía nominal de 10 MV con filtro aplanador, colimados en forma de cuadrado de 10·10 cm² de superficie en el isocentro. En dicho isocentro se situó la muestra, y su posición de irradiación se ajustó a la posición de planificación utilizando el sistema de imagen *cone beam CT* de rayos X del acelerador.

Cada irradiación se produjo con la cantidad establecida de células alojada en un frasco de cultivo T25 relleno al máximo de su capacidad con medio de cultivo MEM α completo. El frasco, sellado alrededor del cuello con una película termoplástica (Parafilm®), se situó en una cuba llena de H₂O desionizada. Antes de colocarlo en la cuba, se resuspendió el contenido celular del frasco. El volumen en la cuba fue el suficiente para que el espesor de H₂O que la radiación incidente tenía que atravesar hasta llegar a la muestra fuera de unos 15 cm, garantizando que se superase la zona de acumulación de los haces.

Tras la irradiación, una vez de nuevo en el laboratorio, las células se trasvasaron a tubos de fondo cónico y se centrifugaron 5 minutos a 114 xg. Se eliminó el exceso de medio utilizado para rellenar el frasco de cultivo de manera que las células irradiadas quedaran sembradas a la densidad habitual de mantenimiento de las células NK-92 y las líneas generadas a partir de ellas (*ver apartado 3.1.6*).

A la hora de realizar los experimentos de citotoxicidad, las células NK-92-CD16 irradiadas necesarias para el experimento se resuspendieron directamente en medio MEM α completo a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células/ml. A partir de ese punto se siguió el mismo protocolo de trabajo indicado para las células NK-92-CD16 (*ver apartado 3.4.5*).

3.4.7 Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 sobre líneas celulares de mieloma múltiple en condiciones de cultivo en 3D

Para generar las condiciones de cultivo en 3D se utilizó el hidrogel GrowDex® 1,5% (UPM Biomedicals), que imita la matriz extracelular. Siguiendo las indicaciones del fabricante, el hidrogel se preparó en un tubo de fondo cónico de 15 ml a una concentración final de 0,25% en medio RPMI-1640 completo. Las células de MM se resuspendieron en dicha preparación, a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células/ml.

La suspensión resultante de cada línea celular se dividió en dos volúmenes iguales en sendos microtubos. Uno de ellos se preincubó 15 minutos con daratumumab a una concentración final de 5 μ g/ml, para las condiciones experimentales con ADCC. Transcurrido ese tiempo, se sembraron $5 \cdot 10^4$ células por pocillo, en placas de 96 pocillos de fondo plano, en tantos pocillos como correspondiera al diseño del experimento. Siempre que fuera posible, cada condición se sembró por duplicado.

Las células NK-92-CD16 necesarias para el experimento se resuspendieron directamente en medio MEM α completo a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células/ml. Se añadió a sus correspondientes pocillos de la placa la cantidad de células NK-92-CD16 requeridas en función de los ratios efector-diana establecidos. En caso de ser preciso, se completaron los pocillos con medio de cultivo hasta que todos tuvieran un volumen final de 200 μ l/pocillo, y las células permanecieron co-incubadas a 37 °C en el incubador de CO₂ durante 24 horas. Una vez finalizado ese tiempo, se utilizó GrowDase™ (UPM Biomedicals) siguiendo las indicaciones del fabricante, para degradar enzimáticamente el hidrogel y así poder determinar la muerte celular producida mediante citometría de flujo (*ver apartado 3.5.1*).

3.4.8 Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 sobre células plasmáticas de pacientes de mieloma múltiple

Una vez aisladas las BMMCs de los pacientes (*ver apartado 3.1.8*), se determinó el porcentaje de células de MM presentes por citometría de flujo gracias al marcaje de proteínas de membrana características del MM, como CD38 y CD138 (*ver apartado 3.5.2*). Una vez establecido, se recalculó la densidad celular de cada muestra en base únicamente a las células de MM.

De esa forma, las muestras se resuspendieron a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células de MM/ml en medio RPMI-1640 primario y se sembraron $5 \cdot 10^4$ células de MM por pocillo, en placas de 96 pocillos de fondo cónico, en tantos pocillos como correspondiera al diseño del experimento. Siempre que fuera posible, cada condición se sembró por duplicado. Se añadieron 5 µg/ml de daratumumab a los pocillos correspondientes a condiciones de ADCC y se incubó la placa en el incubador de CO₂ a 37 °C durante 15 minutos para favorecer su unión a las dianas.

Durante ese período de incubación, las células NK-92-CD16 necesarias para el experimento se resuspendieron directamente en medio MEMα completo a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células/ml. Al finalizar los 15 minutos, se añadió a los pocillos de la placa pertinentes la cantidad de células NK-92-CD16 requeridas en función de los ratios efector-diana establecidos. En caso de ser preciso, se completaron los pocillos con medio de cultivo hasta que todos tuvieron un volumen final de 200 µl/pocillo, y las células permanecieron co-incubadas a 37 °C en el incubador de CO₂ durante 4 horas. Finalmente, se procedió a determinar la muerte celular producida mediante citometría de flujo (*ver apartado 3.5.1*) sobre la población específica de MM, gracias a un marcaje previo de CD138 en membrana (*ver apartado 3.5.2*).

3.5 CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo permite el estudio de diversas características celulares (viabilidad o muerte celular, expresión de proteínas, función metabólica, etc.) mediante la monitorización de técnicas de absorción-dispersión de luz y de emisión de fluorescencia. En el transcurso de esta tesis doctoral se utilizaron dos citómetros de flujo distintos.

El primero de ellos, usado de forma generalizada en los experimentos para analizar las células, fue el citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Zaragoza. Este citómetro consta de dos láseres para excitar los fluoróforos (uno de 488 nm y otro de 635 nm) y seis canales de detección. Cuatro de los canales (FL1-H-FL4-H) detectan la emisión de fluorescencia en función de las distintas longitudes de onda (λ). Los dos restantes, el *Forward Scatter* (FSC-H) y el *Side Scatter* (SSC-H), determinan en base a la luz absorbida y dispersada el tamaño y la granulosidad de las células, respectivamente.

El otro citómetro utilizado fue un citómetro separador SH800S (Sony Biotechnology) del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. Este citómetro posee tres láseres colineales de 405,

488 y 635 nm, y seis detectores de fluorescencia además del FSC-H y SSC-H. Su principal característica es que permite separar las células en función de las características analizadas por citometría de flujo, cargando eléctricamente las gotas que contienen las células de interés y aplicando después un campo eléctrico. Esa fue la razón para utilizarlo eventualmente para aislar subpoblaciones de los cultivos celulares modificados genéticamente (ver apartado 3.5.3).

Los datos técnicos sobre los canales pertenecientes a cada láser y las longitudes de onda de excitación de ambos citómetros se recogen en la *Tabla 3.1*.

FACSCalibur		SH800S	
Excitación con el láser de 488 nm			
Canal: λ	Floróforos usados	Canal: λ	Fluoróforos usados
FSC-H (<i>Forward Scatter</i>)	-	FSC-H (<i>Forward Scatter</i>)	-
SSC-H (<i>Side Scatter</i>)	-	SSC-H (<i>Side Scatter</i>)	-
-	-	FL2-H: 525 $\pm$ 25 nm	ZsGreen
FL1-H: 530 $\pm$ 15 nm	CTG, FITC, A488, ZsGreen	FL3-H: 600 $\pm$ 30 nm	PE
FL2-H: 585 $\pm$ 21 nm	PE	FL4-H: 655 $\pm$ 15 nm	A647
FL3-H: 670 nm <i>Longpass</i> ($\geq$ 670 nm)	7AAD	FL5-H: 720 $\pm$ 30 nm	-
		FL6-H: 785 $\pm$ 30 nm	-
Excitación con el láser de 635 nm			
Canal: λ	Floróforos usados	Canal: λ	Fluoróforos usados
FL4-H: 661 $\pm$ 8 nm	APC, DY634, A647	FL4-H: 655 $\pm$ 15 nm	A647
-	-	FL5-H: 720 $\pm$ 30 nm	-
-	-	FL6-H: 785 $\pm$ 30 nm	-
Excitación con el láser de 405 nm			
Canal: λ	Floróforos usados	Canal: λ	Fluoróforos usados
-	-	FL1-H: 450 $\pm$ 25 nm	-
-	-	FL2-H-FL6-H	-

Tabla 3.1. Propiedades técnicas de los citómetros de flujo empleados a lo largo de esta tesis. Fluoróforos: CellTracker™ Green (CTG), isotiocianato de fluoresceína (FITC), Alexa Fluor® 488/647 (A488/A647), ficoeritrina (PE), 7-aminoactinomicina D (7AAD) y alofocianina (APC).

Los datos y resultados de las citometrías se recogieron a través del software *CellQuestPro*, y se analizaron utilizando el programa informático *FlowJo* vX.0.7.

3.5.1 Determinación de la muerte celular por citometría de flujo

Para controlar de forma rutinaria la muerte celular de los cultivos celulares en mantenimiento se empleó la tinción con azul trypan, tal y como se ha descrito previamente (ver apartado 3.1.5). En cambio, para analizar la muerte producida en cada experimento se utilizó la citometría de flujo.

3.5.1.1 Determinación de la translocación de fosfatidilserina

En la experimentación *in vitro*, en ausencia de macrófagos, la translocación de fosfatidilserina (PS) es el indicador apropiado de la inducción de apoptosis en las células (ver apartado 1.2.1.3). Para su detección se utilizó la proteína anexina-V, la cual presenta afinidad específica por la PS. La anexina-V utilizada a lo largo de esta tesis doctoral consistió en un constructo unido al fluoróforo DY634 ($\lambda_{\text{abs}} = 635 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 658 \text{ nm}$).

El marcaje se realizó en las placas de 96 pocillos de dos formas distintas, en función del tipo de experimento a analizar. Si las muestras o parte de ellas habían sido tratadas con EGTA, la placa se centrifugó 2 minutos a 2.851 xg y se eliminó el volumen de los pocillos. El pellet celular de cada pocillo se resuspendió con 100 μl de una preparación de tampón ABB (*Annexin Binding Buffer*: NaCl 140 mM, CaCl_2 2,5 mM y HEPES/NaOH 10 mM; pH 7,4) que incluía 0,05 μl /pocillo de anexina-V DY634. En cualquier otro caso, si no se había utilizado EGTA en el experimento, se preparó una mezcla de ABB con 0,05 μl /pocillo de anexina-V DY634 y se añadió a cada pocillo el volumen de mezcla correspondiente al 10% del volumen presente en el pocillo.

En ambos casos, una vez añadida a los pocillos la preparación de anexina-V DY634 en tampón ABB las placas se dejaron incubar durante 15-20 minutos a RT y en oscuridad. Finalmente, las muestras se trasvasaron a tubos de citometría y se añadieron 100 μl más de ABB a todas para tener suficiente volumen para analizarlas en el citómetro de flujo FACSCalibur.

3.5.1.2 Determinación de la pérdida de la integridad de membrana

La apoptosis no es el único tipo posible de muerte celular. Para cubrir más opciones de muerte celular, en determinadas ocasiones se utilizó el compuesto 7-aminoactinomicina D (7AAD, $\lambda_{\text{abs}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 647 \text{ nm}$). Se trata de un fluoróforo con afinidad por el DNA, que se intercala entre sus hebras. Es necesario para que se produzca esa unión que las membranas celulares estén dañadas y hayan perdido su integridad. Esto ocurre por ejemplo en la necrosis, necroptosis, piroptosis o ferroptosis, aunque también puede producirse en fases tardías de la apoptosis *in vitro* si no hay macrófagos en los cultivos que eliminen las células apoptóticas.

En caso de utilizarse, la sonda 7AAD se marcó conjuntamente con anexina-V DY634, añadiendo 1 μl /pocillo de 7AAD a la mezcla de ABB y anexina-V DY634, y las placas de 96 pocillos se trataron tal y como se ha descrito en la sección previa (ver apartado 3.5.1.1).

3.5.2 Análisis de la expresión de proteínas en la membrana celular por citometría de flujo

En numerosas ocasiones fue objeto de interés determinar la expresión o el nivel de expresión de diversas proteínas en la membrana celular. A la hora de realizar estos análisis se sembraron 10^5 células por pocillo, en placas de 96 pocillos de fondo cónico. Las placas se centrifugaron 2 minutos a 2.851 xg y se eliminaron los sobrenadantes mediante un giro rápido (*flick*) de la placa. Los pellets celulares se resuspendieron en 100 μl de PBS al 5% de SFB (para bloquear posibles uniones inespecíficas). En ese momento se añadió la cantidad adecuada de cada mAb, en función de las proteínas a analizar, tal y como recoge la *Tabla 3.2*. Por cada

marcaje se realizó un marcaje en paralelo con el control de isotipo del fluoróforo correspondiente, para utilizarlo como control negativo o control de señales inespecíficas. Los distintos controles de isotipo empleados y la cantidad de cada uno se recogen en la *Tabla 3.3*.

Tras añadir los distintos mAbs, las placas se incubaron 30 minutos a 4 °C y en oscuridad. Una vez transcurrido ese tiempo, las placas se volvieron a centrifugar 2 minutos a 2.851 xg y se eliminó el volumen de los pocillos con otro *flick*. En esta ocasión, los pellets celulares se resuspendieron en 200 µl de PBS y las muestras resultantes se trasvasaron a los tubos de citometría para proceder a analizarlas en el citómetro de flujo FACSCalibur.

Proteína diana (humana)	Fluoróforo conjugado	Tipo y especie del mAb	Concentración utilizada	Proveedor
CD16	Alexa Fluor® 647	IgG1 κ, ratón	1/125 (v/v)	BD Pharmingen™ (BD Biosciences)
CD38	APC	IgG1 κ, ratón	1/10, 1/20, 1/50 (v/v), según el experimento	BD Pharmingen™ (BD Biosciences)
CD138	PE	IgG1 κ, ratón	1/50 (v/v)	BD Pharmingen™ (BD Biosciences)
CD262 (DR5)	PE	IgG1 κ, ratón	1/25 (v/v)	Invitrogen (eBioscience)
CD261 (DR4)	PE	IgG1 κ, ratón	1/50 (v/v)	Invitrogen (eBioscience)
CD253 (TRAIL)	PE	IgG1 κ, ratón	1/50 (v/v)	BD Pharmingen™ (BD Biosciences)
FasL	FITC	IgG1 κ, ratón	1/50 (v/v)	Santa Cruz Biotechnologies
CD95 (Fas)	FITC	IgG1 κ, ratón	1/50 (v/v)	eBiosciences
PD-1	Alexa Fluor® 488	IgG1 κ, ratón	1/200 (v/v)	Biolegend
CD3	FITC	IgG1 κ, ratón	1/200 (v/v)	Miltenyi Biotec
CD56	APC	IgG1 κ, ratón	1/200 (v/v)	Miltenyi Biotec
CD319 (SLAMF7)	PE	IgG2b κ, ratón	1/100 (v/v)	Invitrogen (eBioscience™)
IgG Fc, (marcaje secundario)	PE	Policlonal, cabra	1/80 (v/v)	Invitrogen (eBioscience™)

Tabla 3.2. Información técnica y concentraciones de los anticuerpos monoclonales (mAbs) empleados para el marcaje por citometría de flujo a lo largo de esta tesis doctoral. Fluoróforos: alofococianina (APC), ficoeritrina (PE) e isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Cabe destacar que en el caso del marcaje contra el fragmento cristizable (Fc) de las inmunoglobulinas de isotipo G (IgG Fc) se trataba de un marcaje secundario para detectar la expresión del CAR anti-SLAMF7 en las células CAR-NK-92-CD16, generadas gracias a la transfección con retrovirus (*ver apartado 3.3.1.2*). 10^5 células se sembraron por pocillo, en placas de 96 pocillos, en 200 μ l del propio medio de cultivo (el medio MEM α completo tiene tal porcentaje de sueros que se consideró suficiente para bloquear posibles uniones inespecíficas).

Sobre dicho volumen se añadió 1 μ g de la proteína quimera SLAMF7-Fc (Acro Biosystems) con el fin de que, en caso de expresarse, el CAR se uniera a la porción de SLAMF7. Seguidamente, se añadió la misma cantidad del mAb anti-IgG Fc conjugado con ficoeritrina (PE) para que se uniera sobre la porción Fc de la proteína quimera unida a las células. A otro pocillo en paralelo se añadió directa y exclusivamente el mAb anti-IgG Fc PE, a modo de control de señales inespecíficas. El marcaje se incubó durante 30 minutos a 4 °C y en oscuridad, y una vez finalizado ese tiempo se resuspendió el contenido de los pocillos y se trasvasó a los tubos de citometría para proceder a analizarlas en el citómetro de flujo FACSCalibur.

Control de isotipo	Fluoróforo conjugado	Especie del mAb	Concentración utilizada	Proveedor
IgG1 κ	Alexa Fluor®647	ratón	1/125 (v/v)	BD Pharmingen™ (BD Biosciences)
IgG1 κ	APC	ratón	Lo mismo que de CD38	BD Pharmingen™ (BD Biosciences)
IgG1 κ	PE	ratón	1/100 para DR4 1/25 para DR5	Invitrogen (eBioscience)
IgG1 κ	PE	ratón	1/25 para TRAIL	Biolegend
IgG2b κ	PE	ratón	1/100 (v/v)	Invitrogen (eBioscience)
IgG1 κ	FITC	ratón	1/25 (v/v) 1/50 (v/v)	BD Pharmingen™ (BD Biosciences)
IgG1 κ	Alexa Fluor®488	ratón	1/200 (v/v)	Biolegend

Tabla 3.3. Información técnica y concentraciones de los anticuerpos monoclonales (mAbs) usados como control de isotipo en los marcajes por citometría de flujo durante esta tesis doctoral. Fluoróforos: alofocianina (APC), ficoeritrina (PE) e isotiocianato de fluoresceína (FITC).

3.5.3 Separación celular por citometría de flujo

Para poder seleccionar y aislar las células transfectadas se recurrió a la separación celular por citometría de flujo. La población celular a analizar se resuspendió a una densidad de entre $4 \cdot 10^6$ y $7 \cdot 10^6$ células/ml, en un volumen no superior a 1,5 ml de medio MEM α completo, y se colocaron en un tubo de fondo cónico de 15 ml. En otro tubo igual se prepararon 4 ml de medio MEM α completo con 100 UI/ml de IL-2 en el que recoger la subpoblación de interés. Ambos tubos se colocaron en el citómetro separador SH800S, y se analizó la población celular.

En la transfección lentiviral con el plásmido pHIV-CD16-ZsGreen se determinó que la subpoblación ZsGreen⁺ (con fluorescencia intrínseca) era la de interés. Una vez finalizado el proceso, las células recogidas en el tubo de fondo cónico se sembraron en un frasco de cultivo T25 trasvasando los 4 ml de medio, y se dejaron expandir para consolidar la nueva línea celular NK-92-CD16 generada. Posteriormente, en una ocasión en la que el paso del tiempo disminuyó ligeramente el nivel de intensidad de la expresión de CD16 en las células NK-92-CD16, se refinó la población. En dicho caso, los preparativos se realizaron de la misma forma que la indicada previamente, pero además se empleó un marcaje de CD16 (*ver apartado 3.5.2*) y se seleccionó en el citómetro separador SH800S la población con mayor intensidad de expresión de CD16.

En la transfección retroviral con el plásmido pBaBe-SLAMF7-CAR, se realizó primero el marcaje secundario del CAR con la proteína quimera SLAMF7-Fc y el anticuerpo anti-IgG Fc PE tal y como se describió anteriormente (*ver apartado 3.5.2*). Dicho marcaje se efectuó en una placa de 96 pocillos de fondo cónico, en tantos pocillos como fuera necesario para tener una cantidad suficiente de células totales para analizar. Una vez finalizado el tiempo del marcaje, las células marcadas se juntaron todas en un tubo de fondo cónico de 15 ml en volumen no superior a 1,5 ml de medio MEM α completo. En otro tubo igual se prepararon 4 ml de medio MEM α completo con 100 UI/ml de IL-2 en el que recoger la subpoblación de interés. Ambos tubos se colocaron en el citómetro separador SH800S, y se analizó la población celular, seleccionando en este caso la población doble positiva para la señal de ZsGreen y para el marcaje indicado (ZsGreen⁺PE⁺). Las células recogidas en el tubo se sembraron en un frasco de cultivo T25 trasvasando los 4 ml de medio, y se dejaron expandir para consolidar la nueva línea celular CAR-NK-92-CD16 generada.

3.6 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING

3.6.1 Extracción de proteínas celulares totales

Para estudiar mediante la técnica de *Western Blotting* la expresión intracelular de varias proteínas citotóxicas de las diferentes células NK utilizadas en esta tesis doctoral, primero fue necesario extraerlas mediante lisados de células totales. Para ello se prepararon frascos de cultivo de cada tipo de célula NK de la misma manera anteriormente descrita (*ver apartado 3.1.6*). Las células se dejaron crecer 48-72 horas en cultivo consiguiendo la mayor cantidad posible de células totales, la cual se determinó mediante el recuento con azul trypan (*ver apartado 3.1.5*).

El contenido de cada frasco se trasvasó a tubos de fondo cónico de 15 ml y éstos se centrifugaron 5 minutos a 524 xg. En todos los casos se eliminó el medio de cultivo y se resuspendió el pellet en 1 ml de PBS. Dicho volumen se trasvasó a microtubos, los cuales se centrifugaron 5 minutos a 166 xg. Se eliminó el PBS y en este momento se añadió sobre los pellets el tampón de lisis (Tritón-X100 al 1%, Sigma; NaCl 150 mM, Merck; Tris/HCl 50 mM, pH 7,6; Sigma; glicerol al 10% v/v, Scharlau; EDTA 1 mM, Sigma; Na₃VO₄ 1 mM, Sigma; Na₄P₂O₇ 10 mM, Sigma; leupeptina 10 µg/ml, Sigma; NaF 10 mM, Sigma; y F-SO₂CH₂C₆H₅ 1 mM, Sigma)

en una proporción de 20 μl por cada 10^6 células. Una vez añadido, las muestras se resuspendieron utilizando el vórtex brevemente y se incubaron 30 minutos en hielo. Tras el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a $18.000 \times g$ a 4°C . Después de ello, los sobrenadantes se trasvasaron a nuevos microtubos y se conservaron a -80°C hasta el momento de cuantificar las proteínas extraídas.

3.6.2 Cuantificación de proteínas

La concentración proteica de los lisados obtenidos se cuantificó mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA). Para ello se empleó el kit comercial *Micro BCA™ Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del mismo. La reacción colorimétrica resultante se midió por absorbancia a 550 nm en un lector de placas (*EZ Read 400 Microplate Reader*, Biochrom).

3.6.3 Separación de las proteínas mediante SDS-Page y transferencia a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas se separaron en función de su peso molecular por SDS-Page (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis*). Durante la electroforesis se utilizaron geles verticales discontinuos de acrilamida/bisacrilamida. Tanto el gel concentrador (*stacking gel*) como el gel separador (*resolving gel*) fueron preparados en el laboratorio. La composición de ambos geles se recoge en la *Tabla 3.4*. Los geles se montaron en cubetas de electroforesis verticales (BioRad), y éstas se rellenaron con el tampón de electroforesis o *Running Buffer* (Tris base 19 mM, Sigma; Glicina 1,9 mM, Panreac; SDS al 0,01%, Merck).

Reactivos	Stacking Gel	Resolving Gel	
		12%	14%
30% Acrilamida/Bis, BioRad	0,5 ml	1,5 ml	1,75 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8 (<i>Stacking gel</i>)	1,25 ml	No aplica	No aplica
1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (<i>Resolving Gel</i>)	No Aplica	1,25 ml	1,25 ml
SDS 10%	50 μl	50 μl	50 μl
APS 10%, Sigma	150 μl	100 μl	100 μl
TEMED., Sigma	15 μl	10 μl	10 μl
Agua destilada	3 ml	2,1 ml	1,85 ml
Total	5 ml	5 ml	5 ml

Tabla 3.4. Composición de los geles utilizados para las electroforesis realizadas a lo largo de esta tesis doctoral. Reactivos: SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), persulfato de amonio (APS) y tetrametiletilendiamina (TEMED).

A los lisados de células totales anteriormente preparados se les añadió el volumen oportuno de tampón de carga 3X (Tris/HCl 150 mM, pH 7,4; SDS al 3%; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,3 mM; Na_4PO_7 30 mM; NaF 30 mM; glicerol al 30% v/v, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ al 30% v/v; y azul de bromofenol al 0,06% p/v) para quedar a una concentración final de 1X. Seguidamente se calentaron durante

5 minutos a 95 °C en un baño seco (Selecta), y se cargó en los carriles asignados el volumen correspondiente a 100 µg de proteína siempre que fuera posible. En un pocillo adicional se cargaron 3 µl del marcador de peso molecular *BlueStar Plus Prestained Protein Marker* (Cultek).

La electroforesis se realizó durante 90 minutos aproximadamente, a 180 V y 20 mA/gel. Posteriormente, se realizó la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare). Para ello se realizó un montaje tipo sándwich, en el cual entre una doble capa de papeles de filtro Whatman (GE Healthcare) se colocó el gel sobre la membrana. Los papeles de filtro fueron humedecidos previamente con tampón de transferencia (Tris/HCl 48 mM pH 8,3, Sigma; glicina 39 mM, Sigma; SDS al 0,037%, Merck; y metanol al 20%, Panreac). La electrotransferencia, de tipo semiseca, se realizó en un equipo Bio-Rad conectado a una fuente de electroforesis (Bio-Rad) para transferir las proteínas durante 75 minutos a 20 V y 400 mA.

Finalizada la electrotransferencia, se recuperaron las membranas y se sumergieron en una solución de rojo ponceau al 0,1% en ácido acético al 0,05%. Esta solución colorea de manera reversible las bandas protéicas, permitiendo comprobar si la electrotransferencia ha sido correcta. Tras la comprobación, las membranas se lavaron con H₂O destilada y después se procedió a bloquearlas incubándolas durante 1 hora a RT en agitación con leche desnatada al 5% p/v en tampón B (Tris/HCl 10 mM, pH 8; NaCl 0,12 M; Tween-20 al 0,1%, Panreac; y timerosal 0,1 g/L).

3.6.4 Análisis de proteínas mediante inmunotransferencia y detección de los inmunocomplejos

Cuando las membranas estuvieron bloqueadas, se lavaron con tampón B tres veces durante 10 minutos en agitación a RT. Tras el lavado, se incubaron con el anticuerpo primario específico para cada proteína citotóxica de las células NK durante toda la noche a 4 °C con agitación. Cada uno de los anticuerpos se preparó y utilizó a la concentración recomendada por el proveedor, diluido en tampón B con 5% de BSA y 0,05% de azida de sodio. Dichos datos técnicos sobre los distintos anticuerpos utilizados se recogen más adelante en la *Tabla 3.5*.

A la mañana siguiente se procedió al lavado del anticuerpo primario (3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón B en agitación) y a la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora a RT y en agitación. Los anticuerpos secundarios utilizados para la detección de las proteínas estaban conjugados a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) y fueron preparados a la concentración indicada por el fabricante en tampón B con 2,5% de leche desnatada.

Después de la hora de incubación el lavado del anticuerpo secundario se efectuó en las mismas condiciones que el del anticuerpo primario. Seguidamente se procedió a revelar la membrana por quimioluminiscencia (ECL). Esta técnica se basa en la detección de la luz emitida tras la oxidación de un sustrato quimioluminiscente. En este caso, la membrana se incubó durante 2 minutos con la preparación del sustrato de la enzima HRP (*Pierce ECL 2 Western Blotting Substrate*, Thermo).

Transcurrido dicho tiempo, la membrana se colocó dentro de una funda de plástico evitando que se formasen burbujas en el interior y se eliminó el exceso de sustrato. La funda se introdujo entonces en el aparato detector de luminiscencia *Amersham Image 600* (GE Healthcare), cedido amablemente por la Dra. Pilar Bayona, que capta directamente las señales y las digitaliza sin necesidad de tener que usar películas fotográficas.

Todo este procedimiento se repitió para las distintas proteínas de interés y, además, en cada membrana con una proteína de expresión constitutiva para tener un control de carga y una referencia para la cuantificación. Debido a los pesos de las proteínas estudiadas se eligió como control la proteína α -Tubulina (≈ 55 kDa), una proteína del citoesqueleto abundante en todas las células.

Una vez hechos todos los revelados, sobre las imágenes digitalizadas obtenidas se analizaron las bandas correspondientes a las proteínas por densitometría con el software *Image J* (National Institutes of Health). De esta forma las señales obtenidas de las proteínas reveladas se pudieron cuantificar y comparar de forma más precisa respecto a los controles de carga.

Anticuerpo (clon)	Tipo, especie	Concentración	Proveedor, referencia
TRAIL (C92B9)	Monoclonal, conejo	1/1.000 y 1/500	Cell Signaling, 32195
FasL (D1N5E)	Monoclonal, conejo	1/1.000 y 1/500	Cell Signaling, 68405
granzima B (D2H2F)	Monoclonal, conejo	1/1.000	Cell Signaling, 17215
α -tubulina (B-5-1-2)	Monoclonal, ratón	1/10.000	Cell Signaling, 3873
IgG anti-conejo HRP	Monoclonal, ratón	1/20.000	Sigma, A9169
IgG anti-ratón HRP	Monoclonal, cabra	1/20.000	Sigma, A9044

Tabla 3.5. Información técnica y concentraciones de los anticuerpos empleados en los inmunoblots. IgG: inmunoglobulina de isotipo G. HRP: enzima peroxidasa de rábano.

3.7 MODELO ANIMAL DE MIELOMA MÚLTIPLE

Tras los resultados obtenidos *in vitro* con las células NK-92-CD16 y con las células CAR-NK-92-CD16, se decidió ensayar *in vivo* su acción en solitario y en combinación con el mAb daratumumab. Se utilizó un modelo de xenoinjerto del mieloma múltiple MM.1S transfectado con las proteínas GFP y luciferasa (MM.1S-GFP-Luc) en ratones inmunodeprimidos NSG (*NOD Scid gamma*). Estos ratones proceden de la estirpe NOD/ShiLtJ y tienen una doble mutación en el gen *Prkdc*, que impide la recombinación de los segmentos VDJ tanto en los linfocitos T como en los linfocitos B, así como en el gen *IL2rg*, de forma que la cadena γ del receptor de la IL-2 y de otras citoquinas no se expresa (Cao et al., 1995; Greiner et al., 1998; L D Shultz et al., 1995; Leonard D. Shultz et al., 2007). Como consecuencia de ello, estos ratones son extremadamente inmunodeficientes, al no tener ni linfocitos T ni linfocitos B maduros y tener la función de las células NK muy disminuida.

Previamente a las inoculaciones se comprobó que todas las células empleadas en este experimento estaban libres de micoplasmas. El día inicial del experimento 25 ratones NSG fueron inoculados con $5 \cdot 10^5$ células MM.1S-GFP-Luc de forma subcutánea en la región dorsal. Tras la inoculación los animales se dividieron en 5 grupos experimentales, cada uno de ellos incluyendo 5 individuos. Los animales estuvieron acomodados en las instalaciones del animalario del Centro de Investigación Biomédica de Aragón, en base a las recomendaciones europeas de ética en animales y con la autorización de la Comisión Ética de Experimentación Animal del centro de trabajo para el desarrollo de los protocolos planteados. Los ratones se mantuvieron en todo momento en condiciones estándar (RT media de 24 °C y ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas), libres de patógenos y alimentados con agua y comida *ad libitum* durante todo el desarrollo del experimento.

Los 5 grupos experimentales creados fueron: grupo control, grupo tratado con células NK-92-CD16, grupo tratado con células NK-92-CD16 y daratumumab, grupo tratado con células CAR-NK-92-CD16 y grupo tratado con células CAR-NK-92-CD16 y daratumumab. A partir de ahí, el esquema del experimento fue el siguiente (*Figura 3.5*): el día 16 tras la inyección de los tumores se administraron a cada ratón $5 \cdot 10^6$ células terapéuticas correspondientes a su grupo, excepto a los del control. La inoculación se realizó en 200 μ l de PBS de manera intravenosa a través de la vena caudal. En los grupos tratados también con daratumumab (50 μ g/ratón), éste se administró diluido en los 200 μ l de PBS junto a las células. En dicho volumen de PBS también se incluyó IL-2 para permitir la supervivencia temporal de las células terapéuticas. La cantidad de IL-2 se determinó de manera que, asumiendo que todos los ratones tuvieran una volemia de 2 ml, la IL-2 diluida en sangre quedara a una concentración de 100 UI/ml. El día 30 desde la inyección de las células tumorales se repitió la inoculación de las células terapéuticas (y de daratumumab si era el caso) siguiendo el mismo procedimiento.

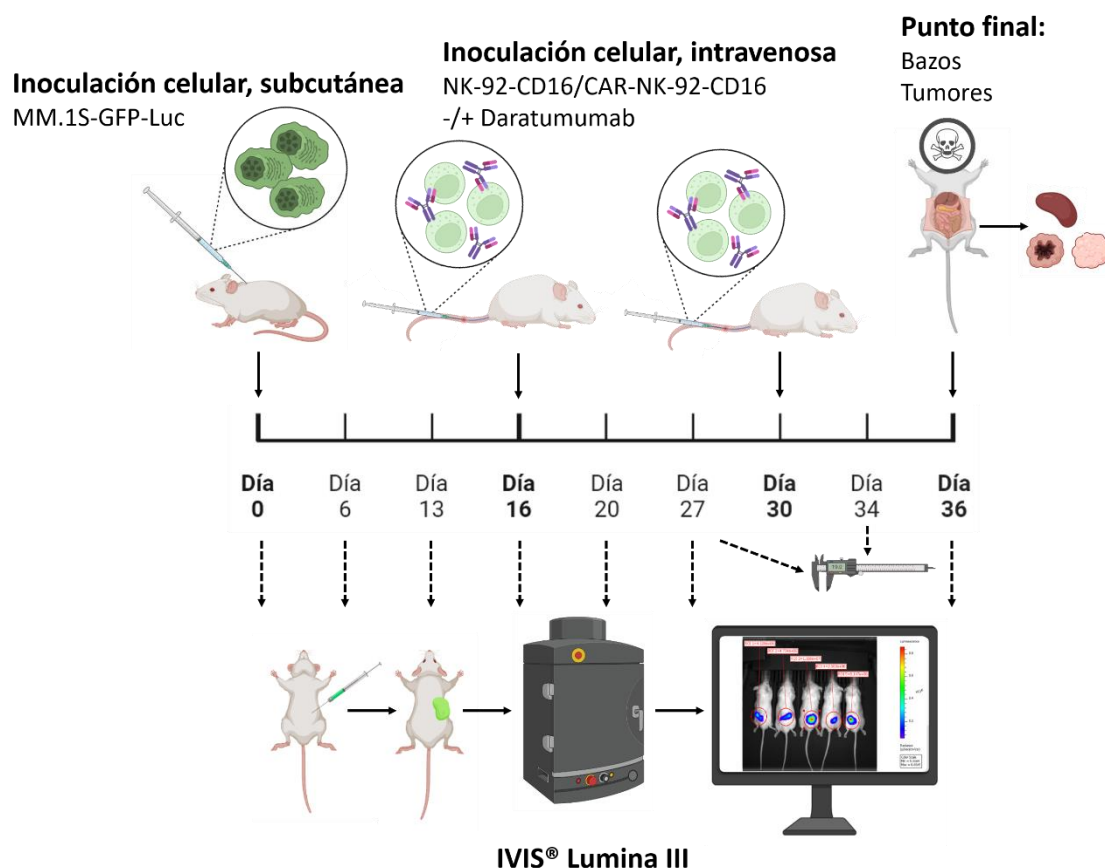


Figura 3.5. Esquema del experimento in vivo. En él se aprecia la secuencia de tiempo entre las distintas inoculaciones celulares (flechas continuas) para el desarrollo del modelo de mieloma animal. Las flechas discontinuas indican los días en los que se tomó imagen in vivo gracias al uso del IVIS® Lumina III, a excepción del día 34, que se realizó una medida con calibre. El punto final fue común para la mayoría de los ratones. Imagen realizada con la plataforma BioRender.

Para monitorizar el desarrollo de la enfermedad y el efecto ocasionado por la administración de las distintas células terapéuticas y daratumumab, se tomaron imágenes de la señal bioluminiscente emitida por las células MM.1S-GFP-Luc mediante el empleo del aparato IVIS® Lumina III. Se administraron intraperitonealmente 200 μ l de luciferina a 1 mg/ml a cada individuo antes de sedarlos mediante isoflurano y colocarlos dentro del aparato. Las imágenes se adquirieron los días 0 (5 horas después de la inoculación), 6, 13, 16, 20, 27 y 36 (previamente al sacrificio). Ante la imposibilidad de adquirirlas el día 34, alternativamente se midió ese día el volumen de los tumores con un calibre, que ya había sido usado el día 27.

Como criterios de punto final se establecieron la presencia de displasia abdominal, paraplejia, pérdida grave de peso o aparición de tumores extramedulares. Ante cualquier indicio de los eventos mencionados los individuos afectados serían sacrificados mediante el empleo de CO₂ o por dislocación cervical. Sin embargo, ante el incipiente riesgo de ulceración de los tumores en varios animales, se decidió terminar el experimento el día 36 sacrificando a todos los ratones que permanecían vivos.

Una vez sacrificados, se les extrajo el bazo y los tumores sólidos formados en el punto de inoculación y se recogieron en un tubo de fondo cónico de 15 ml con medio RPMI-1640 para su posterior análisis. Después, en una campana de flujo laminar, se depositaron los diferentes tejidos y órganos en placas de Petri estériles que contenían medio RPMI-1640. Los bazos y tumores sólidos se disgregaron con una jeringuilla estéril y se traspasaron a un tubo de fondo cónico de 15 ml a través de un tamiz celular de 70 μm (Corning, FisherScientific). Las placas de Petri se lavaron con medio RPMI-1640 y la solución resultante se pasó de nuevo por el tamiz para recoger todas las células disgregadas posibles.

Las distintas células recogidas se centrifugaron 5 minutos a 335 xg, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en tampón de lisis de eritrocitos (NH_4Cl 154 mM, KHCO_3 10 mM, y EDTA 0,1 mM, pH 7,4) para eliminar los eritrocitos presentes. Después de dejarlas incubar 10 minutos a RT, se centrifugaron 5 minutos a 300 xg y se eliminó el sobrenadante. Seguidamente se resuspendieron en un volumen apropiado de medio RPMI-1640 y se analizaron por citometría de flujo para determinar la cantidad de células tumorales y terapéuticas presentes en cada uno de los tejidos extraídos. La distinción entre ambos tipos celulares se hizo gracias a la fluorescencia de las proteínas GFP y ZsGreen, respectivamente. Aunque ambas proteínas emiten fluorescencia verde, la mayor intensidad de la proteína GFP permitió identificarlas inequívocamente. Cada bazo o tumor se analizó por triplicado.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La representación gráfica, interpretación y análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el programa *GraphPad Prism* v9.0.2 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Según el tipo de datos y el experimento, se realizó una de las siguientes pruebas estadísticas: *t test*, *multiple t test*, *Mann-Whitney test*, *Two-way ANOVA* o *Nested t test*.

Los resultados se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar (SD), y el grado de significancia se determinó en función de los siguientes valores:

- * si p-valor <0,05
- ** si p-valor <0,01
- *** si p-valor <0,001
- **** si p-valor <0,0001

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS LÍNEAS CELULARES DE MIELOMA MÚLTIPLE A LA APOPTOSIS EXTRÍNSECA Y A LA CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPO

Tal y como se ha explicado en la Introducción (ver apartado 1.3.2.1.3), las células asesinas naturales (*Natural Killer*, NK) pueden inducir la muerte de las células diana principalmente utilizando sus gránulos citotóxicos, a través de los ligandos de los receptores mortales (DRs, vía extrínseca de la apoptosis) y mediante la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Por lo tanto, antes de proceder a estudiar los mecanismos de apoptosis inducidos por las células NK, en solitario o en combinación con daratumumab, en las líneas celulares de mieloma múltiple (MM) humano, se caracterizó si éstas eran susceptibles a los ligandos de los DRs, también conocidos como ligandos mortales, y a la ADCC. La sensibilidad de las células de MM a las proteínas de los gránulos citotóxicos liberados no se consideró en este momento, dado que es un factor que depende fundamentalmente de las células NK.

Con respecto a la vía extrínseca de la apoptosis, los DRs de mayor relevancia son Fas, receptor de FasL (*Fas Ligand*), y DR4 y DR5, receptores de TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*). Para que cualquier célula sea sensible a la apoptosis por la vía extrínseca, es necesario que exprese en la membrana celular todos o alguno de esos receptores. Por lo tanto, se analizó por citometría de flujo si las líneas celulares de MM humano empleadas en esta tesis doctoral (MM.1S, NCI-H929 y RPMI 8226) expresaban estos DRs en la membrana plasmática.

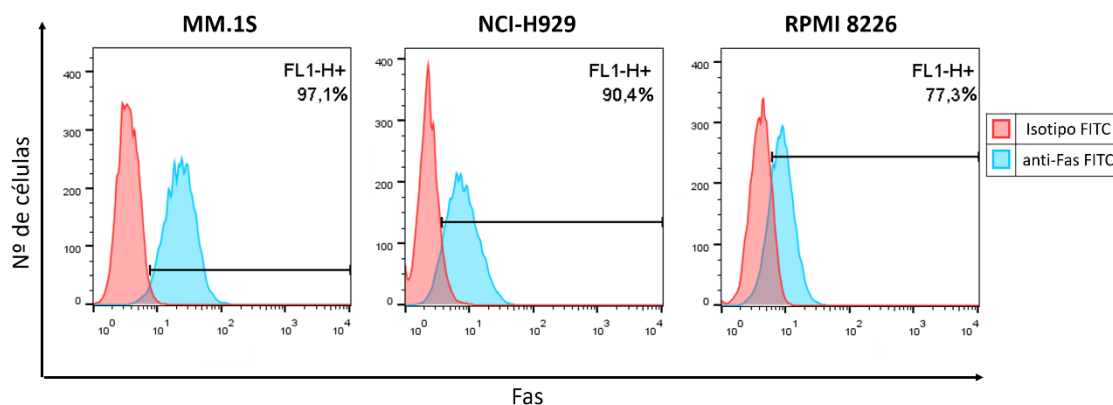


Figura 4.1. Expresión de Fas en la membrana plasmática de las líneas de MM. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y el eje de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. Los histogramas rojos muestran la distribución de la señal base de fluorescencia debida al control de isotipo. Los histogramas azules representan el marcaje con un anticuerpo monoclonal (mAb) específico anti-Fas en cada línea celular. Los porcentajes indican la fracción de la población de cada línea celular que se considera positiva. Histogramas representativos de un total de 2 experimentos.

En primer lugar, se comprobó que las tres líneas celulares de MM humano expresaban Fas, tal y como se recoge en la *Figura 4.1*. No obstante, se observó que la expresión no era homogénea entre ellas. Mientras que las líneas celulares MM.1S y NCI-H929 eran las que más expresaban este receptor, en casi la totalidad de sus poblaciones (97,1% y 90,4%, respectivamente), la línea RPMI 8226 expresaba Fas en menor medida, en torno a tres cuartas partes de su población (77,3%).

En segundo lugar, se analizó la expresión de DR4. Si bien es cierto que se detectó la proteína en la superficie de las tres líneas celulares, esta expresión fue en general menor que la de Fas. En la línea MM.1S, alrededor de la mitad de la población expresaba DR4 (51,4%), mientras que la expresión en la línea NCI-H929 fue todavía inferior (36,6%). En cambio, la línea RPMI 8226 fue la única que presentó una expresión relativamente alta (81,6%). Estos resultados pueden observarse en la *Figura 4.2*.

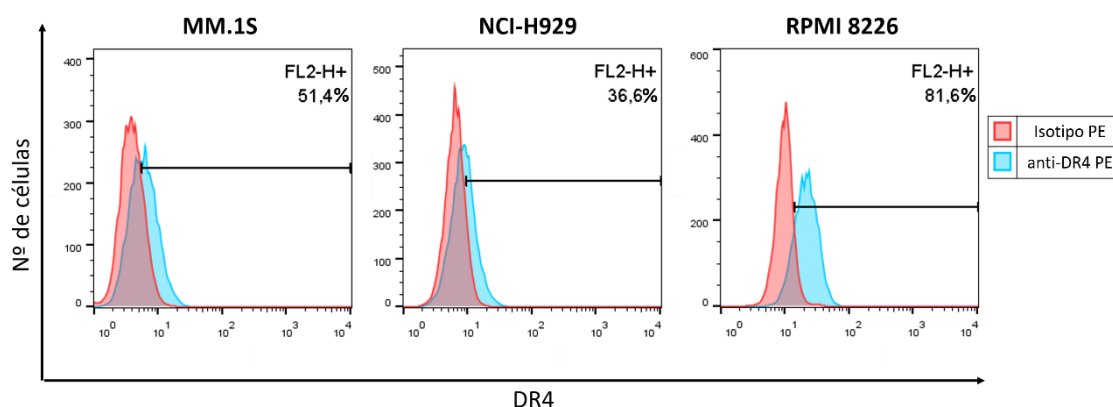


Figura 4.2. Expresión de DR4 en la membrana plasmática de las líneas de MM. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y el eje de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. Los histogramas rojos muestran la distribución de la señal base de fluorescencia debida al control de isotipo. Los histogramas azules representan el marcaje con un mAb específico anti-DR4 en cada línea celular. Los porcentajes indican la fracción de la población de cada línea celular que se considera positiva. Histogramas representativos de un total de 2 experimentos.

En tercer lugar, se estudió la expresión del otro receptor de TRAIL, DR5. A diferencia de DR4, en este caso las tres líneas celulares lo expresaron a mayor nivel. Además, tal y como se puede ver en la *Figura 4.3*, la expresión en las tres líneas fue bastante homogénea en esta ocasión. La línea celular RPMI 8226 presentó una mayor población positiva (96,2%), seguida de la línea MM.1S (90,4%) y de la línea NCI-H929 (87,1%), pero todas ellas en torno al mismo rango.

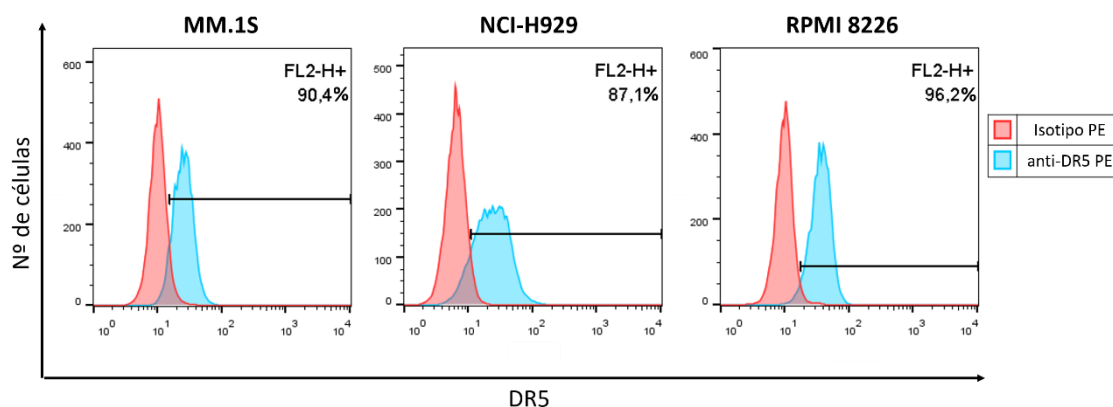


Figura 4.3. Expresión de DR5 en la membrana plasmática de las líneas celulares de MM. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y el eje de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. Los histogramas rojos muestran la distribución de la señal base de fluorescencia debida al control de isotipo. Los histogramas azules representan el marcaje con un mAb específico anti-DR5 en cada línea celular. Los porcentajes indican la fracción de la población de cada línea celular que se considera positiva. Histogramas representativos de un total de 2 experimentos.

Estos resultados concordaron en líneas generales con los obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación (Gómez-Benito et al., 2007; Jarauta et al., 2016). Tomándolos en conjunto (ver *Figura 4.1*, *Figura 4.2* y *Figura 4.3*), alrededor del 90% de la población celular de cada línea de MM presentó expresión de receptores para FasL y TRAIL (DR5, en este caso) y, por tanto, las tres eran potencialmente susceptibles a sus efectos.

Sin embargo, la expresión de sus respectivos receptores no es el único requisito para que los ligandos mortales puedan actuar. Dichos receptores podrían no ser funcionales. Por ejemplo, por alteraciones o mutaciones en ellos, en alguna de las proteínas encargadas en la transducción de la señal o en las proteínas inhibidoras. Para analizar esta contingencia, se hizo una prueba de sensibilidad a TRAIL, tanto a 4 como a 24 horas, utilizando una forma recombinante soluble de este ligando (sTRAIL) disponible en nuestro laboratorio.

Los resultados de dicha prueba se muestran en la *Figura 4.4*. En ella se puede ver cómo las líneas MM.1S y RPMI 8226 fueron sensibles a sTRAIL, especialmente tras 24 horas de incubación. Ambas líneas celulares, que tenían un nivel de expresión de DR5 muy parecido (90,4% vs 96,2%), presentaron una cantidad de células apoptóticas similar. En cambio, aunque prácticamente la misma fracción de la línea NCI-H929 expresaba DR5 (87,1%), estas células fueron resistentes a sTRAIL. A pesar de la inestabilidad genética de las líneas de MM, estos resultados fueron nuevamente concordantes en líneas generales con los obtenidos previamente en nuestro grupo de investigación (Gómez-Benito et al., 2007; Jarauta et al., 2016).

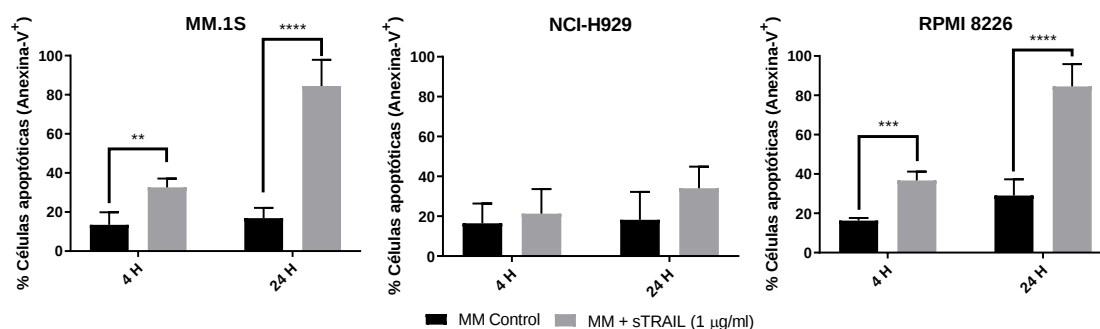


Figura 4.4. Sensibilidad de las líneas celulares de MM a TRAIL soluble (sTRAIL). Las células de MM se incubaron 4 y 24 horas con 1 µg/ml de sTRAIL. Posteriormente se determinó la apoptosis producida mediante un marcaje con anexina-V DY634 y análisis por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media ± desviación estándar (SD) de 3 experimentos diferentes. **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

Tras verificar la bioactividad de sTRAIL (y la de los receptores de TRAIL), se hizo lo mismo con la del anticuerpo RIK-2. RIK-2 es un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une a TRAIL y bloquea la apoptosis inducida por TRAIL. Para ello, se eligió a la línea celular MM.1S por ser una de las más sensibles a sTRAIL (ver Figura 4.4), y se incubó 24 horas con sTRAIL sólo o combinado con RIK-2.

En la Figura 4.5 se puede observar la eficacia del bloqueante, dado que inhibió por completo la muerte celular producida por sTRAIL. A su vez, el bloqueante por sí solo fue inocuo sobre las células.

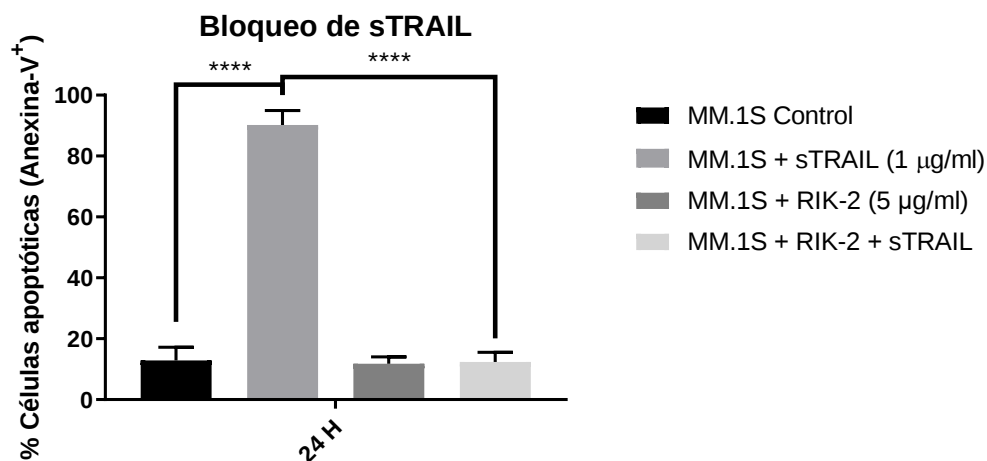


Figura 4.5. Efecto bloqueante de RIK-2 sobre sTRAIL. Las células MM.1S fueron incubadas 24 horas en presencia de 1 µg/ml de sTRAIL y/o 5 µg/ml de RIK-2. Posteriormente se determinó la apoptosis producida mediante un marcaje con anexina-V DY634 y análisis por citometría de flujo. El gráfico representa el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados mostrados son la media ± SD de 2 experimentos diferentes. ****p<0,0001

Por otro lado, para estudiar la ADCC inducida por el mAb anti-CD38 daratumumab, era un requisito indispensable que las células diana presentasen dicho antígeno. El análisis de la expresión de CD38 en la membrana por citometría de flujo mostró tres patrones de expresión distintos en las tres líneas de MM (*Figura 4.6*). Estas diferencias de nivel de expresión podrían influir en el grado de ADCC que sufriera cada línea celular.

El 99,9% de las células de la línea NCI-H929 fueron positivas para CD38, con un nivel de expresión muy elevado (Intensidad media de fluorescencia, MFI: 2958). Por su parte, la línea celular MM.1S fue mayoritariamente positiva (93,4%), aunque el nivel de expresión de CD38 fue menor (MFI: 432) y más heterogéneo que el de las células NCI-H929. Por último, la línea RPMI 8226 presentó una población con una menor expresión de CD38 (MFI: 276) y mucho más heterogénea, con una importante población negativa (alrededor de un tercio de células CD38⁺).

El resultado obtenido en las células RPMI 8226 no coincidió con artículos previos en los que se indica que la línea RPMI 8226 es una línea de MM con una elevada expresión de CD38 (Nijhof et al., 2016; Paíno et al., 2014). Esta diferencia podría deberse a una disminución de su expresión con el tiempo en cultivo debido a la inestabilidad genómica de las células RPMI 8226 (Díaz-Rodríguez et al., 2011). No obstante, la situación actual permitía disponer de tres líneas celulares de MM con un distinto nivel de expresión de CD38 en cada una de ellas y analizar como influye el nivel de expresión de CD38 sobre la ADCC inducida.

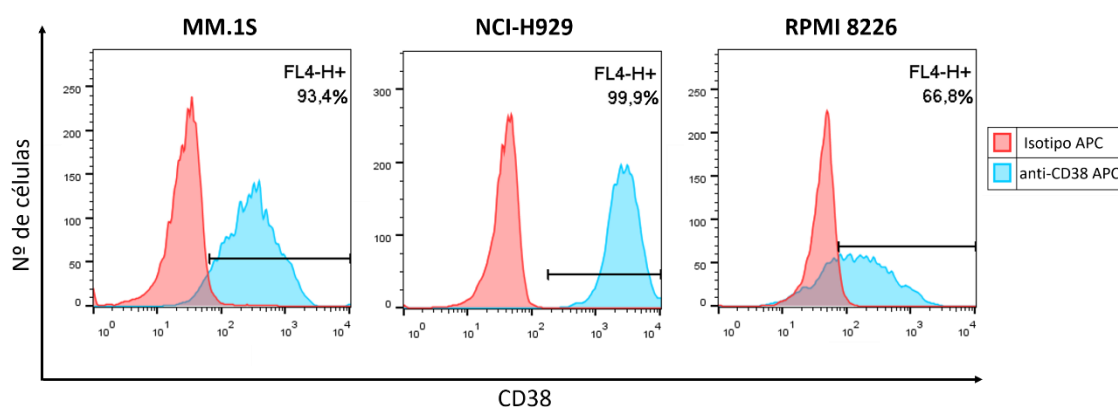


Figura 4.6. Expresión de CD38 en la membrana plasmática de las líneas de MM. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y el eje de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. Los histogramas rojos muestran la distribución de la señal base de fluorescencia debida al control de isotipo. Los histogramas azules representan el marcaje con un mAb específico anti-CD38 en cada línea celular. Los porcentajes indican la fracción de la población de cada línea celular que se considera positiva. Histogramas representativos de 4 experimentos diferentes.

4.2 ESTUDIO DEL MECANISMO DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR DARATUMUMAB (ANTI-CD38) EN COMBINACIÓN CON LAS CÉLULAS eNK SOBRE CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE

4.2.1 Obtención, activación y expansión de células eNK a partir de PBMCs

Se utilizaron células efectoras NK expandidas (eNK) para estudiar los mecanismos de inducción de muerte sobre células de MM. Dichas células eNK se obtuvieron a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donantes sanos, siguiendo el protocolo puesto a punto anteriormente por nuestro grupo de investigación (ver apartado 3.1.7 y apartado 3.1.7.1). En nuestro caso, la depleción de células CD3⁺ realizada al inicio de cada expansión fue parcial.

Tras determinar por citometría de flujo el porcentaje de células NK (CD56⁺) aisladas a partir de las PBMCs, éstas se sembraron a una densidad de $2 \cdot 10^6$ células totales/ml en medio RPMI-1640 completo, suplementado con 100 UI/ml de IL-2 y 25 UI/ml de IL-15. Para la activación se añadieron en co-cultivo células linfoblastoides 721.221 inactivadas en una proporción de 5-1 (eNK-721.221). Se usaron estas células como estimuladoras porque carecen de moléculas de HLA-I (*Human Leukocyte Antigen*), y así se evita cualquier señal inhibidora sobre las células NK, favoreciendo su activación.

Todas las expansiones se mantuvieron en cultivo entre 18 y 25 días. Cada 5 días se comprobó regularmente el crecimiento y viabilidad de las células por recuento con azul trypan y la proporción de células CD56⁺ por citometría de flujo. Tal y como se indica en Materiales y métodos (ver apartado 3.1.7.1), se aprovecharon esas manipulaciones periódicas para volver a sembrar las células eNK a la densidad inicial y renovar el medio de cultivo, las células estimuladoras y las citoquinas. En algunas de las expansiones, durante esas manipulaciones también se caracterizó la expresión de diversas proteínas en la membrana plasmática por citometría de flujo.

A lo largo de la tesis doctoral se llevaron a cabo un total de 12 expansiones de células eNK, cada una de ellas a partir de PBMCs de donantes distintos (PBMCs1-PBMCs12). Las mejores expansiones (ver Figura 4.7) se emplearon en diferentes experimentos de citotoxicidad, para ésta (ver Figura 4.12, Figura 4.13, Figura 4.14 y Figura 4.15) u otras investigaciones (Calvo et al., 2020).

La Figura 4.7A muestra el número de veces que las células eNK (CD56⁺) se expandieron a cada tiempo de incubación, normalizando por la cantidad de células eNK totales al inicio del cultivo. Se puede comprobar que, en aquellos casos exitosos, el protocolo de expansión utilizado permitió obtener una gran cantidad de células con un crecimiento de tipo exponencial (por ejemplo, las expansiones PBMCs1, PBMCs4, PBMCs6 y PBMCs10). Las expansiones comenzaron a hacerse evidentes en la mayoría de los casos entre los días 10 y 15, aunque existió cierta variabilidad, y algunas se prolongaron hasta los días 22-23 de expansión.

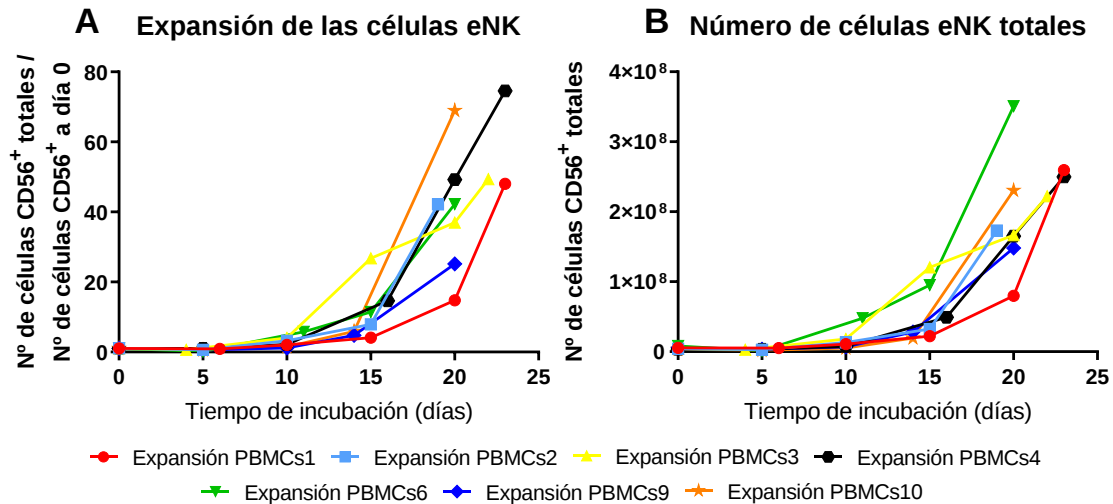


Figura 4.7. Expansión de las células eNK. A) Ratio de expansión de las células CD56⁺ (eNK) en los cultivos de las PBMCs durante el período de expansión in vitro de las mismas. Los resultados se representan como el número de veces que se han expandido las células eNK a cada tiempo respecto a la cantidad de células eNK puestas en cultivo inicialmente el día 0. B) Crecimiento de las células CD56⁺ (eNK) durante las expansiones in vitro. Los resultados se representan como el número cumulativo de células eNK que se habría obtenido en cada expansión a cada tiempo si éstas no se hubieran diluido durante su mantenimiento.

Considerando únicamente las expansiones exitosas, la media de la tasa de expansión fue de 50 veces, con un máximo de 75 veces en el caso de la expansión PBMCs4 (*Figura 4.7A*). Es probable que si todas las expansiones se hubieran mantenido hasta los días 22-23, las cifras hubieran sido mayores, pero en muchos casos se agotaron los cultivos para hacer experimentos entre los días 19-20. Por otra parte, si las depleciones de células CD3⁺ hubieran sido completas, ese factor seguramente también habría favorecido el proceso.

Con respecto al número de células eNK totales conseguidas gracias a las expansiones (*Figura 4.7B*), la media a día 20 fue de $1,9 \cdot 10^8$ células, mientras que en el punto de máximo tiempo (días 22-23) la media fue de $2,4 \cdot 10^8$ células. En otro trabajo de nuestro grupo de investigación con el mismo protocolo se alcanzó una media en el punto de máximo tiempo en torno a $2,5 \cdot 10^8$ de células, por lo que los resultados son bastante similares entre sí en ese sentido (Reina-Ortiz et al., 2020).

4.2.2 Caracterización de las células eNK expandidas y activadas

Como ya se ha comentado en el anterior apartado, se caracterizó por citometría de flujo la expresión en la membrana plasmática de diversas proteínas relevantes. Dependiendo de la evolución de los cultivos, se analizó la expresión de una u otra proteína.

Una de las proteínas estudiadas fue PD-1 (*Programmed cell Death protein 1*), que puede expresarse en la superficie de células efectoras tales como las células NK y cuya actividad regula

un importante punto de control inmunitario. La potencial aplicación terapéutica de las células eNK podría verse afectada si éstas expresaran PD-1, inhibiéndose su respuesta funcional en caso de que las células de MM expresasen a su vez el ligando PD-L1 (*Programmed Death-Ligand 1*). La *Figura 4.8* muestra dos ejemplos ilustrativos del marcaje de PD-1 en la membrana plasmática de dos expansiones distintas de células eNK. En ella se puede ver cómo el porcentaje de células que expresan PD-1 en membrana al final del proceso de activación y expansión fue muy pequeño (11% y 8,7%, respectivamente). Este hecho garantiza que las células eNK generadas según este protocolo no reciban señalización inhibitoria, aunque las células diana pudieran expresar PD-L1. Estos resultados coinciden con otros obtenidos siguiendo el mismo protocolo de expansión (Calvo et al., 2020; Reina-Ortiz et al., 2020; Sánchez-Martínez et al., 2018).

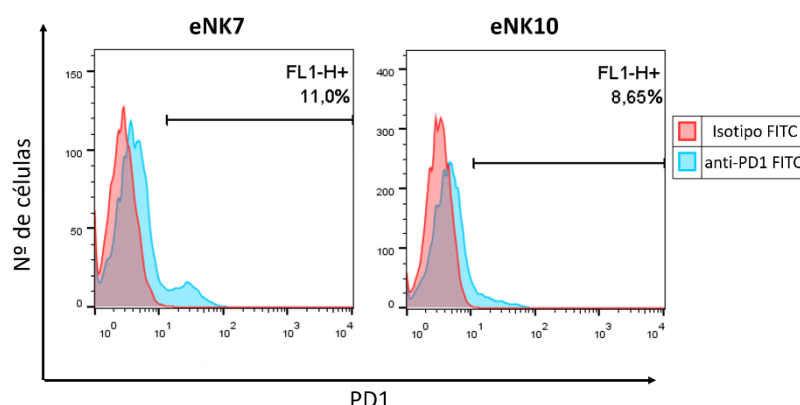


Figura 4.8. Expresión de PD-1 en la membrana plasmática de las células eNK. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y el eje de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. Los histogramas rojos muestran la distribución de la señal base de fluorescencia debida al control de isotipo. Los histogramas azules representan el marcaje con un mAb específico anti-PD1 en cada una de las expansiones. Los porcentajes indican la fracción de la población de cada expansión de células eNK que se considera positiva. Dichos valores se establecieron tomando como punto de corte una intensidad de fluorescencia a la que el isotipo tuviera menos de 1% de señal positiva. Histogramas representativos de 2 experimentos diferentes.

Anteriormente ya se había comprobado que las líneas de MM expresaban DRs (ver apartado 4.1). No obstante, para inducir muerte celular a través de ellos era preciso que las células eNK expresaran FasL y TRAIL. En la *Figura 4.9* se muestran dos ejemplos ilustrativos de los resultados del marcaje en membrana de ambos ligandos mortales en distintas expansiones de células eNK. En ella puede observarse que la expresión de FasL en la membrana fue relativamente baja, y además, variable en las distintas expansiones (*Figura 4.9A*, 70,3% y 36,2%, respectivamente). En cambio, no se detectó ninguna señal de TRAIL en membrana ya que en todos los casos analizados el control de isotipo dio más señal que el propio anticuerpo anti-TRAIL (*Figura 4.9B*).

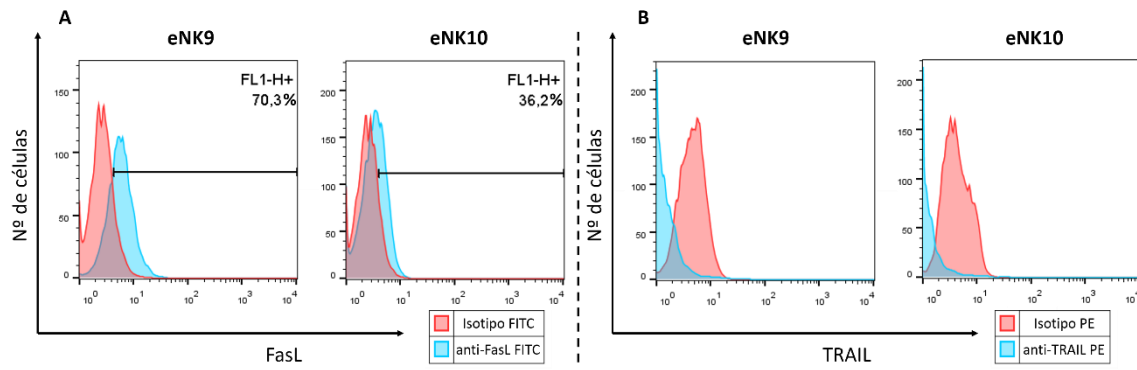


Figura 4.9. Expresión de los ligandos mortales en la membrana plasmática de las células eNK. A) Expresión de FasL. B) Expresión de TRAIL. Los ejes de abscisas representan la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y los ejes de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. Los histogramas rojos muestran la distribución de la señal base de fluorescencia debida al control de isotipo. Los histogramas azules representan en cada expansión el nivel de expresión de cada ligando con un mAb específico anti-FasL y otro mAb específico anti-TRAIL, respectivamente. Los porcentajes indican la fracción de la población de cada expansión que se considera positiva. Histogramas representativos de 2 experimentos diferentes.

FasL y TRAIL también pueden ser secretados insertados en la membrana de exosomas al activarse los linfocitos T (Martínez-Lorenzo et al., 1999), y esto también se ha descrito en el caso de células NK humanas (Lugini et al., 2012). Por ello, se decidió estudiar también la expresión intracelular de estos ligandos mortales. En la *Figura 4.10* se encuentran los resultados del análisis de una de las expansiones de células eNK mediante *Western Blotting*, en la que se detectaron ambas proteínas.

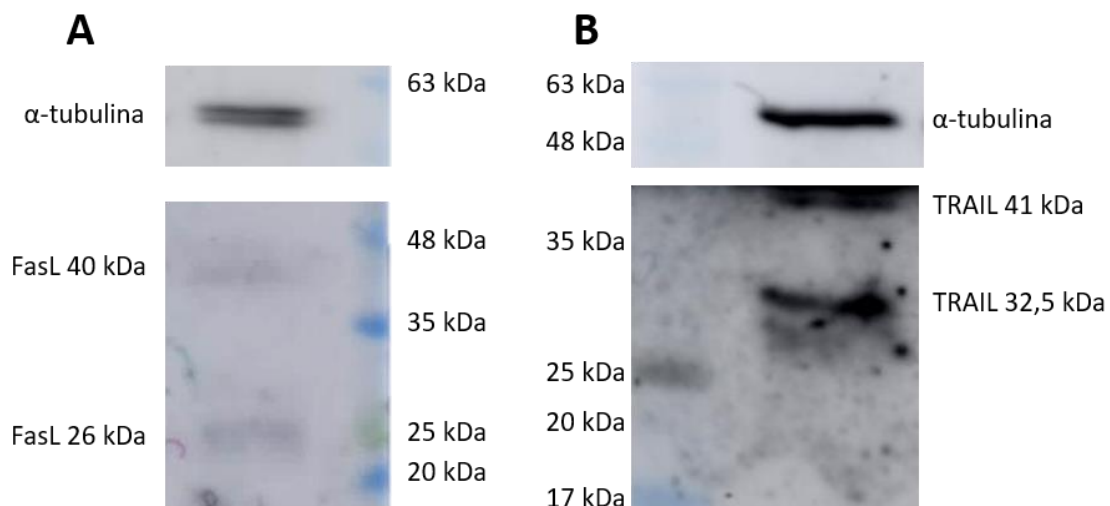


Figura 4.10. Expresión de los ligandos mortales en las células eNK. A) FasL. B) TRAIL. El lisado resultante de $5 \cdot 10^6$ células eNK se analizó por SDS-PAGE y Western Blotting, utilizando los anticuerpos anti-FasL o anti-TRAIL correspondientes. Como control de carga se utilizó α -tubulina. Imágenes representativas de 3 experimentos diferentes.

En la *Figura 4.10A* se puede observar de manera tenue tanto la forma transmembrana glicosilada de FasL (40 kDa) como la forma soluble (26 kDa) (Kayagaki et al., 1995; Nagata, 1997; Tanaka et al., 1995). Por otra parte, sí se detectó la presencia de TRAIL intracelular, tanto el polipéptido de 32,5 kDa como la forma madura glicosilada de 41 kDa (Martínez-Lorenzo et al., 1998, 1999). Por lo tanto, las células eNK generadas expresan FasL y TRAIL intracelularmente, aunque su nivel de expresión en membrana sea bajo. Hay que tener presente también que el nivel de expresión podría variar entre expansiones.

Conocer la expresión de CD38 en la membrana plasmática de las células eNK también se consideró importante, ya que se trata de la diana de daratumumab y se iban a utilizar combinadas con dicho mAb. En la *Figura 4.11* se muestra un ejemplo del marcaje de varias de las expansiones realizadas. Aunque el nivel de expresión fue variable en cada expansión (desde un 58,9% de las células eNK4 a un 96,4% en el caso de las células eNK6), se podría decir que CD38 se expresaba de manera general, al igual que en las células NK normales (An et al., 2018; Krejcik et al., 2016). Esta expresión de CD38 en las células eNK podría inducir su fratricidio, como se ha descrito para las NK autólogas en varios artículos (Mahaweni et al., 2018; Wang et al., 2018).

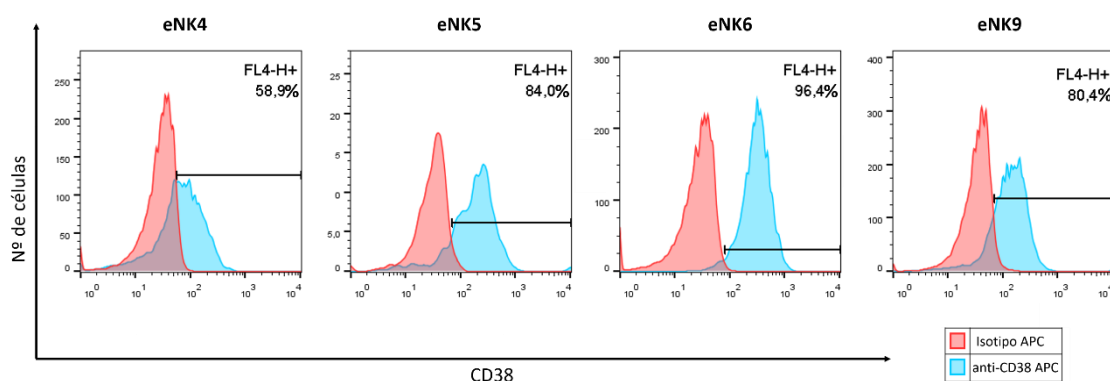
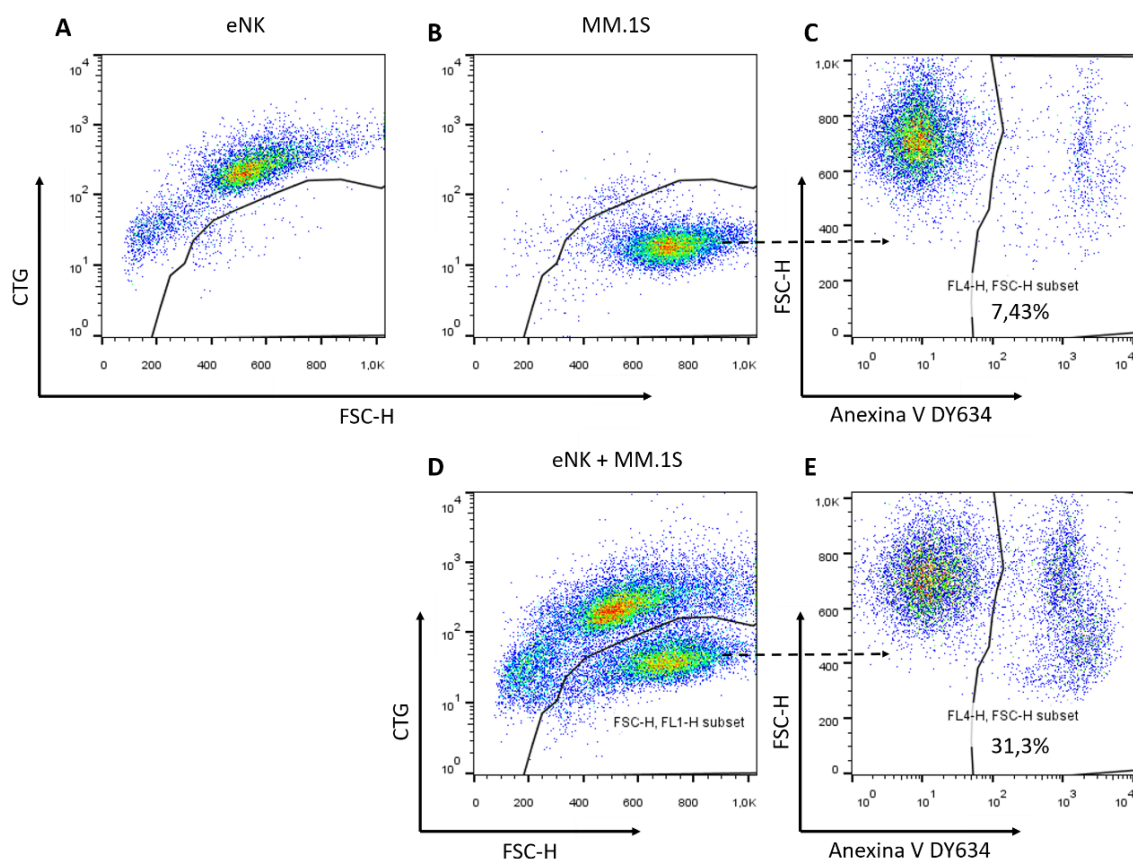


Figura 4.11. Expresión de CD38 en la membrana plasmática de las células eNK. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y el eje de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. Los histogramas rojos muestran la distribución de la señal base de fluorescencia debida al control de isotipo. Los histogramas azules representan el marcaje con un mAb específico anti-CD38 en cada expansión de células eNK. Los porcentajes indican la fracción de la población de cada expansión que se considera positiva. Histogramas representativos de 2 experimentos distintos.

4.2.3 Actividad citotóxica de las células eNK sobre líneas celulares de mieloma múltiple

En torno al día 18 de expansión, las células NK se consideraron lo suficientemente activadas (células eNK) como para poder utilizarse como efectoras en los experimentos de citotoxicidad contra las células de MM. Dado que la pureza de las células eNK en el cultivo no llegaba al 100% (presencia de otras PBMCs, especialmente células CD3⁺), se realizó primero un enriquecimiento mediante selección inmunomagnética.

Seguidamente, para distinguir a las células eNK de las células de MM a lo largo de los experimentos, se marcaron las primeras con la sonda intracelular fluorescente CTG (*CellTracker™ Green*). En la *Figura 4.12A* se muestra un ejemplo ilustrativo de la citometría de flujo del marcaje obtenido, así como la de las células de MM no marcadas (*Figura 4.12B*) y la distinción de ambas poblaciones una vez co-incubadas para analizar la citotoxicidad (*Figura 4.12D*).



*Figura 4.12. Esquema del análisis por citometría de flujo de la citotoxicidad producida por las células eNK sobre las células de MM. Se muestran como ejemplo las células MM.1S. En (A) se muestran las células eNK en solitario, marcadas con la sonda fluorescente CTG (*CellTracker™ Green*, 0,5 μ M) frente al tamaño celular (FSC-H). Las células diana MM.1S (sin marcar) se muestran de la misma forma en (B). La cantidad basal de células apoptóticas de esta población se evaluó mediante el análisis de la exposición de fosfatidilserina (PS) por marcaje con anexina-V DY634 (C). Ambas poblaciones se mezclaron en un ratio 1-1 (efector-diana) y se co-incubaron durante 4 horas. Finalizado ese tiempo, el marcaje con CTG permitió distinguir entre las células eNK y MM.1S (D). Por último, para determinar la apoptosis producida en las células MM.1S, se delimitó la región de células negativas para la sonda fluorescente CTG y se analizó el porcentaje de células MM.1S anexina-V DY634⁺ (E).*

Para estudiar la relevancia de los distintos mecanismos de muerte celular inducidos por las células eNK, éstas se co-incubaron durante 4 horas con las líneas celulares de MM. Los experimentos se realizaron a distintas condiciones de ratio efector-diana (eNK-MM), tanto en ausencia como en presencia de reactivos bloqueantes de los principales mecanismos citotóxicos de las células eNK.

Como bloqueantes de los ligandos mortales se utilizaron RIK-2 (mAb anti-TRAIL, 5 µg/ml) y Fas-Fc (un receptor quimérico soluble de FasL, 20 ng/ml). Para bloquear la liberación de los gránulos citotóxicos se empleó 1 mM de EGTA (*ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*), un quelante específico de Ca^{2+} , ión necesario para los cambios en el citoesqueleto necesarios para la secreción.

Los resultados obtenidos, evaluando la citotoxicidad durante 4 horas sobre las células MM.1S (*Figura 4.13*), indicaron que la presencia de los distintos bloqueantes por sí solos no afectaba a la viabilidad de los controles (entre un 10% y un 13% de media de células muertas, en todos los casos). En segundo lugar, se observó que las células eNK en solitario produjeron una considerable citotoxicidad en ese corto período de tiempo, con un 37% de media de células MM.1S muertas a ratio 1-1, valor que se vio aumentado hasta un 62% de media a un ratio efector-diana 3-1. La muerte producida se incrementó todavía más en presencia de 5 µg/ml de daratumumab (55% y 74% de células muertas, respectivamente), demostrando la efectiva activación del mecanismo de ADCC. Cabe señalar que daratumumab por sí solo no tuvo ningún efecto. En este caso, la muerte celular a ratio 3-1 también fue mayor que a ratio 1-1.

Con respecto a los bloqueantes, se puede ver que cuando EGTA estuvo presente en la incubación, la muerte celular se inhibió considerablemente, aunque no por completo (hasta un 23% de muerte celular, en el mejor de los casos). En cambio, el efecto de los bloqueantes de los ligandos mortales fue más sutil. Se pudo apreciar sobre todo a ratio 3-1, donde la muerte celular se redujo hasta alrededor del 52% comparado con el 62% observado en su respectivo control. La combinación de los bloqueantes de ambas rutas aumentó la inhibición respecto a la que produjeron Fas-Fc y RIK-2 en solitario, pero el resultado fue básicamente similar al obtenido al usar sólo EGTA.

Por lo tanto, en el caso de la línea celular MM.1S, el principal mecanismo citotóxico de las células eNK fueron sus gránulos citotóxicos, dado que EGTA producía la mayor inhibición y de que su combinación con Fas-Fc y RIK-2 no mejoraba significativamente su efecto en solitario. Aun así, existe una cierta contribución de los ligandos mortales.

A pesar de que el tratamiento con EGTA inhibía significativamente la citotoxicidad, esta inhibición debida a los bloqueantes era menos eficaz cuando la muerte tenía lugar vía ADCC en presencia de daratumumab. Es decir, la ADCC potenciaba la citotoxicidad, y esencialmente la degranulación, ya que EGTA seguía bloqueando parcialmente, pero en estas condiciones RIK-2 y Fas-Fc no eran eficaces. Esto significaba probablemente que la ADCC potenciaba la apoptosis inducida por la degranulación.

Otro aspecto a resaltar es la existencia de una cierta variabilidad entre los resultados obtenidos con cada expansión de células eNK. Este hecho es congruente con las peculiaridades genéticas de cada donante. Esta variabilidad no sólo afectaba al nivel de muerte celular producida, sino también a la dependencia relativa de los diferentes mecanismos citotóxicos. Por ejemplo, en estos experimentos se usaron las células eNK9, en las que no había efecto de los bloqueantes de los ligandos mortales. En cambio, con las células eNK1 y eNK6 sí que se apreció algo de efecto de los ligandos, sobre todo a ratio 3-1. Por lo tanto, la implicación en menor o mayor medida de esta ruta dependería del armamento característico de las diferentes células eNK expandidas.

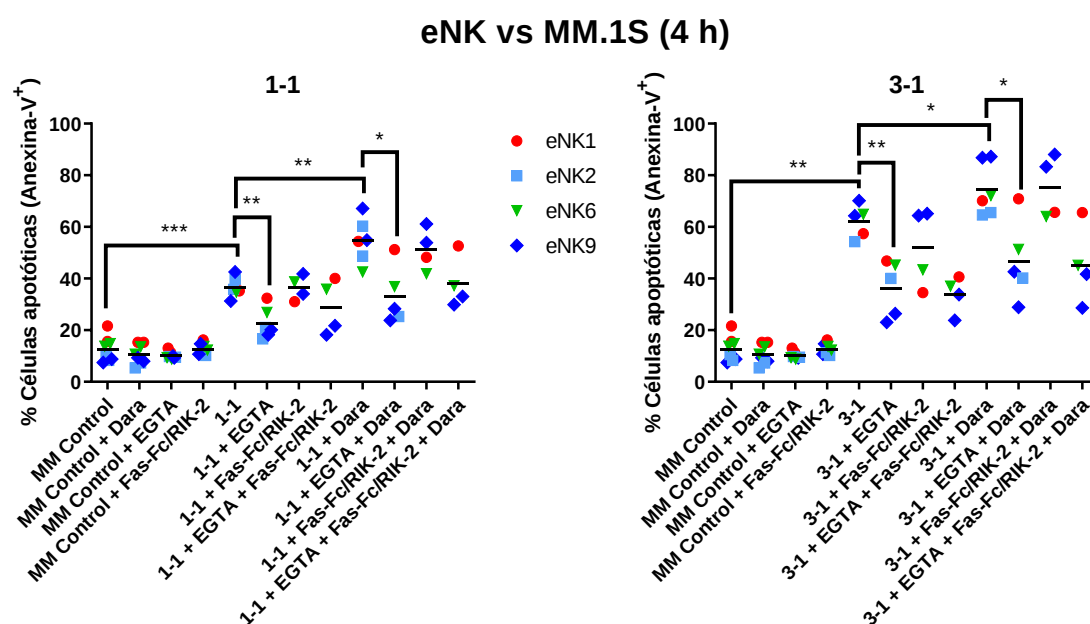


Figura 4.13. Citotoxicidad de las células eNK durante 4 horas sobre la línea celular MM.1S. Las células eNK fueron marcadas con la sonda fluorescente CTG (0,5 μ M) y preincubadas durante 1 hora con los distintos agentes bloqueantes. Las células de MM se preincubaron 15 minutos con daratumumab (Dara, 5 μ g/ml) en los casos indicados. Tras co-incubar las células durante 4 horas a diferentes ratios efector-diana y en presencia o ausencia de agentes bloqueantes, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como valores individuales de cada experimento indicando la media global de cada uno de los grupos de valores. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Los resultados fueron distintos a los anteriores en las células NCI-H929 (*Figura 4.14*). En este caso las células eNK apenas tuvieron efecto citotóxico en solitario, con una media de muerte inducida de 11-12% a ratio 1-1 y de 15-16% a ratio 3-1. Esto no se debía a que las expansiones de células eNK no fueran activas, ya que se emplearon dos expansiones (eNK1 y eNK9) previamente utilizadas en los experimentos con la línea MM.1S, en la que ejercieron una elevada citotoxicidad a ratio 3-1 (*ver Figura 4.13*). De hecho, la expansión eNK9 fue la más citotóxica sobre la línea MM.1S.

Se descartó asimismo que este hecho pudiera deberse a una inhibición de las células eNK por la expresión de PD-L1 en las células diana ya que se comprobó que las células eNK apenas expresaban el receptor PD-1 (*ver Figura 4.8*). Por lo tanto, ese menor efecto citotóxico de base podría tratarse de una diferencia en el patrón de expresión de ligandos inhibidores y activadores entre las líneas celulares de MM. De acuerdo con la información bibliográfica disponible, una posibilidad sería que las células NCI-H929 expresasen menor cantidad de MIC-A/MIC-B (*MHC class I polypeptide-related sequence A/B*) que otras líneas de MM (Swift et al., 2012).

En cambio, se observó un considerable incremento de la muerte celular en presencia de 5 µg/ml de daratumumab (42% y 60% de media de células muertas a ratios 1-1 y 3-1 respectivamente, con máximos de 84% a ratio 3-1). Este aumento de la muerte celular se produjo probablemente gracias a la ADCC ejercida por las células eNK ya que daratumumab por sí solo no tuvo ningún efecto. El efecto de la ADCC fue mucho más evidente en las células NCI-H929 que en el caso de las células MM.1S. Este resultado es congruente con la mayor expresión de CD38 en la línea NCI-H929 (*ver Figura 4.6*).

Con respecto a los bloqueantes, se pudo ver que sólo EGTA redujo la muerte celular producida por la ADCC prácticamente al nivel de los controles. El hecho de que los bloqueantes de los ligandos mortales no tuvieran un efecto significativo concuerda con los resultados previos de sensibilidad de la línea NCI-H929 a sTRAIL (*ver Figura 4.4*). En conclusión, la citotoxicidad de las células eNK sobre la línea NCI-H929 se producía de forma casi exclusiva por la ruta de degranulación.

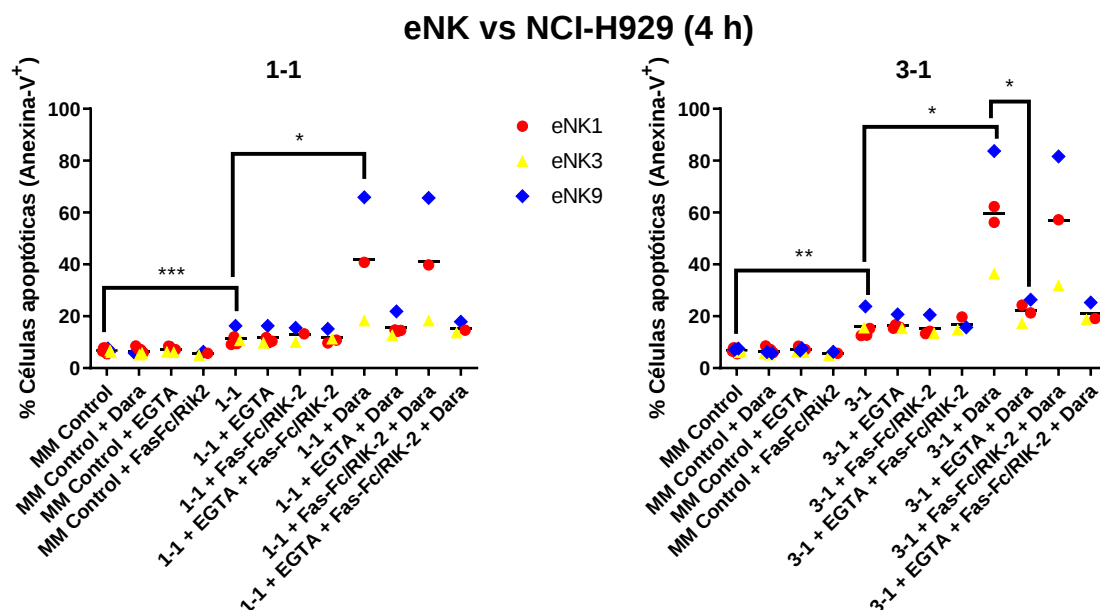


Figura 4.14. Citotoxicidad de las células eNK durante 4 horas sobre la línea celular NCI-H929. Las células eNK fueron marcadas con la sonda fluorescente CTG (0,5 μ M) y preincubadas durante 1 hora con los distintos agentes bloqueantes. Las células de MM se preincubaron 15 minutos con daratumumab (Dara, 5 μ g/ml) en los casos indicados. Tras co-incubar las células durante 4 horas a diferentes ratios efector-diana y en presencia o ausencia de agentes bloqueantes, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como los valores individuales de cada experimento, indicando también la media correspondiente de cada grupo de valores. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Por otro lado, los resultados de los ensayos de citotoxicidad sobre la línea RPMI 8226 también presentaron diferencias con los de las líneas anteriores. El perfil de citotoxicidad de las células eNK en solitario se asemejó al observado en la línea MM.1S (ver Figura 4.13), con una tasa de muerte celular promedio de 32% a ratio 1-1 y de 58% a ratio 3-1. No se apreció ningún efecto potenciador de la ADCC en presencia de daratumumab.

Este hecho podría explicarse por dos motivos. Por un lado, la línea celular RPMI 8226 fue la que menor nivel de expresión de CD38 mostró tanto en porcentaje de células como en intensidad de fluorescencia (ver Figura 4.6). Por otro lado, se observó que las células eNK podían llegar a expresar más CD38 que la línea celular RPMI 8226, como fue el caso de las células eNK6 (94% CD38⁺ y MFI: 349, ver Figura 4.11), utilizadas en este experimento. Por lo tanto, a pesar de preincubar con daratumumab las células diana, las células eNK con mayor expresión de CD38 podrían matarse entre ellas mismas por fratricidio. De hecho, existen antecedentes acerca del fratricidio inducido por daratumumab entre células NK (Mahaweni et al., 2018; Wang et al., 2018).

Por lo que se refiere al efecto de los bloqueantes, de nuevo EGTA inhibió casi por completo la muerte celular producida, reduciendo la media hasta un 16% a ratio 1-1 y a un 23%

a ratio 3-1 en ausencia del anticuerpo. En presencia de daratumumab el efecto fue prácticamente el mismo (18% y 25%), ya que su presencia afectaba poco a la muerte celular. En las células RPMI 8226, así como en las células MM.1S (ambas sensibles a sTRAIL, ver Figura 4.4), sí se apreció un cierto efecto de los bloqueantes de los ligandos mortales. En ausencia de anticuerpo, a ratio 1-1 se redujo la media de muerte celular de 32% a 25%, y cuando daratumumab estuvo presente, a ratio 3-1 la redujeron de 54% a 48%. Nuevamente, la combinación de todos ellos no consiguió reducir los valores por debajo de los conseguidos por EGTA en solitario. Por ello, se podría concluir que en las células RPMI 8226 participan las dos rutas citotóxicas de las células eNK, aunque predomina mayoritariamente la de los gránulos citotóxicos.

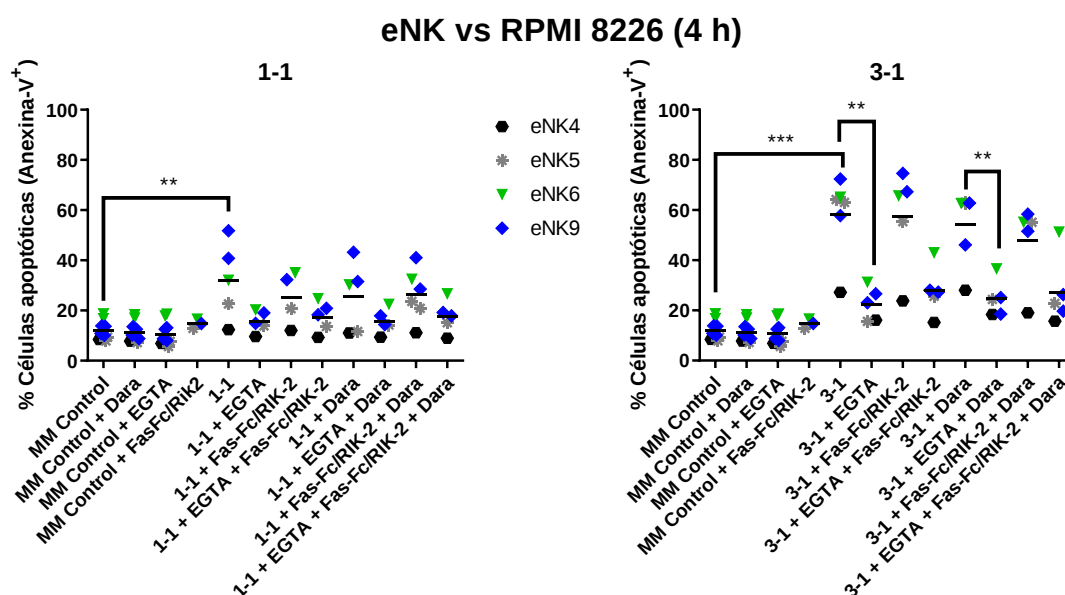


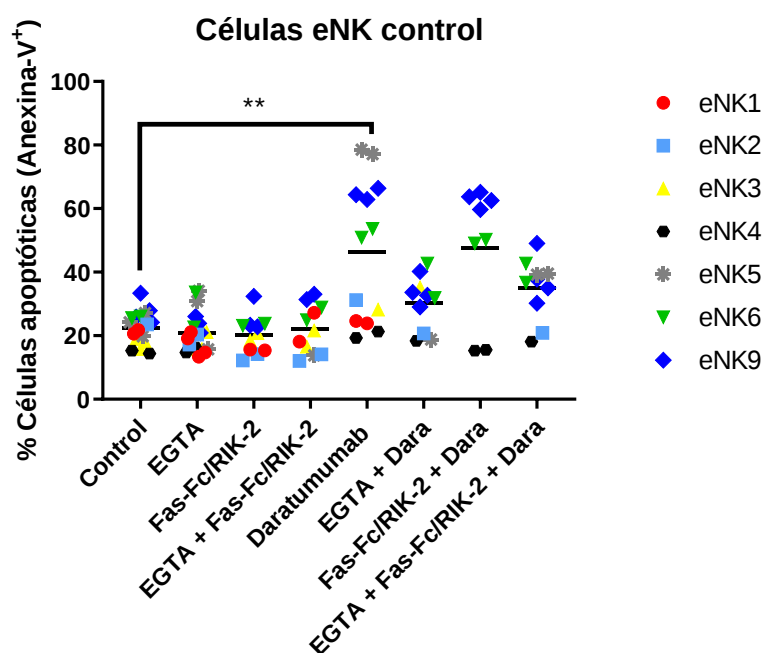
Figura 4.15. Citotoxicidad de las células eNK durante 4 horas sobre la línea celular RPMI 8226. Las células eNK fueron marcadas con la sonda fluorescente CTG (0,5 μ M) y preincubadas durante 1 hora con los distintos agentes bloqueantes. Las células de MM se preincubaron 15 minutos con daratumumab (Dara, 5 μ g/ml) en los casos indicados. Tras co-incubar las células durante 4 horas a diferentes ratios efector-diana y en presencia o ausencia de agentes bloqueantes, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como los valores individuales de cada experimento, indicando también la media correspondiente de cada grupo de valores. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Los controles establecidos en los experimentos con las tres líneas celulares demostraron que ninguno de los bloqueantes ni daratumumab en solitario ejercieron ningún efecto tóxico significativo sobre las células de MM. Asimismo, en cada uno de los experimentos mencionados se realizaron controles utilizando solamente las correspondientes células eNK (Figura 4.16). En estos controles las células eNK fueron tratadas de la misma forma que en los experimentos precedentes, pero en ausencia de células tumorales.

Tal y como puede observarse en la *Figura 4.16*, al igual que ocurría con las líneas de MM, los bloqueantes no produjeron ningún efecto tóxico sobre las células eNK. Por ello, se puede asumir que la menor muerte celular inducida por las células eNK sobre células de MM en presencia de agentes bloqueantes se debe al bloqueo de la ruta correspondiente y no a la reducción de viabilidad de las células eNK.

Sin embargo, como las células eNK expresan CD38 (ver *Figura 4.11*), daratumumab sí tuvo efecto citotóxico sobre ellas ya que inducía ADCC de forma fratricida. La cuantía de este fratricidio es considerable, superando en varios casos el 50% de muerte celular, pero conviene recordar que las células eNK de estos controles no se co-incubaron con células de MM. En cambio, en los anteriores experimentos de citotoxicidad sobre las líneas de MM, éstas fueron pretratadas con daratumumab para reducir el posible fratricidio por ADCC, como así parecen indicar los resultados. Aun así, en el caso de las células RPMI 8226 quizá esto no se consiguió y se produjo el fratricidio.

Se puede concluir también que el principal mecanismo citotóxico de este fratricidio fue la degranulación, ya que se inhibió en presencia de EGTA y no se observó ningún efecto de los bloqueantes de los ligandos mortales.



*Figura 4.16. Efecto de los distintos reactivos bloqueantes y daratumumab sobre las células eNK durante 4 horas. Las células eNK fueron marcadas con la sonda fluorescente CTG (0,5 μ M) y preincubadas durante 1 hora con los distintos bloqueantes. Después, se añadió daratumumab (Dara, 5 μ g/ml) en los casos indicados, y se incubaron durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, se determinó la apoptosis producida analizando la exposición de PS por citometría de flujo. La gráfica muestra el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como los valores individuales de cada experimento y la media correspondiente de cada grupo de valores. ** $p < 0,01$.*

Existe alguna evidencia de que las células NK son capaces de realizar trogocitosis (extracción de parches de membrana procedentes de la membrana plasmática de la célula con la que interactúan; literalmente, “comer a bocados”) con sus células diana durante el establecimiento de la sinapsis inmunitaria (Caumartin et al., 2007; Cho et al., 2014; Krzywinska et al., 2015). Por ello, se realizaron otros ensayos independientes para comprobar si las células eNK generadas mediante nuestro protocolo de activación y expansión también realizaban trogocitosis.

Como molécula de membrana a monitorizar se eligió CD38, y dado que la línea celular NCI-H929 era la que más la expresaba, se escogió como célula diana. Para el experimento, las células eNK se marcaron con la sonda fluorescente CTG, y se analizó en una alícuota el nivel de expresión inicial de CD38 por citometría de flujo (*ver apartado 3.5.2*). El resto de células eNK se co-incubaron durante 4 horas con las células diana en ausencia de bloqueantes y de daratumumab.

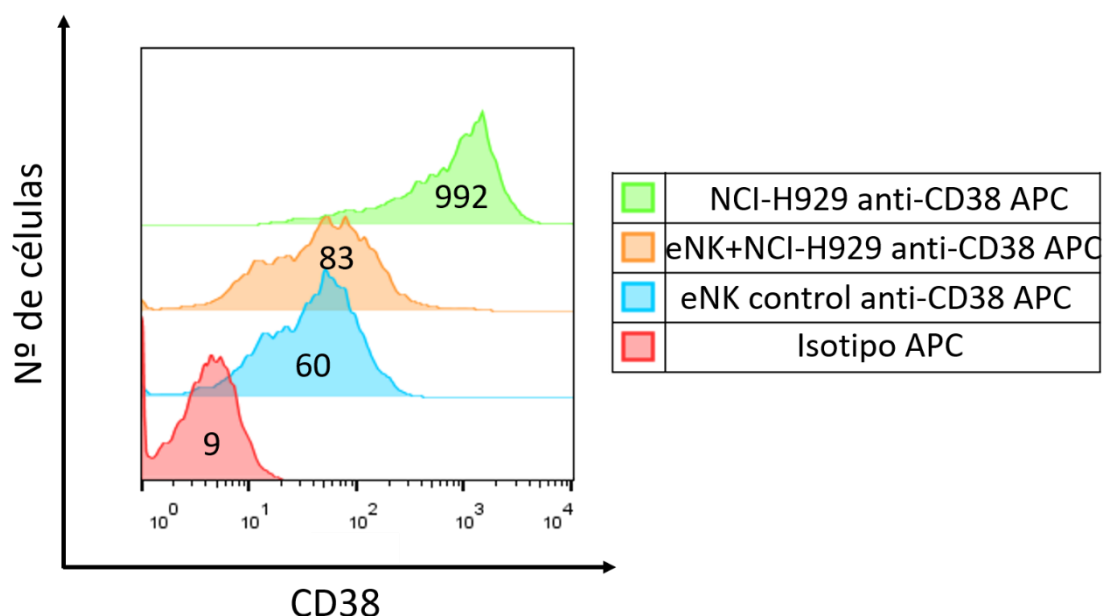


Figura 4.17. Trogocitosis de las células eNK: expresión de CD38 en la membrana plasmática de las células eNK antes y después de ser co-incubadas con células NCI-H929 durante 4 horas. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y el eje de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. El histograma rojo muestra la señal base de las células eNK marcadas con el control de isotipo. El histograma azul muestra el nivel de expresión de CD38 de las células eNK antes de ser co-incubadas con el MM. El histograma naranja, por su parte, corresponde al nivel de expresión de CD38 de las células eNK tras 4 horas de co-incubación con el MM. Por último, el histograma verde corresponde al nivel de expresión de CD38 de las células NCI-H929. Los números que aparecen en cada histograma corresponden a la MFI de cada condición. Histogramas representativos de 2 experimentos independientes.

Transcurrido este tiempo, se determinó la expresión de CD38 tanto en las células NCI-H929 como en las células eNK incubadas conjuntamente durante 4 horas. Los resultados indicaron claramente (*ver Figura 4.17*) que la señal de CD38 de las células eNK co-incubadas con las células NCI-H929 (histograma naranja) se desplazó hacia la derecha con respecto a la señal de CD38 inicial (histograma azul). Esto significa que durante la co-incubación aumentó la cantidad de CD38 presente en la membrana de las células eNK, debido a su captación de las membranas de las células diana, en el transcurso de su interacción. El aumento de la expresión de CD38 también se puede comprobar mediante el incremento de la MFI (de 60 a 83). Por lo tanto, las células eNK generadas fueron capaces de realizar trogocitosis.

Recapitulando la información obtenida acerca de las células eNK, se puede concluir que:

- Éstas tienen una significativa citotoxicidad basal sobre las distintas líneas celulares de MM, dependiendo del patrón de expresión de ligandos activadores y/o inhibidores. Las células de la línea NCI-H929, que expresan menos MIC-A/MIC-B, son menos sensibles a su acción.
- Las células eNK son capaces de llevar a cabo la ADCC sobre líneas celulares de MM gracias a daratumumab. La magnitud de la muerte celular producida mediante la ADCC está relacionada con el nivel de expresión de CD38 en la membrana de la célula diana.
- Aunque en presencia de daratumumab existe un cierto nivel de fratricidio entre las células eNK, debido a que ellas también expresan CD38, si las dianas tienen un nivel de expresión de CD38 superior al suyo la acción anti-tumoral es eficaz.
- El principal mecanismo citotóxico empleado por las células eNK sobre las líneas de MM tanto en presencia como en ausencia de daratumumab es la vía de los gránulos citotóxicos. La participación y la contribución de la vía de los ligandos de los receptores mortales depende de su nivel de expresión en las células eNK y de la sensibilidad a los mismos de las células diana.
- Las células eNK llevan a cabo trogocitosis sobre sus células diana.
- Todos los parámetros mencionados varían en función del donante del que provengan las PBMCs de partida y dependen del fenotipo particular de las células generadas en cada expansión. Por lo tanto, puede existir una variabilidad considerable entre cada una de ellas.

4.3 ESTUDIO DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDUCIDA EN LAS CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE. PAPEL DE LAS CÉLULAS NK-92

Los resultados obtenidos con las células eNK mostraron que existía una variabilidad significativa en la capacidad citotóxica de las células generadas en cada expansión. Esto podría suponer un inconveniente para la potencial utilización terapéutica de estas células, ya que, aunque generalmente produjeran una buena respuesta, su potencial sería variable y su reproducibilidad deficiente. Otro inconveniente de este modelo serían los costes de producción, ya que se tendrían que aislar periódicamente las PBMCs y a partir de ellas, seleccionar las células NK, expandirlas y activarlas.

Por todo ello, se decidió generar un modelo de células NK menos costoso y más reproducible. En ese momento existían varias líneas establecidas de células NK: NK-92, NK-YS, KHYG-1, NKL, NKG, SNK-6 e IMC-1. De ellas, nuestro laboratorio disponía de la línea NK-92, que además era la más citotóxica de entre ellas, según la literatura (Klingemann et al., 2016). Sin embargo, estas células no expresaban CD16 (Gong et al., 1994; Klingemann et al., 2016; Maki et al., 2001; Suck et al., 2016; Williams et al., 2017; Y. Yan et al., 1998) y no eran capaces de llevar a cabo la ADCC.

4.3.1 Caracterización de la línea celular NK-92

Antes de empezar a realizar experimentos de citotoxicidad con las células NK-92, elegidas como modelo, se analizaron varias de sus características morfológicas y moleculares. En primer lugar, se observó la morfología celular y sus características de crecimiento en cultivo. En la *Figura 4.18* se muestran fotografías representativas de los cultivos de células NK-92 en las que se aprecia la formación de densas agrupaciones de células ("*clusters*").

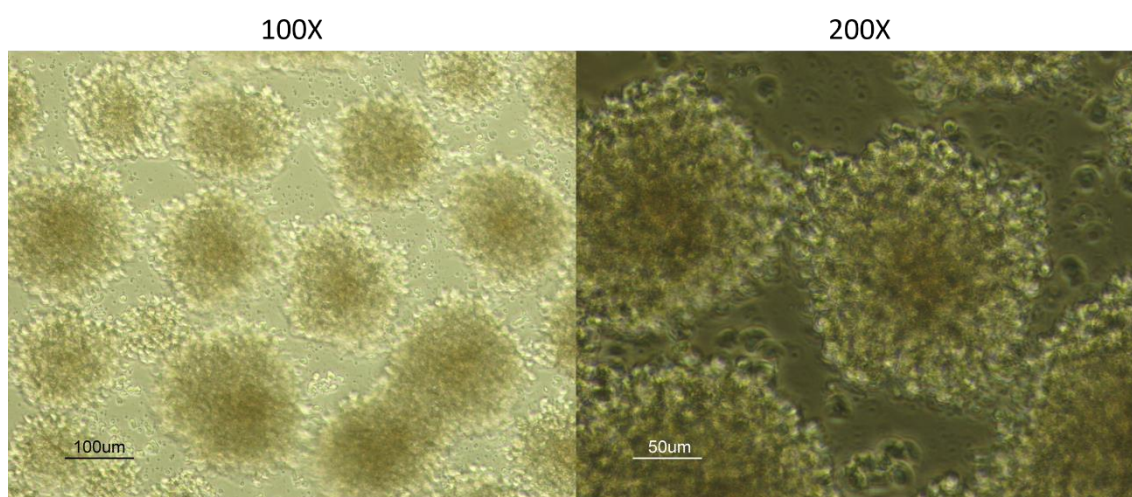


Figura 4.18. Morfología de las células NK-92 en cultivo. Fotos tomadas en el microscopio óptico a diferentes ampliaciones: 100x (izquierda) y 200x (derecha).

En cuanto a sus características bioquímicas, lo primero que se hizo fue comprobar la falta de expresión de CD16 en estas células, tal y como se indica en la literatura. Para ello se realizó un análisis comparativo con células eNK por citometría de flujo (*ver apartado 3.5.2*). La *Figura 4.19* muestra los histogramas correspondientes a ambos marcajes. Efectivamente, mientras las células eNK fueron CD16⁺ (100% de expresión), las células NK-92 fueron negativas para CD16.

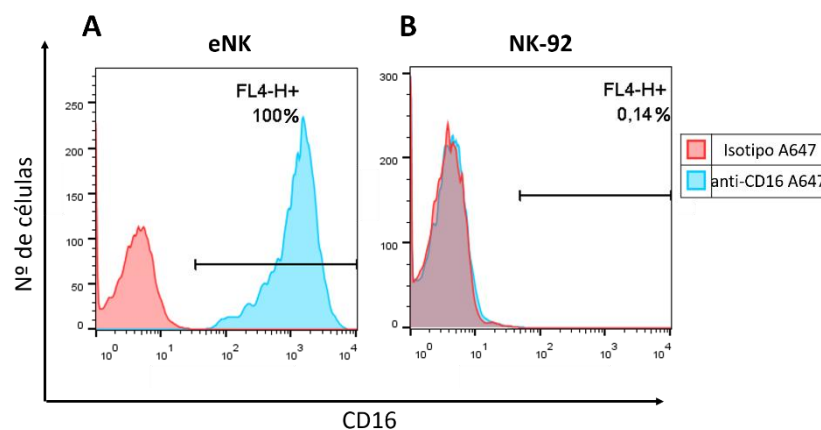


Figura 4.19. Expresión de CD16 en la membrana plasmática de las células eNK y NK-92. A) Células eNK. B) Células NK-92. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y el eje de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. Los histogramas rojos muestran la distribución de la señal base de fluorescencia debida al control de isotipo. Los histogramas azules representan el marcaje con un mAb específico anti-CD16 en cada tipo celular. Los porcentajes indican la fracción de la población de cada tipo celular que es positiva. Dichos valores se establecieron tomando como referencia la intensidad de fluorescencia a la que el control de isotipo tuvo menos de 1% de señal positiva. Histogramas correspondientes a 1 experimento.

También se determinó el nivel de expresión de CD38 en las células NK-92. En la *Figura 4.20A* se recoge que las células NK-92 expresaban niveles elevados de CD38 (99,6% de expresión), lo que podría acarrear problemas de fratricidio en caso de llegar a utilizar el anticuerpo daratumumab. Otro factor que podría alterar la citotoxicidad de las células NK-92 era la expresión de moléculas reguladoras como PD-1. No obstante, en la *Figura 4.20B* se puede observar que las células NK-92 no expresaban PD-1, lo que hace improbable su inhibición por parte de las células tumorales.

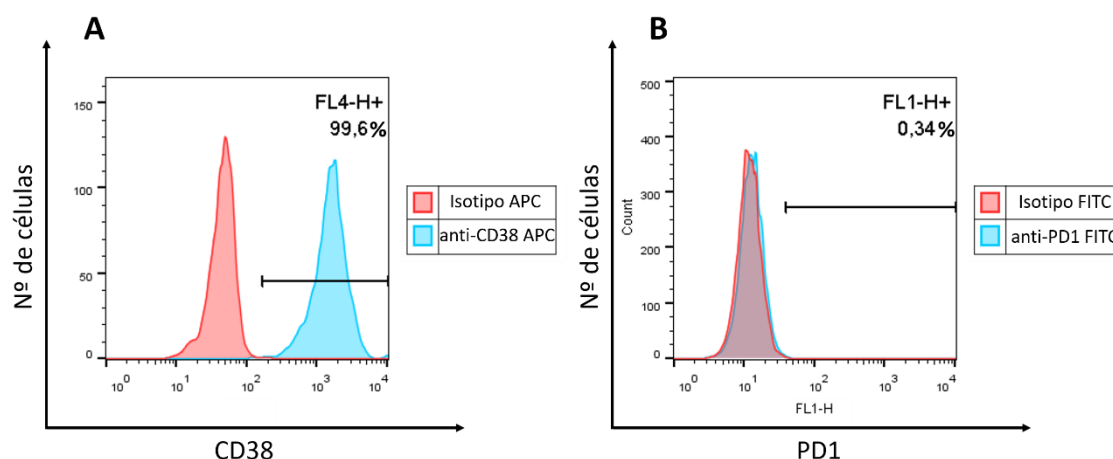


Figura 4.20. Expresión de diferentes proteínas en la membrana plasmática de las células NK-92. A) Expresión de CD38. B) Expresión de PD-1. En ambos casos los ejes de abscisas representan la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y los ejes de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. Los histogramas rojos muestran la distribución de la señal base de fluorescencia debida al control de isotipo. Los histogramas azules representan el marcaje con un mAb específico anti-CD38 y otro mAb específico anti-PD1, respectivamente. Los porcentajes indican la fracción de la población de células NK-92 que se considera positiva. Dichos valores se establecieron tomando como punto de corte una intensidad de fluorescencia a la que el isotipo tuviera menos de 1% de señal positiva. Histogramas representativos de un total de 2 experimentos.

También se analizó la expresión de los ligandos mortales, ya que existía controversia en la literatura acerca de si las células NK-92 los expresaban o no. Primero se efectuó el marcaje en membrana por citometría de flujo (ver apartado 3.5.2). Tal y como refleja la Figura 4.21, no se detectó la expresión de FasL en la superficie de las células NK-92 por este método (Figura 4.21A), y la señal obtenida de TRAIL fue también residual (Figura 4.21B).

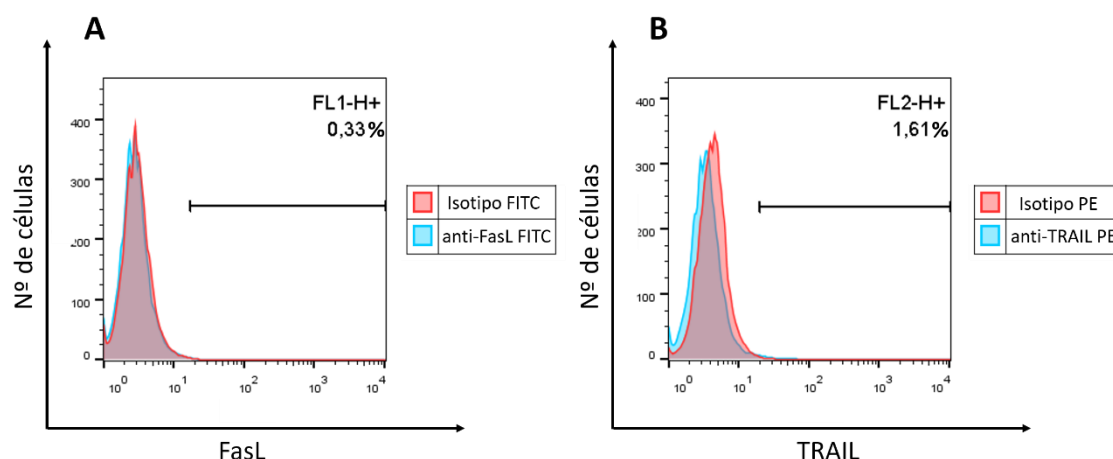


Figura 4.21. Expresión de los ligandos mortales en la membrana plasmática de las células NK-92. A) Expresión de FasL. B) Expresión de TRAIL. En ambos casos los ejes de abscisas representan la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y los ejes de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. Los histogramas rojos muestran la distribución de la señal base de fluorescencia debida al control de isotipo. Los histogramas azules representan el marcaje con un mAb específico anti-FasL y otro mAb específico anti-TRAIL, respectivamente. Los porcentajes indican la fracción de la población de células NK-92 que se considera positiva. Dichos valores se establecieron tomando como punto de corte una intensidad de fluorescencia a la que el isotipo tuviera menos de 1% de señal positiva. Histogramas representativos de un total de 2 experimentos.

Seguidamente, se realizó el estudio de la expresión intracelular de ambos ligandos por la técnica de *Western Blotting* (ver apartado 3.6). Como se había descrito previamente (Martínez-Lorenzo et al., 1999), FasL presentó varias bandas entre 26 y 40 kDa (Figura 4.22A), correspondiendo ésta última a la forma madura glicosilada. Las bandas a pesos moleculares entre 31,5 kDa, peso molecular del polipéptido, y 35 kDa pueden corresponder a formas parcialmente glicosiladas. La banda a 26 kDa correspondería al fragmento generado por acción de proteasas. En cualquier caso, la forma madura parece ser la predominante y se confirma la expresión de FasL en estas células, aunque solamente en el interior celular, probablemente asociada a cuerpos multivesiculares, previamente descritos en linfocitos T activados (Bossi & Griffiths, 1999; Monleón et al., 2001).

Un patrón similar de bandas se observó en el caso de TRAIL (Figura 4.22B), debido también a diferentes niveles de glicosilación de esta proteína (Martínez-Lorenzo et al., 1998, 1999). Es decir, de nuevo, este ligando mortal parece expresarse exclusivamente en el interior de las células NK-92.

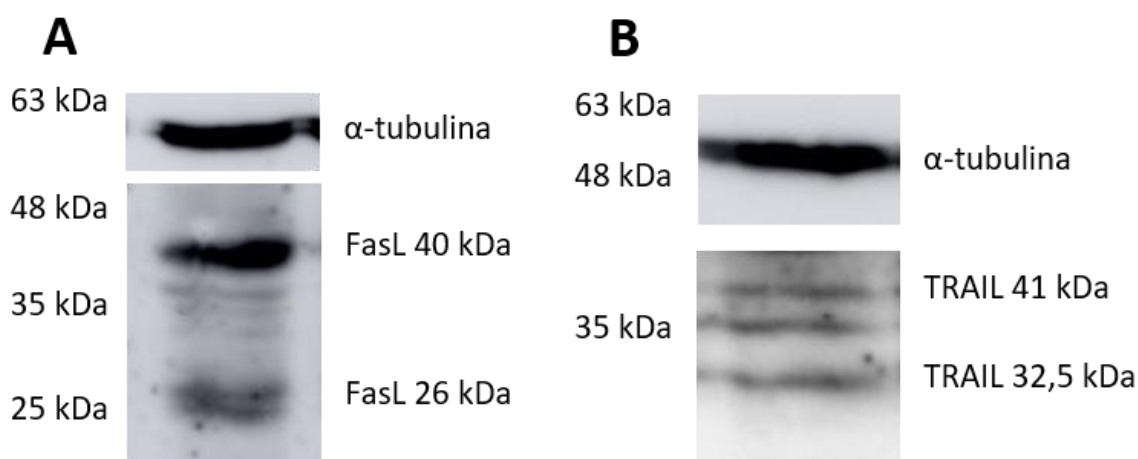


Figura 4.22. Expresión intracelular de los ligandos mortales en las células NK-92. A) FasL. B) TRAIL. El lisado resultante de $5 \cdot 10^6$ células NK-92 se analizó por SDS-PAGE y Western Blotting, utilizando los anticuerpos anti-FasL o anti-TRAIL correspondientes. Como control de carga se utilizó α -tubulina. Imágenes representativas de 3 experimentos diferentes.

Estos resultados fueron algo sorprendentes, ya que en los trabajos de la literatura únicamente se había detectado el mRNA de FasL y el de TRAIL en las células NK-92 mediante RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), pero no las proteínas ni por citometría de flujo, ni por *Western Blotting* ni por ELISA (Iannello et al., 2009; Maki et al., 2001; Song et al., 2016).

4.3.2 Actividad citotóxica de las células NK-92 sobre las líneas celulares de mieloma múltiple

Una vez caracterizada la expresión de estas proteínas, se analizó la actividad citotóxica ejercida por las células NK-92 sobre las líneas de MM. En particular, se comprobó si las condiciones experimentales utilizadas con las células eNK se podían utilizar también para las células NK-92.

En primer lugar, se probaron diferentes ratios efector-diana. Comparando los resultados obtenidos (*Figura 4.23*) con los de la sección anterior (*ver Figura 4.13, Figura 4.14 y Figura 4.15*) se pudo apreciar que la sensibilidad de las tres líneas de MM varió respecto a la que tenían a las células eNK. Las líneas MM.1S y NCI-H929 fueron más sensibles a las células NK-92, descritas como muy citotóxicas (Gong et al., 1994; H. Klingemann et al., 2016; Suck et al., 2016; Yan et al., 1998). Aun así, las células NCI-H929 seguían siendo menos sensibles que las células MM.1S, probablemente debido a su menor expresión de ligandos activadores como MIC-A/MIC-B (Swift et al., 2012). En cuanto a la línea RPMI 8226, presentaban menor sensibilidad que a las células eNK, siendo los resultados obtenidos con las células NK-92 similares a los descritos en la literatura (Swift et al., 2012). Las diferencias en la citotoxicidad ejercida sobre las líneas de MM dependiendo del origen de las células efectoras podría deberse a la diferente combinación de ligandos receptores y activadores en cada caso.

Con respecto a los ratios efector-diana ensayados, la muerte celular producida aumentó progresivamente de forma escalonada y moderada al aumentar la razón efector-diana. Los ratios 3-1 y sobre todo 5-1 sobre las células MM.1S dieron resultados próximos al 100% de citotoxicidad, por lo que se eligieron ratios más bajos para poder observar el efecto sinérgico debido a la ADCC mediada por daratumumab.

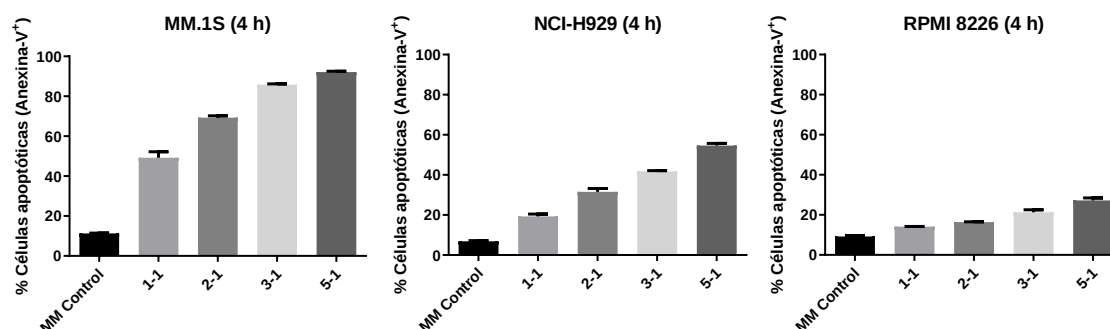


Figura 4.23. Sensibilidad de las líneas celulares de MM a las células NK-92. Las células NK-92 fueron marcadas con la sonda fluorescente CTG (0,5 μ M) y se co-incubaron con las células de MM a diferentes ratios efector-diana durante 4 horas. Posteriormente se determinó la apoptosis producida analizando la exposición de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 2 experimentos diferentes.

En segundo lugar, al estar descrita la alta capacidad citotóxica de las células NK-92, en parte debido a su elevada expresión de granzima B (Maki et al., 2001; Suck et al., 2016), se decidió comprobar si la cantidad de bloqueante utilizado era suficiente. En un ensayo preliminar de las células NK-92 co-incubadas con la línea MM.1S a un ratio 3-1, se analizó el efecto de concentraciones crecientes de EGTA. En efecto, debido a la alta citotoxicidad ejercida por las células NK-92 la cantidad de EGTA utilizada con las células eNK (1 mM) no bastó para inhibir la muerte celular producida. En la *Figura 4.24* se puede comprobar que en presencia de EGTA 1 mM la muerte siguió siendo mayor del 60%. El aumento de la concentración de EGTA consiguió reducir más la muerte, aunque la inhibición alcanzó un máximo en torno a una concentración de EGTA 5 mM. Al no haber diferencias de toxicidad sobre los controles, se eligió esta concentración para el análisis del mecanismo de la muerte celular producida por las células NK-92.

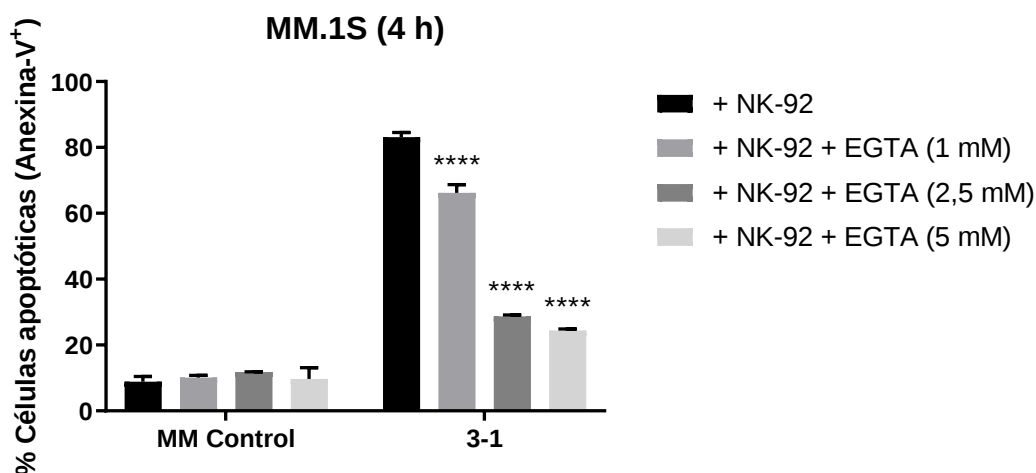


Figura 4.24. Efecto inhibitor de distintas concentraciones de EGTA sobre la citotoxicidad de las células NK-92. Las células NK-92 se marcaron con la sonda fluorescente CTG (0,5 μ M) y se preincubaron durante 1 hora con EGTA a distintas concentraciones. Después, las células MM.1S se co-incubaron durante 4 horas con las células NK-92 a un ratio efector-diana 3-1. Posteriormente, la apoptosis producida se determinó analizando la translocación de PS por citometría de flujo. El gráfico representa el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 2 experimentos diferentes. **** p <0,0001.

Una vez establecidos los ratios y la concentración de EGTA a emplear, se estudiaron los mecanismos de muerte celular inducidos por las células NK-92. El análisis se realizó de la misma manera que con las células eNK, con la salvedad de que no se utilizó daratumumab al carecer las células NK-92 del receptor del fragmento cristalizable (Fc), CD16.

En el caso de la línea celular MM.1S (ver Figura 4.25), la muerte celular producida por las células NK-92 fue mayor que la inducida por las células eNK (una media de 41% y 75% a ratios 1-1 y 3-1, respectivamente, vs 37% y 62%). Se observó también, que EGTA (5 mM) inhibió casi por completo la citotoxicidad de las células NK-92 tanto a ratio 1-1 como 3-1.

En contraste con las células eNK, no se vio ningún efecto de los bloqueantes de los ligandos mortales ni en solitario ni en combinación con EGTA. Este hecho coincide con la ausencia de expresión de estos ligandos en la superficie de las células NK-92 (ver Figura 4.21). Por otra parte, aunque se expresen en el interior celular (ver Figura 4.22), no parecen secretarse en su forma bioactiva asociados a exosomas.

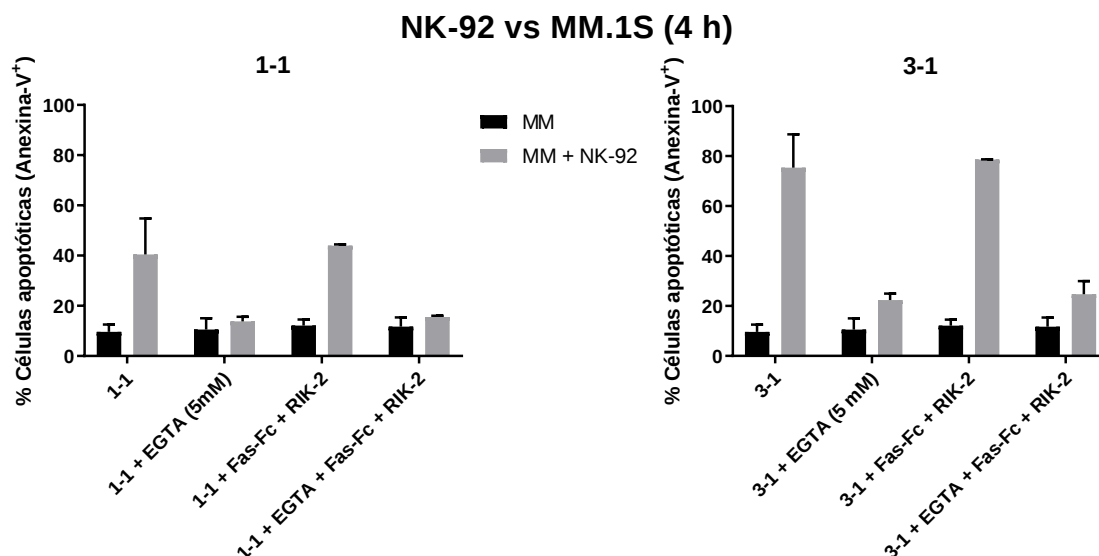


Figura 4.25. Citotoxicidad de las células NK-92 durante 4 horas sobre la línea celular MM.1S. Las células NK-92 se marcaron con la sonda fluorescente CTG (0,5 μ M) y se preincubaron durante 1 hora con los distintos agentes bloqueantes. Posteriormente, tras co-incubarse con las células diana durante 4 horas a diferentes ratios efector-diana, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 3 experimentos diferentes.

A diferencia de lo observado con las células eNK, las células NK-92 produjeron una cierta muerte celular sobre la línea celular NCI-H929 (Figura 4.26), principalmente a ratio 3-1 (36%). Al ser esta línea celular insensible a la acción de FasL y TRAIL, sólo EGTA produjo la inhibición de la citotoxicidad, tanto a ratio 1-1, como a ratio 3-1. La adición de Fas-Fc y RIK-2 no tuvo ningún efecto en la citotoxicidad ni aumentó el efecto de EGTA sólo.

Los resultados con las células NCI-H929 indicaron además que la línea celular NK-92 ofrecía una mejor reproducibilidad de los resultados con respecto a las células eNK. Los resultados de citotoxicidad obtenidos con las células NK-92 mostraron una baja desviación estándar, mientras que en los obtenidos con las células eNK había una mayor variabilidad en la cantidad de muerte celular inducida (ver por ejemplo Figura 4.14).

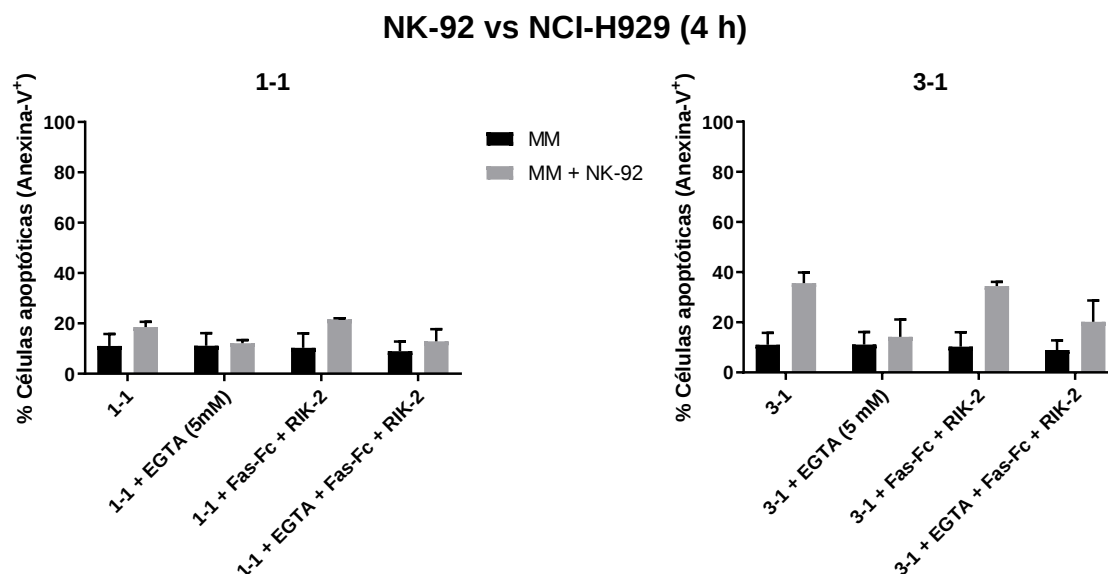


Figura 4.26. Citotoxicidad de las células NK-92 durante 4 horas sobre la línea celular NCI-H929. Las células NK-92 se marcaron con la sonda fluorescente CTG (0,5 μ M) y se preincubaron durante 1 hora con los distintos agentes bloqueantes. Posteriormente, tras co-incubarse con las células diana durante 4 horas a diferentes ratios efector-diana, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 3 experimentos independientes.

En la última de las líneas celulares de MM utilizadas, RPMI 8226, el cambio de células efectoras produjo el efecto contrario: menos sensibilidad y menos muerte celular (Figura 4.27). De valores medios de muerte celular con las células eNK a ratios 1-1 y 3-1 de 32% y 58% respectivamente, se pasó a valores medios de 24% y 35% con las células NK-92. Asimismo, aunque en las células eNK tanto EGTA (principalmente) como Fas-Fc y RIK-2 tenían efectos bloqueantes, en las células NK-92 no hubo efecto por parte de ninguno.

Esto podría deberse o bien a que las concentraciones de los bloqueantes eran insuficientes como para llegar a inhibir completamente los mecanismos, o a que había algún mecanismo adicional implicado en la citotoxicidad sobre estas células. Dado que los resultados obtenidos hasta ahora respecto a las células NK-92 descartaban la actuación de FasL y TRAIL, el bloqueante con concentración insuficiente debía ser EGTA. De hecho, ya había habido indicios de que una concentración de 5 mM de EGTA podría no bastar para lograr la inhibición (ver Figura 4.24 y Figura 4.25).

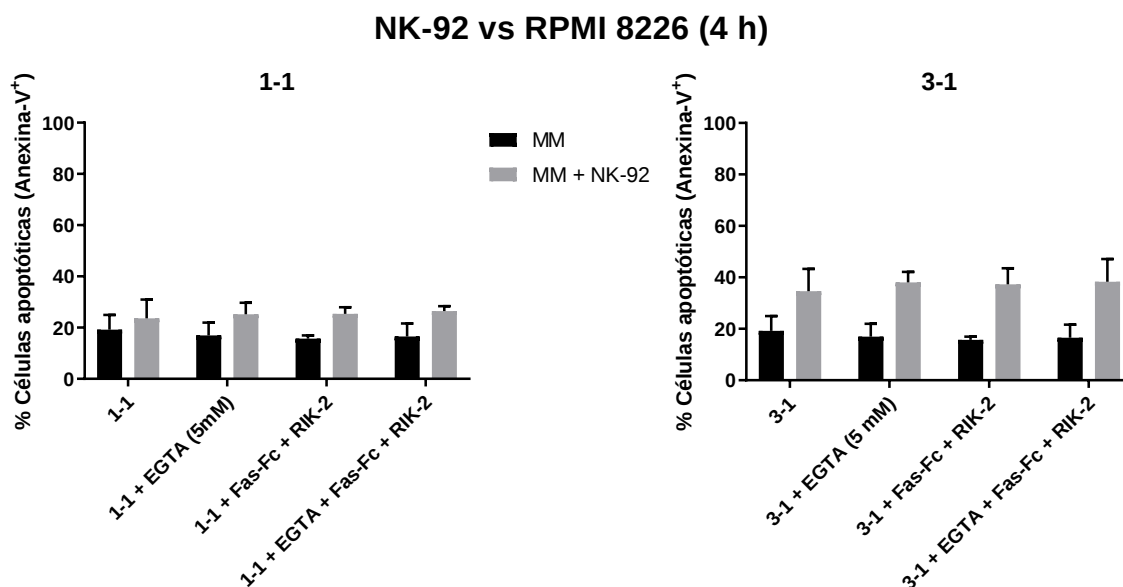


Figura 4.27. Citotoxicidad de las células NK-92 durante 4 horas sobre la línea celular RPMI 8226. Las células NK-92 se marcaron con la sonda fluorescente CTG (0,5 μ M) y se preincubaron durante 1 hora con los distintos agentes bloqueantes. Posteriormente, tras co-incubarse con las células diana durante 4 horas a diferentes ratios efector-diana, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 3 experimentos independientes.

Como era previsible, ninguno de los bloqueantes (Fas-Fc, RIK-2 y EGTA) resultó nocivo para las líneas celulares de MM en estos experimentos. Tampoco mostraron toxicidad sobre las propias células NK-92. Los resultados de estos experimentos se recogen en la Figura 4.28.

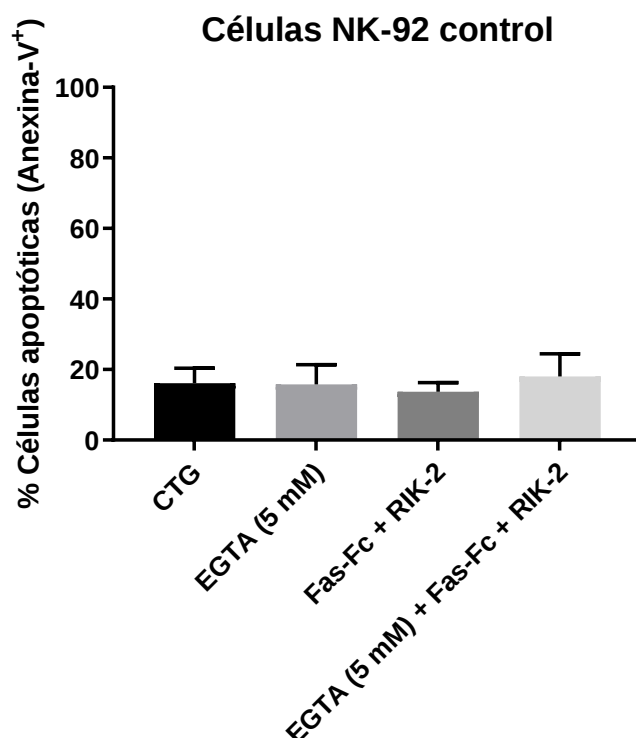


Figura 4.28. Citotoxicidad de los distintos reactivos bloqueantes sobre las células NK-92 durante 4 horas. Las células NK-92 fueron marcadas con la sonda fluorescente CTG (0,5 μ M) y preincubadas durante 1 hora con los distintos agentes bloqueantes. Las células de cada condición se incubaron durante 4 horas y, transcurrido este tiempo, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de NK-92 anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 9 experimentos diferentes.

A pesar de haber detectado en las células NK-92 cierta expresión de FasL y TRAIL por la técnica de *Western Blotting* (ver Figura 4.22), no se observó ningún efecto significativo de sus respectivos agentes bloqueantes en las distintas líneas de MM. Esta falta de efecto de los anticuerpos bloqueantes de los ligandos mortales sobre las células NK-92 coincidió con lo descrito en estudios precedentes (Iannello et al., 2009; Maki et al., 2001).

En cualquier caso, ante la controversia acerca de la posible expresión de los ligandos mortales se comprobó su posible secreción al medio extracelular por las células NK-92 en cultivo. No obstante, en los experimentos anteriores, al tener que cambiar el medio de cultivo justo antes de realizar los experimentos de citotoxicidad por obligaciones del protocolo (ver apartado 3.4.4), la cantidad de ligandos secretados disponible sería mínima y no ejercería ningún efecto significativo.

Para la verificación, se recogieron sobrenadantes del medio de cultivo (MEM α completo) de las células NK-92 cultivadas al menos 48 horas y se incubaron en ellos las líneas de MM durante 4 y 24 horas. Como controles se emplearon células de MM cultivadas en su correspondiente medio de cultivo (RPMI-1640 completo) y en medio MEM α completo fresco.

En la *Figura 4.29* se recogen los resultados obtenidos con las tres líneas celulares. Si bien se observó un ligero aumento de la muerte celular con el tiempo de cultivo, apreciable sobre todo en las células RPMI 8226, no hubo ninguna diferencia entre los tres medios empleados, en ninguna de las tres líneas celulares de MM. Por lo tanto, se concluyó que, aunque hubiera una ligera expresión intracelular de FasL y TRAIL, éstos no se secretaban al medio extracelular.

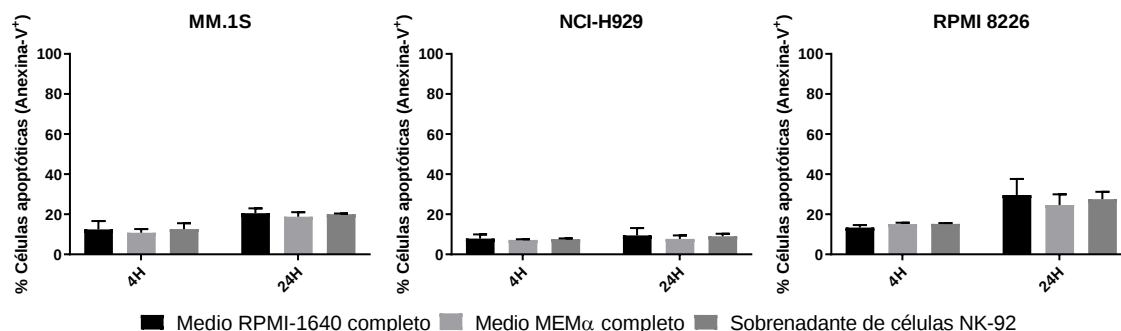


Figura 4.29. Efecto citotóxico de los sobrenadantes de las células NK-92. Las células de MM fueron incubadas durante 4 o 24 horas en presencia de distintos medios de cultivo: medio propio de las células de MM (medio RPMI-1640 completo), medio propio de las células NK-92 (medio MEMα completo), y medio de las células NK-92 cultivadas al menos durante 48 horas (sobrenadante de células NK-92). Posteriormente se determinó la apoptosis de las células de MM evaluando la exposición de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 2 experimentos distintos.

Al haber constatado anteriormente que las células eNK efectuaban trogocitosis mientras ejercían su citotoxicidad, se quiso comprobar si ocurría lo mismo con las células NK-92. Como molécula de membrana a monitorizar se eligió nuevamente CD38, y dado que la línea celular NCI-H929 era la que más la expresaba, se escogió otra vez como diana. Para el experimento, las células NK-92 se marcaron al igual que en los casos anteriores con la sonda fluorescente CTG, y se analizó en una alícuota el nivel de expresión inicial de CD38 por citometría de flujo (ver apartado 3.5.2).

Las células NK-92 se co-incubaron durante 3 horas con las células diana, en ausencia de bloqueantes. Finalizado este lapso de tiempo, se determinó la cantidad de CD38 en la membrana de las células NK-92 gracias a la señal de la sonda CTG. En la *Figura 4.30* se observa que el histograma de la señal de CD38 en las células NK-92 co-incubadas con las dianas (histograma naranja) se desplazó hacia la derecha del marcaje de CD38 inicial (histograma azul). Esto significa que durante la co-incubación aumentó la cantidad de CD38 en la membrana de las células NK-92, como consecuencia de su adquisición de las membranas de las células diana. El aumento de la expresión de CD38 también se puede comprobar mediante el incremento de la MFI (de 430 a 475), tal y como refleja la tabla presente en la *Figura 4.30*. Por tanto, las células NK-92 también fueron capaces de realizar trogocitosis.

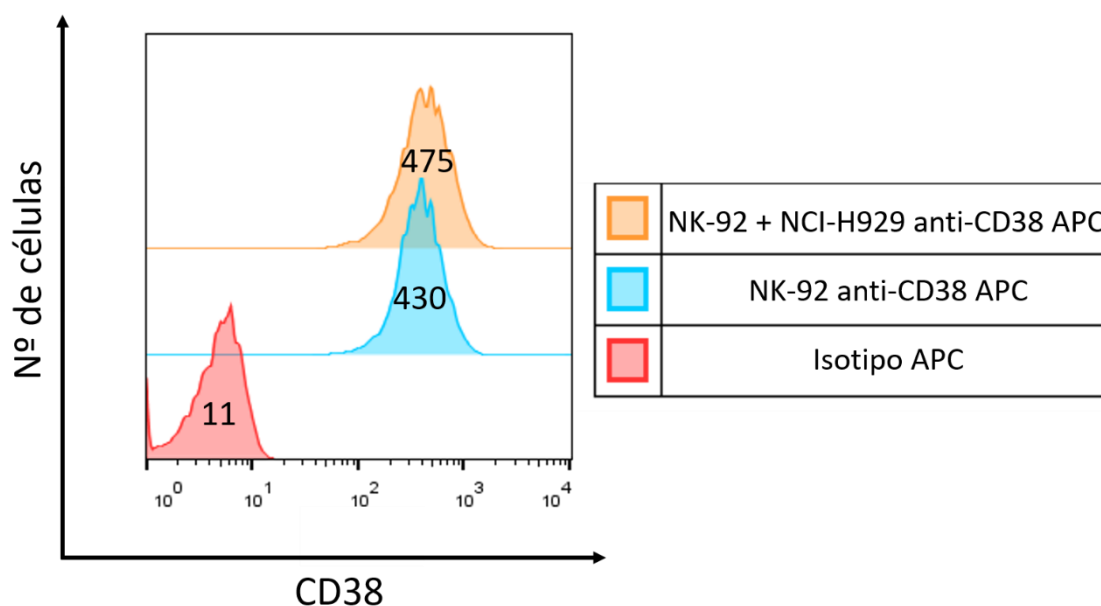


Figura 4.30. Trogocitosis en las células NK-92: expresión de CD38 en la membrana plasmática de las células NK-92 co-incubadas con las células NCI-H929 durante 3 horas. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y el eje de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. El histograma rojo muestra la distribución de la señal base de fluorescencia debida al control de isotipo. El histograma azul muestra el nivel de expresión de CD38 de las células NK-92 antes de su co-incubación con las células de MM. El histograma naranja corresponde al nivel de expresión de CD38 de las células NK-92 tras 3 horas de co-incubación con el MM. Los números que aparecen en cada histograma corresponden a la MFI de cada condición. Histogramas representativos de 2 experimentos diferentes.

Recapitulando la información obtenida acerca de las células NK-92, se puede concluir que:

- Las células NK-92, como se indica en la literatura, son muy citotóxicas. Comparando con las células eNK, presentan mayor citotoxicidad basal sobre las líneas celulares MM.1S y NCI-H929, aunque su citotoxicidad es menor sobre la línea RPMI 8226.
- Aunque se haya detectado una cierta expresión intracelular de FasL y TRAIL, estos ligandos no contribuyen significativamente a la citotoxicidad de las células NK-92 sobre las líneas de MM.
- El único mecanismo citotóxico de las células NK-92 del que se ha tenido constancia sobre las líneas celulares MM.1S y NCI-H929 es la vía de los gránulos citotóxicos.
- En el caso de las células RPMI 8226 no se puede precisar si existe otro mecanismo adicional además de la vía de los gránulos citotóxicos.
- Las células NK-92 llevan a cabo trogocitosis durante su co-incubación con sus células diana.
- Al ser una línea celular establecida, las células NK-92 presentan una mayor reproducibilidad de resultados que las células eNK.

4.4 ESTUDIO DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR DARATUMUMAB (ANTI-CD38) EN LAS CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE. PAPEL DE LAS CÉLULAS NK-92-CD16

4.4.1 Generación de la línea celular NK-92-CD16

Como se ha explicado en la Introducción (*ver apartado 1.3.6.2.1.1*), las células NK-92 no expresan la molécula CD16. Este receptor es necesario para poder reconocer la región Fc de los anticuerpos y así desencadenar la ADCC. Puesto que éste es uno de los principales mecanismos citotóxicos de las células NK silvestres, se decidió modificar genéticamente las células NK-92 para que lo expresaran y para poder combinarlas con el anticuerpo daratumumab. Para ello, las células NK-92 se transfectaron con el plásmido pHIV-CD16-ZsGreen (*ver apartado 3.2.6 y Figura 3.3*), que contenía la secuencia de la variante de alta afinidad del receptor CD16. La transfección se llevó a cabo mediante lentivirus generados en las células empaquetadoras HEK-293T.

La transfección de las células NK-92 se realizó tomando como referencia estudios previos que habían llevado a cabo una transfección similar (Clémenceau et al., 2006; Clémenceau et al., 2013; Ollier et al., 2017). El protocolo se fue modificando progresivamente para optimizar la transfección. Por ejemplo, se añadió dextrano a los cultivos de las células NK-92 para aumentar la eficiencia de la transfección (Nanbakhsh et al., 2018).

Finalmente, se consiguió generar la línea NK-92-CD16 utilizando el protocolo final que aparece descrito en Materiales y métodos (*ver apartado 3.3.1.1*). En la *Figura 4.31* se muestra cómo se seleccionaron las células transfectadas aprovechando la proteína ZsGreen como reportera. Esta selección fue imprescindible dada la baja eficiencia de la transfección de las células NK-92 (0,039% de células transfectadas en ausencia de dextrano y un 0,07% con dextrano). Estos porcentajes distaron bastante de los conseguidos en los artículos tomados como referencia (valores de hasta 41%) (Clémenceau et al., 2006; Clémenceau et al., 2013; Nanbakhsh et al., 2018; Ollier et al., 2017). Una posible explicación sería que en dichos trabajos se titularon los virus, mientras que en nuestro caso se usaron volúmenes fijos de sobrenadantes virales.

La selección y purificación de las células NK-92-CD16 gracias a la fluorescencia emitida por la proteína ZsGreen se llevó a cabo mediante separación celular por citometría de flujo (*sorting*). En total, se recogieron 1.000 células con el citómetro separador SH800S que se sembraron en un frasco de cultivo tal y como se indica en Materiales y métodos (*ver apartado 3.5.3*).

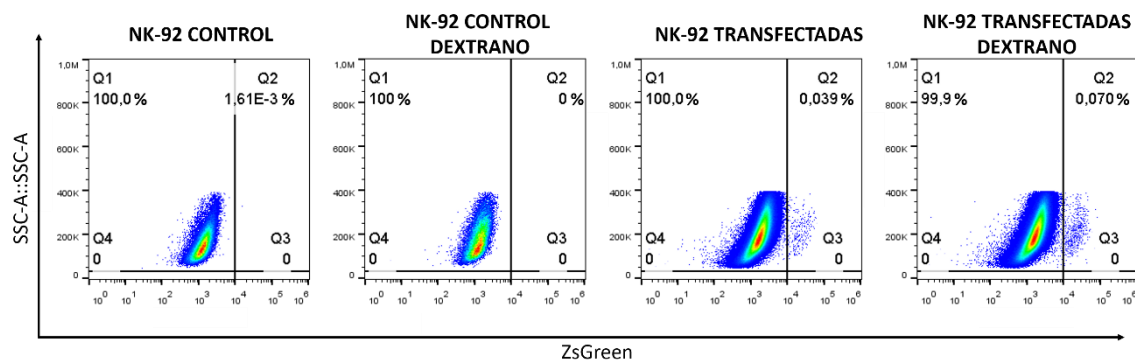


Figura 4.31. Eficiencia de las transfecciones iniciales en distintas condiciones experimentales. En estos gráficos (dot plot), el eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de la proteína ZsGreen, y el eje de ordenadas la señal del detector SSC-H (complejidad celular). Los porcentajes indican la fracción de la población que es positiva. Se incluyeron controles sin y con dextrano.

Una vez las células recogidas proliferaron lo suficiente, se volvió a analizar la fluorescencia de la proteína ZsGreen para comprobar la pureza del cultivo y hacer una nueva selección en caso necesario. En la Figura 4.32 se puede observar cómo se llegó así a un cultivo con el 1,27% de células transfectadas, incrementándose la población NK-92-CD16 entre un 1.700% y un 3.150%.

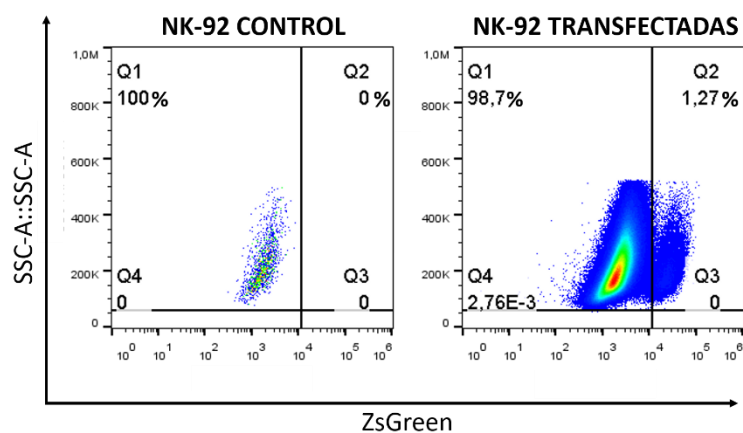


Figura 4.32. Porcentaje de células NK-92-CD16 en el cultivo tras la primera ronda del proceso de selección. En las gráficas (dot plot), el eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de la proteína ZsGreen, y el eje de ordenadas la señal del detector SSC-H (complejidad celular). Los porcentajes indican la fracción de la población positiva respecto al control.

A la vista de los resultados, se realizó una segunda ronda de selección usando el citómetro separador SH800S. En esta ocasión se recogieron y se sembraron, de la misma forma que la vez anterior, 15.000 células totales. Cuando las células crecieron lo suficiente, se distribuyeron en dos frascos de cultivo y se analizó nuevamente la señal de ZsGreen por

citometría de flujo para constatar la eficacia de la segunda selección (Figura 4.33A). Como se puede ver en la mencionada figura, la segunda ronda del proceso de selección resultó aun mejor, consiguiéndose alrededor de un 95% de pureza con respecto a la señal de ZsGreen. Una vez comprobada la expresión de la proteína reportera, se realizó un marcaje de membrana para analizar por citometría de flujo la expresión de CD16, el verdadero objetivo de nuestro trabajo.

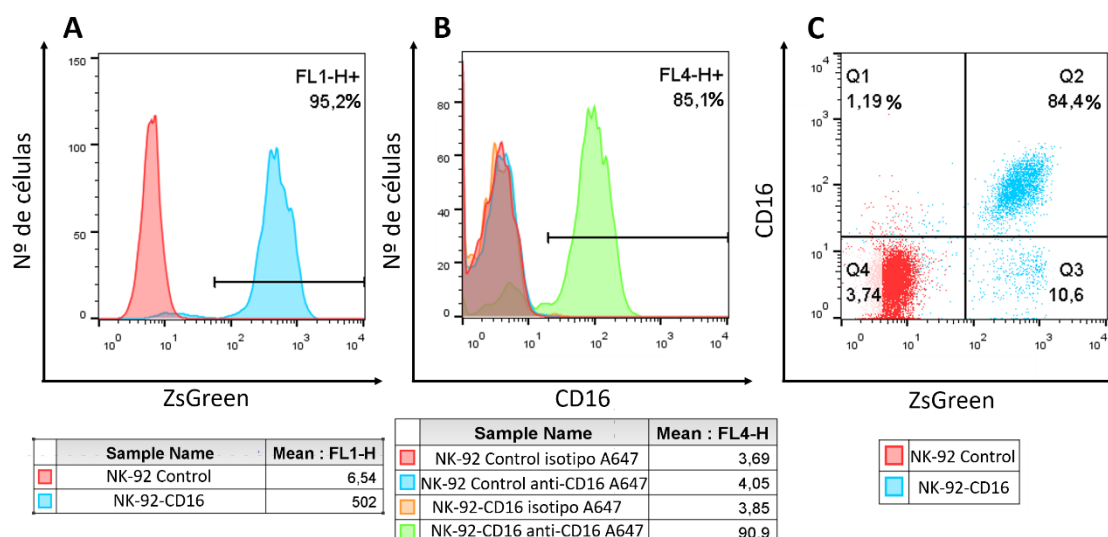


Figura 4.33. Porcentajes de células NK-92-CD16 en el cultivo tras la segunda ronda de selección.

A) Porcentaje de células ZsGreen⁺. El histograma rojo muestra la señal base de las células control y el azul el nivel de expresión de ZsGreen en las células transfectadas. B) Porcentaje de células CD16⁺. Los histogramas rojo y naranja muestran la señal del marcaje con el control de isotipo de las células sin transfectar y transfectadas respectivamente. Los histogramas azul y verde muestran la señal del marcaje con un mAb específico anti-CD16 en las células control y en las células transfectadas, respectivamente. C) Porcentaje de células CD16⁺ ZsGreen⁺. En este gráfico (dot plot), los puntos rojos corresponden a las células control y los puntos azules a las células transfectadas. En A y en B, el eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia y el eje de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. En C, se representa la intensidad de fluorescencia de la proteína ZsGreen (abscisas), y la del marcaje de la proteína CD16 (ordenadas). Los porcentajes indican la fracción de la población celular positiva para cada proteína, considerando que el control de isotipo tuviera menos del 1% de señal positiva.

En la Figura 4.33B se puede observar que si bien la expresión de CD16 era muy alta (85,1%), la cantidad de células positivas era inferior a la cantidad de células positivas para ZsGreen. Por su parte, en la Figura 4.33C se muestran los marcajes obtenidos para ambas proteínas, con un 84,4% de células doble positivas, que expresaban de manera simultánea ambas proteínas. La nueva línea celular obtenida se denominó como NK-92-CD16.

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que el plásmido lentiviral fue correctamente diseñado y que la proteína CD16 se expresaba en la membrana plasmática. Quedaba por comprobar que la proteína expresada fuera funcional. Para ello, con las células NK-92-CD16 disponibles en ese momento se realizaron ensayos de citotoxicidad (*ver apartado 3.4.5*) añadiendo daratumumab, para comprobar si en presencia del anticuerpo aumentaba la muerte celular producida debido a la ADCC. Puesto que estas nuevas células expresaban la proteína fluorescente verde ZsGreen, ya no era necesario marcarlas con la sonda CTG. El análisis de citometría de flujo fue similar al realizado con las células eNK (*ver Figura 4.12*), con la salvedad de que la fluorescencia utilizada para distinguir las células efectoras de las dianas procedió de ZsGreen.

En la *Figura 4.34* se recogen los resultados de la citotoxicidad ejercida por las células NK-92-CD16 sobre las tres líneas de MM. En las tres se pudo comprobar un aumento significativo de la muerte celular producida en presencia de daratumumab a ratio 1-1 y también a ratio 3-1 sobre las células MM.1S y NCI-H929. Estos datos demuestran que el receptor CD16 además de expresarse era funcional, ya que el incremento de la muerte producida se debía al reconocimiento del anticuerpo presente y a la consecuente inducción de ADCC. En este experimento también se observó que existían diferencias entre los diferentes frascos de células en cultivo, seleccionándose en lo sucesivo aquellas células NK-92-CD16 que producían una mayor citotoxicidad.

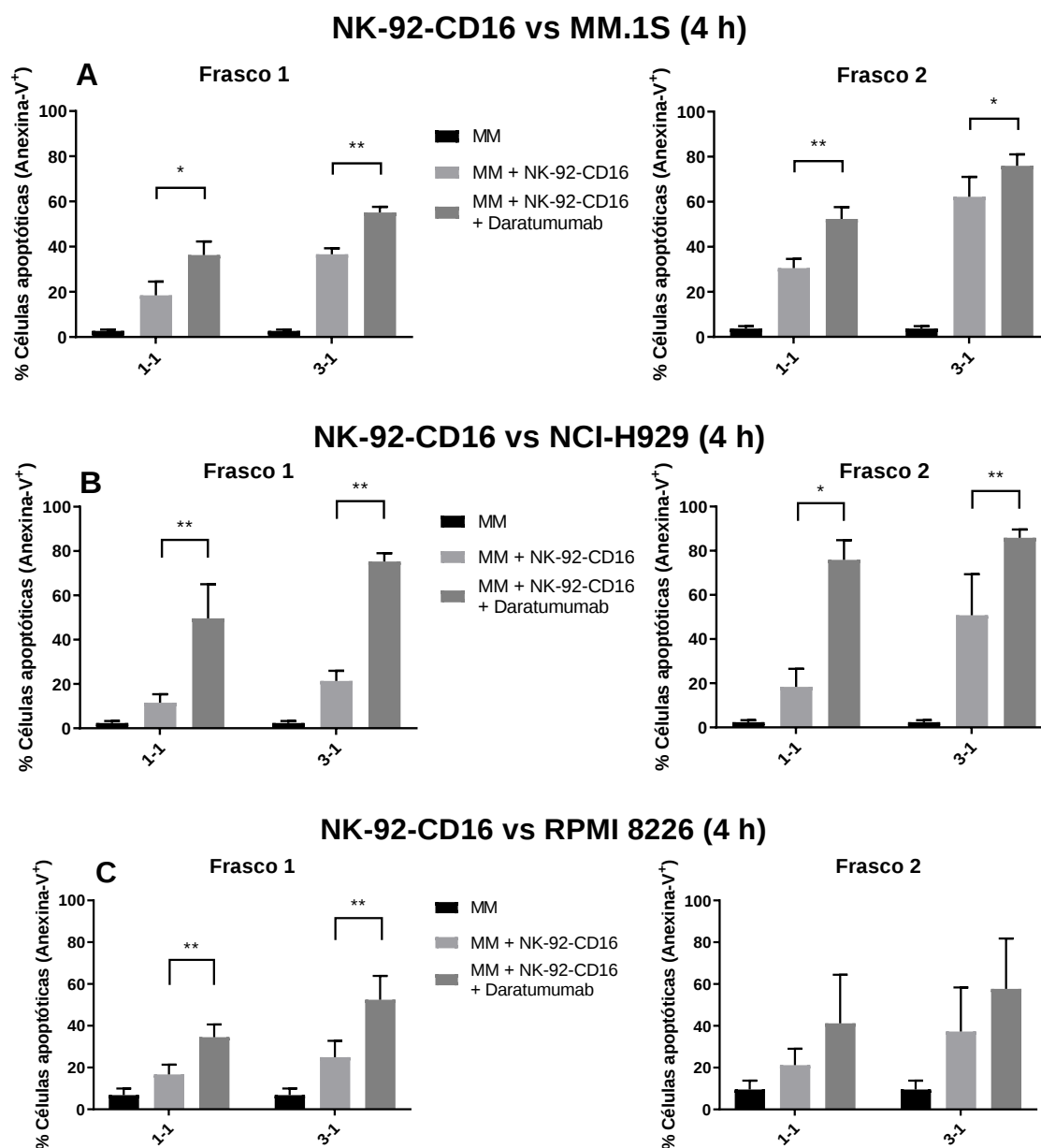
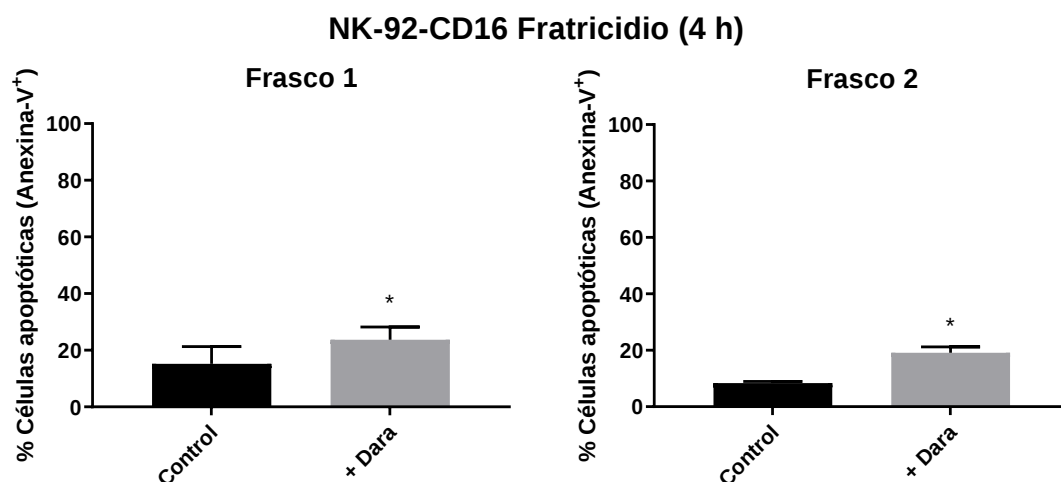


Figura 4.34. Funcionalidad del receptor CD16 expresado en la membrana plasmática de las células NK-92-CD16. Citotoxicidad y ADCC de las células NK-92-CD16 durante 4 horas sobre las líneas de MM. A) MM.1S B) NCI-H929 C) RPMI 8226. Las células de MM se preincubaron 15 minutos con daratumumab (5 μ g/ml) en los casos indicados. Tras añadir las células NK-92-CD16 a las células de MM y co-incubarlas durante 4 horas a diferentes ratios efector-diana, se determinó la apoptosis producida en las células de MM analizando la exposición de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 3 experimentos diferentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Al mismo tiempo que se realizaron estos experimentos, también se añadió daratumumab a las células NK-92-CD16. El propósito fue ver si al estar generadas a partir de células NK-92 con alta expresión de CD38 (ver *Figura 4.20A*), sufrían también fratricidio. A pesar de que las células NK-92 parentales expresaban más CD38 que las células eNK, en la *Figura 4.35* se puede apreciar que, aunque se producía algo de fratricidio, éste era menor que el observado en las células eNK (ver *Figura 4.16*), no superándose el 25% de muerte en promedio.



*Figura 4.35. Fratricidio en las células NK-92-CD16. Las células NK-92-CD16 se incubaron durante 4 horas con daratumumab (Dara, 5 µg/ml). Transcurrido ese tiempo se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células NK-92-CD16 anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media ± SD de 4 experimentos diferentes. *p<0,05.*

Una vez comprobada la funcionalidad del receptor CD16, se realizó una tercera ronda de selección celular por citometría de flujo. En esta ocasión, antes de pasar por el citómetro separador, las células fueron sometidas a un marcaje de membrana de CD16 (ver apartado 3.5.2). De esa forma se utilizó la expresión de la proteína de interés como criterio para seleccionar las células transfectadas. Se recogieron 150.000 células totales, se sembraron de igual manera que en las rondas de selección previas, y se cultivaron. En la *Figura 4.36* se encuentran los resultados de la expresión de ambas proteínas en las células expandidas a partir de las recogidas en la tercera ronda de selección, con un porcentaje próximo al 100%. Por lo tanto, a partir de este momento se consideró la nueva línea celular como homogénea.

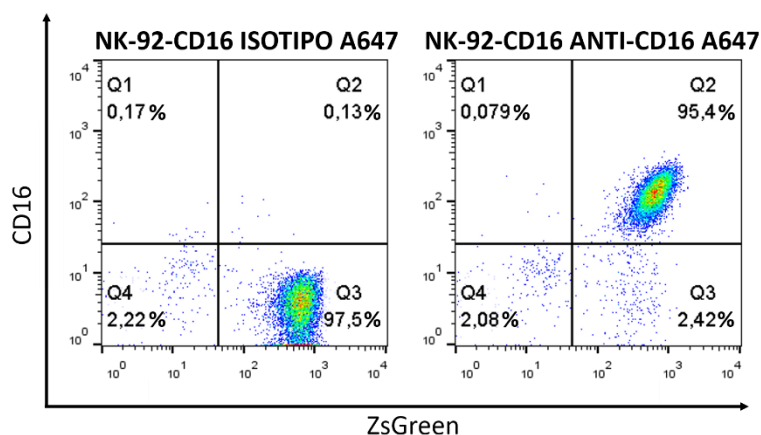


Figura 4.36. Abundancia relativa de las células NK-92-CD16 en cultivo tras la tercera ronda de selección. En este gráfico (dot plot), el eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de la proteína ZsGreen, y el de ordenadas la intensidad de fluorescencia del marcaje con un mAb específico anti-CD16. Los parámetros de cada célula aparecen representados como puntos. El control de isotipo se utilizó para determinar la fluorescencia inespecífica. Los porcentajes indican la fracción de la población de células NK-92 transfectadas que es negativa o positiva para cada proteína.

4.4.2 Caracterización de la línea celular NK-92-CD16 generada

Una vez establecida la nueva línea celular, se procedió a su caracterización. En primer lugar, se verificó al microscopio óptico si la morfología y la forma de crecimiento en cultivo se habían visto afectados. En la *Figura 4.37 (A, C y E)* se puede apreciar el aspecto y la morfología de las nuevas células NK-92-CD16, similar al de las células parentales NK-92. Las células crecieron agrupándose en *clusters* en suspensión tal y como se había observado en las células NK-92 (ver *Figura 4.18*). A su vez, la *Figura 4.37 (B, D y F)* muestra la señal de la proteína ZsGreen detectada por microscopía de fluorescencia sobre el mismo campo óptico que las células visualizadas con luz blanca.

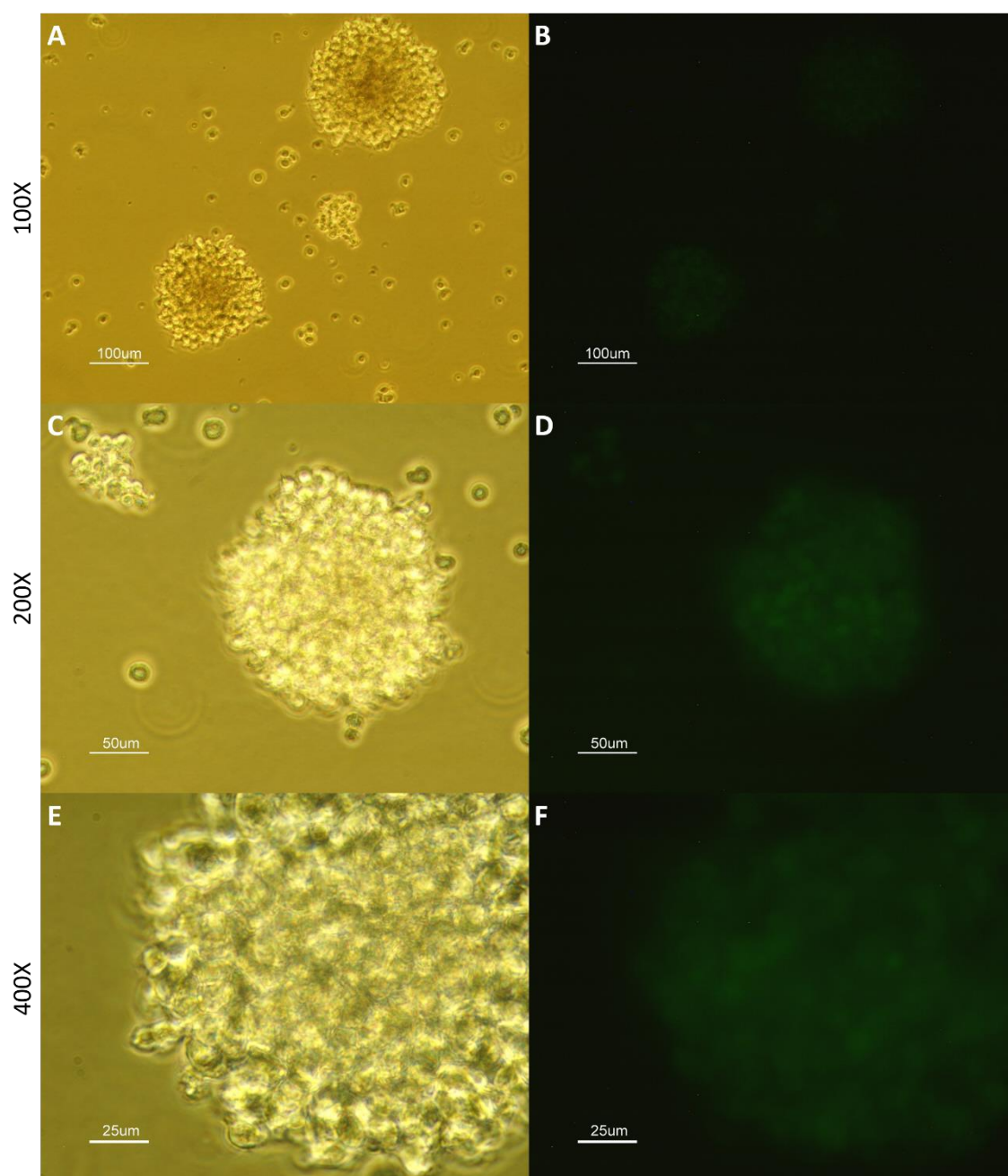


Figura 4.37. Fotografías de microscopía óptica (A, C y E) y de microscopia de fluorescencia (B, D y F) de las células transfectantes NK-92-CD16. Las fotos fueron tomadas a distintos aumentos: 100x (A y B), 200x (C y D) y 400x (E y F).

Como las células NK-92 transfectantes expresaban ahora el receptor CD16 y podían llevar a cabo ADCC utilizando el anticuerpo daratumumab, se analizó la expresión de CD38 en su membrana por si se hubiera visto modificada respecto a la de las células NK-92 parentales (ver Figura 4.20A). En la Figura 4.38 se puede ver que, aunque las células NK-92 ya tenían una expresión elevada, la expresión en membrana de CD38 aumentó en las células NK-92-CD16. Por consiguiente, se podría pensar que al expresar mayores niveles de CD38 podrían sufrir también un mayor fratricidio en presencia de daratumumab. Sin embargo, los resultados de la Figura 4.35 muestran que el nivel de fratricidio fue en realidad relativamente bajo.

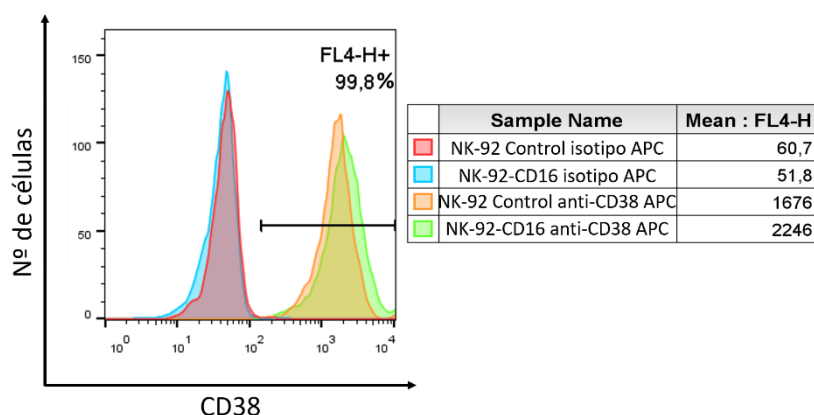


Figura 4.38. Expresión de CD38 en la membrana plasmática de las líneas celulares NK-92 y NK-92-CD16. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y el eje de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. Los histogramas rojo y azul muestran el marcaje con el control de isotipo en las células NK-92 y NK-92-CD16, respectivamente. El histograma naranja representa el marcaje con un mAb específico anti-CD38 en las células NK-92. El histograma verde representa el marcaje con dicho mAb específico anti-CD38 en las células NK-92-CD16. La tabla de la derecha indica la MFI de cada condición. Histogramas representativos de 2 experimentos diferentes.

Con la nueva línea NK-92-CD16 considerada homogénea tras tres rondas de selección se realizaron experimentos adicionales para caracterizar su capacidad citotóxica. Se realizó una comparación con las células NK-92-CD16 de la ronda de selección anterior. Los resultados de dicha comparación se muestran en la *Figura 4.39*. En ella se puede apreciar una diferencia significativa entre las células sometidas a dos o tres rondas de selección. Esta diferencia quizá podría atribuirse a un mayor nivel de expresión de CD16 en las células de la tercera ronda de selección (ver *Figura 4.33* y *Figura 4.36*). De acuerdo con esta hipótesis, el incremento de citotoxicidad observado estaría ligado a la expresión incrementada de CD16 en la membrana.

Efecto de las rondas de selección de las células NK-92-CD16 sobre la citotoxicidad inducida sobre las células MM.1S

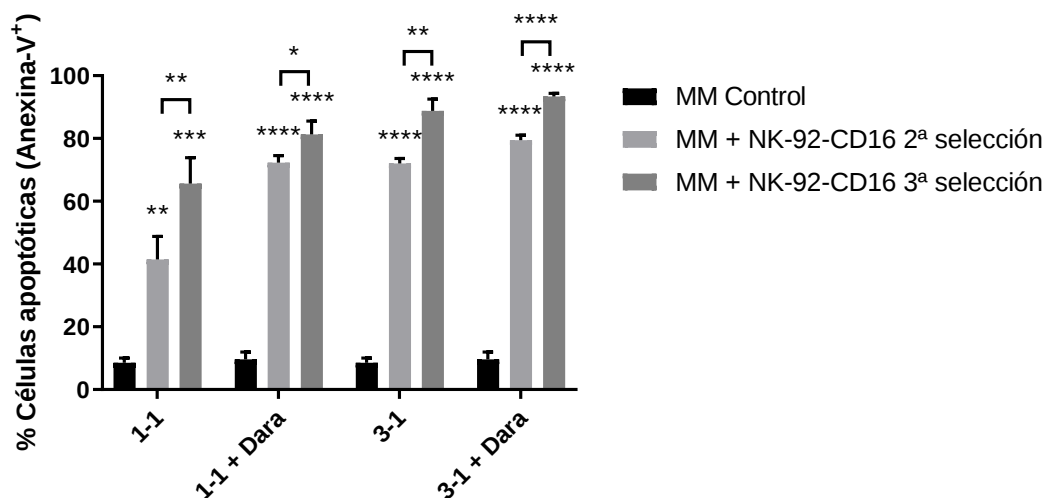


Figura 4.39. Evolución progresiva de la citotoxicidad de las células NK-92-CD16 generadas. Las células NK-92-CD16 de distintas rondas de selección se co-incubaron durante 4 horas con las células MM.1S, preincubadas, en su caso, 15 minutos con daratumumab (Dara, 5 μ g/ml). Transcurrido ese tiempo se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. El gráfico representa el porcentaje de células MM.1S anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 2 experimentos distintos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Ya que la capacidad citotóxica de las células NK-92-CD16 había ido aumentando a lo largo del proceso de selección, se analizó comparativamente la citotoxicidad ejercida por la línea parental NK-92 frente a la de la nueva línea NK-92-CD16. Los resultados se recogen en la Figura 4.40, en la que se aprecia una diferencia significativa entre la muerte celular provocada por las células NK-92 y NK-92-CD16. A la vista de estos resultados, se puede concluir que la expresión de CD16 tras la transfección aumenta la citotoxicidad celular.

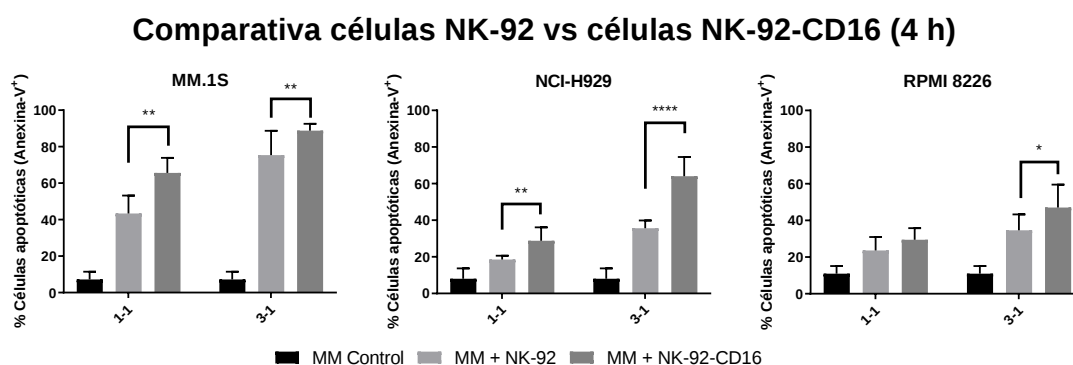


Figura 4.40. Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 comparada con la de sus células parentales. Las células NK-92 y NK-92-CD16 se co-incubaron durante 4 horas con las líneas celulares de MM a diferentes ratios efector-diana. Transcurrido ese tiempo, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 3 experimentos distintos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Al observarse que la citotoxicidad basal ejercida por las células eNK fue inferior a la observada en las células NK-92, y ésta a su vez inferior a la de las células NK-92-CD16, se decidió analizar la expresión de las principales proteínas citotóxicas en los distintos grupos de células, teniendo en cuenta también las diferencias entre las propias células NK-92-CD16 durante las rondas de selección. La expresión de las proteínas se analizó por la técnica de *Western Blotting*, utilizando extractos proteicos de lisados celulares.

Ya que la citotoxicidad de las células NK-92 se debía sobre todo a sus gránulos citotóxicos, se analizó en primer lugar la expresión de granzima B. En la *Figura 4.41* se muestra un inmunoblot ilustrativo de este experimento. Comparadas con las células NK-92, las células eNK de esa expansión expresaron alrededor de 4 veces menos granzima B (26% vs 100%). Esto podría explicar la mayor citotoxicidad basal de las células NK-92 comparadas con las células eNK. Con respecto a las células NK-92-CD16 tras dos rondas de selección, también se observó un moderado incremento del nivel de expresión de granzima B (110% vs 100%) con respecto a las células NK-92 parentales, lo cual correlacionaba de nuevo con su mayor capacidad citotóxica. Tras tres rondas de selección en las células NK-92-CD16 nuevamente se incrementó ligeramente la expresión de granzima B (128% vs 110%), de acuerdo también con el aumento de capacidad citotóxica observado. El conjunto de estos resultados parece indicar que el nivel de expresión de granzima B correlaciona con la capacidad citotóxica.

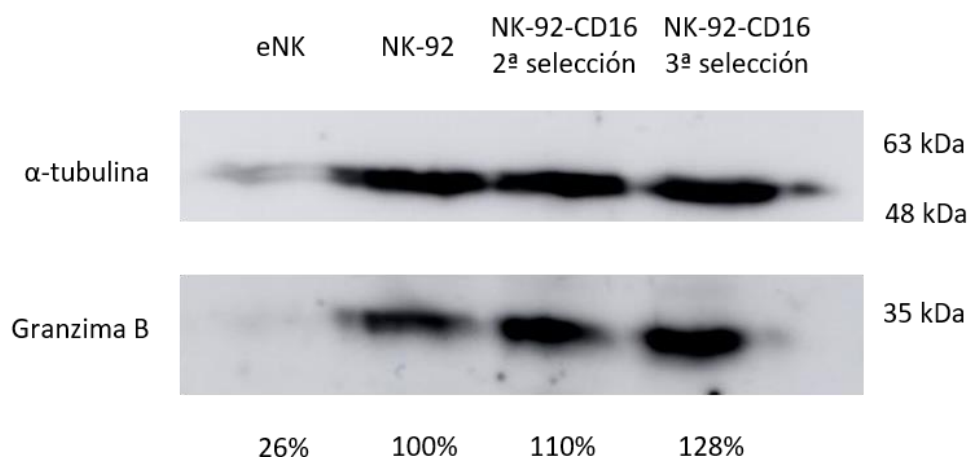


Figura 4.41. Expresión intracelular de granzima B en los distintos tipos de células NK empleadas en el presente trabajo. Las distintas células NK-92 ($5 \cdot 10^6$ células de cada tipo) se recogieron, se lisaron, y el extracto resultante se analizó por SDS-PAGE y Western Blotting. Los extractos de las células eNK, analizados de la misma manera, procedían de muestras congeladas. Como control de carga se utilizó la proteína constitutiva α -tubulina (50 kDa), y para comparar entre las distintas células se estableció la señal de la línea NK-92 respecto a su control de carga como el 100% de expresión. Imagen representativa de 2 experimentos diferentes.

Seguidamente, se evaluó la expresión de TRAIL en las mismas membranas empleadas para analizar la granzima B, como indican los controles de carga (*Figura 4.42*). Respecto al control de carga, las células eNK de esa expansión mostraron un nivel de expresión intracelular de TRAIL unas dos veces superior al de las células NK-92 (235% vs 100%). Aunque se volvió a detectar expresión intracelular de TRAIL en éstas últimas, se debe recordar que no hemos logrado demostrar su implicación en la citotoxicidad ejercida por las células NK-92 a 4 horas, al contrario de lo que ocurrió con las células eNK.

En cuanto a la expresión de TRAIL en las distintas células NK-92-CD16 durante su proceso de selección, se vio también aumentada con respecto a las células parentales, de manera parecida a lo ocurrido con granzima B (166% y 138% vs 100%). La posible implicación de TRAIL en la citotoxicidad ejercida por las células NK-92-CD16 se analizará más adelante.

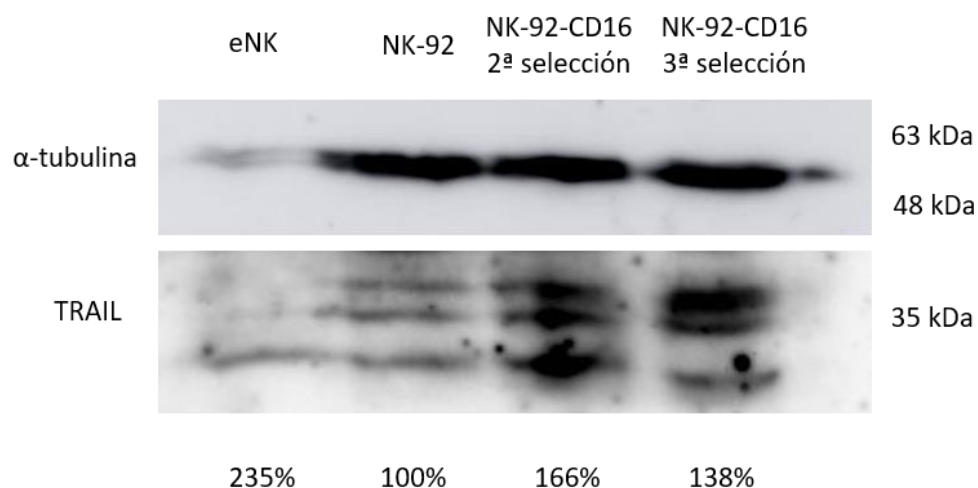


Figura 4.42. Expresión intracelular de TRAIL en los distintos tipos de células NK empleadas en este trabajo. Las distintas células NK-92 ($5 \cdot 10^6$ células de cada tipo) se recogieron, se lisaron, y el extracto resultante se analizó por SDS-PAGE y Western Blotting. Los extractos de las células eNK, analizados de la misma manera, procedían de muestras congeladas. Como control de carga se utilizó la proteína constitutiva α -tubulina (50 kDa), y para comparar entre las distintas células se estableció la señal de la línea NK-92 respecto a su control de carga como el 100% de expresión. Imagen representativa de 2 experimentos diferentes.

Por último, en otros geles independientes se estudió la expresión intracelular de FasL. En la *Figura 4.43* se puede comprobar que las células eNK de esa expansión tuvieron aproximadamente tres veces menos FasL que las células NK-92 (35% vs 100%).

En cuanto a las células NK-92-CD16, a diferencia de lo encontrado con las proteínas granzima B y TRAIL, expresaron una menor cantidad de FasL que las células NK-92 parentales, tanto de la forma madura de 40 kDa como de la forma soluble de 26 kDa.

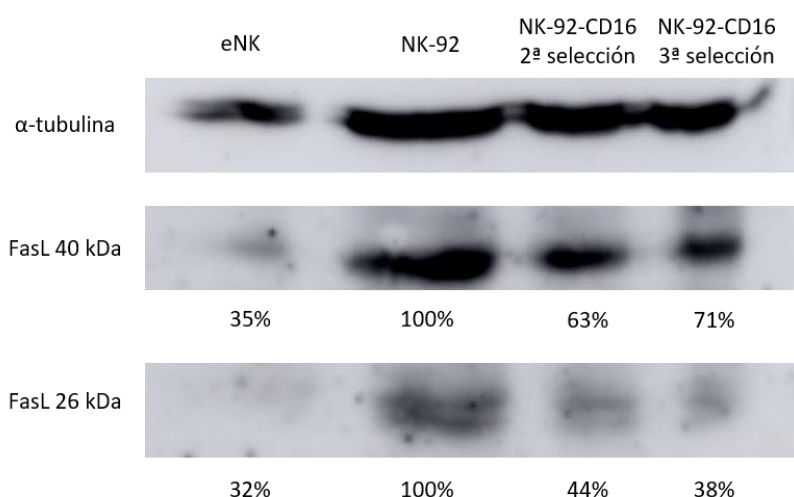


Figura 4.43. Expresión intracelular de FasL en los distintos tipos de células NK empleadas a lo largo del presente trabajo. Las distintas células NK-92 ($5 \cdot 10^6$ células de cada tipo) se recogieron, se lisaron, y el extracto resultante se analizó por SDS-PAGE y Western Blotting. Los extractos de las células eNK, analizados de la misma manera, procedían de muestras congeladas. Como control de carga se utilizó la proteína constitutiva α -tubulina (50 kDa), y para comparar entre las distintas células se estableció la señal de la línea NK-92 respecto a su control de carga como el 100% de expresión. Imagen representativa de 2 experimentos diferentes.

4.4.3 Actividad citotóxica de las células NK-92-CD16 sobre las líneas celulares de mieloma múltiple

Después de haber caracterizado los parámetros mencionados de las células NK-92-CD16, se procedió a ensayar su capacidad para ejercer ADCC en combinación con daratumumab.

En estos ensayos además de los agentes bloqueantes vistos anteriormente se utilizó ferrostatina-1 (Fer-1), un inhibidor de la ferroptosis, dado que se había descrito en la literatura que los linfocitos T citotóxicos eran capaces de inducir ferroptosis, otro tipo de muerte celular (*ver apartado 1.2.2*). Al proceder las células NK de los mismos precursores hematopoyéticos, y compartir mecanismos citotóxicos con los linfocitos, se consideró conveniente analizar si las células NK-92-CD16 también podían inducir este tipo de muerte.

Ferrostatina-1 elimina los radicales libres generados en la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Zilka et al., 2017) constituyentes de los fosfolípidos de membrana, por lo que se decidió analizar la posible implicación de los radicales libres en la citotoxicidad de estas células. Antes de llevar a cabo estos ensayos, se determinó la sensibilidad a la ferrostatina-1 de las líneas de MM para seleccionar dosis que no fueran citotóxicas *per se*. Como puede apreciarse, ferrostatina-1 no resultó citotóxica para estas células hasta dosis superiores a $5 \mu\text{M}$ (*Figura 4.44*), por lo que se eligió una dosis inocua de $1 \mu\text{M}$ para los siguientes experimentos.

Sensibilidad a ferrostatina-1 de las líneas de MM (24 h)

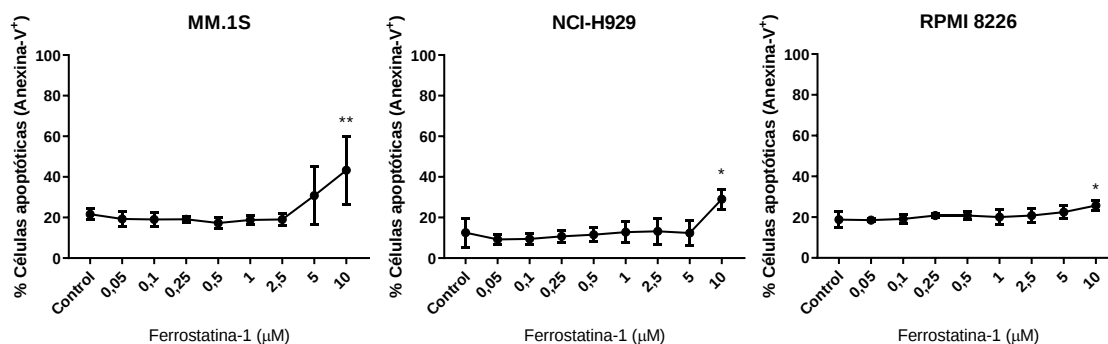


Figura 4.44. Sensibilidad de las líneas de MM a ferrostatina-1. Las células de MM se incubaron durante 24 horas con distintas concentraciones de ferrostatina-1. Transcurrido ese tiempo, se determinó la apoptosis producida analizando la exposición de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 3 experimentos diferentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Una vez escogida la concentración de ferrostatina-1, se realizaron los ensayos de citotoxicidad de la misma manera descrita previamente, aunque sin la necesidad del marcaje previo de las células NK-92-CD16 ya que estas células eran fluorescentes gracias a la expresión de la proteína ZsGreen. Se utilizó ferrostatina-1 como agente bloqueante sola, y también combinada con EGTA para inhibir la vía de degranulación.

En la Figura 4.45 se muestran los resultados obtenidos con la línea MM.1S en presencia y en ausencia de daratumumab. Se constató una vez más que las células NK-92-CD16 tenían mayor actividad citotóxica que las células NK-92 (66% y 89% de media a ratios 1-1 y 3-1, respectivamente, vs 41% y 75%, ver Figura 4.25). De hecho, la citotoxicidad inducida por las células NK-92-CD16 en solitario era tan alta que el aumento debido a la ADCC sólo se apreció a ratio 1-1 (81% de media de muerte celular). A ratio 3-1, tanto en presencia como en ausencia de daratumumab, se alcanzaron valores medios de muerte celular iguales o superiores al 90%. Por otra parte, ninguno de los agentes bloqueantes resultó tóxico por sí mismo (la viabilidad celular de los controles fue igual o superior al 90% de media).

En cuanto al efecto de los agentes bloqueantes, al igual que ocurría con las células parentales, hubo una inhibición completa con EGTA 5 mM a ratio 1-1 (de una media de muerte celular del 66% al 14%, similar al nivel de los controles) y casi completa a ratio 3-1 (de una media de muerte celular del 89% al 20%). En cambio, no hubo ningún efecto bloqueante ni de Fas-Fc y RIK-2, ni de ferrostatina-1, ya que ni por separado ni cuando se combinaron con EGTA se redujo la muerte celular producida.

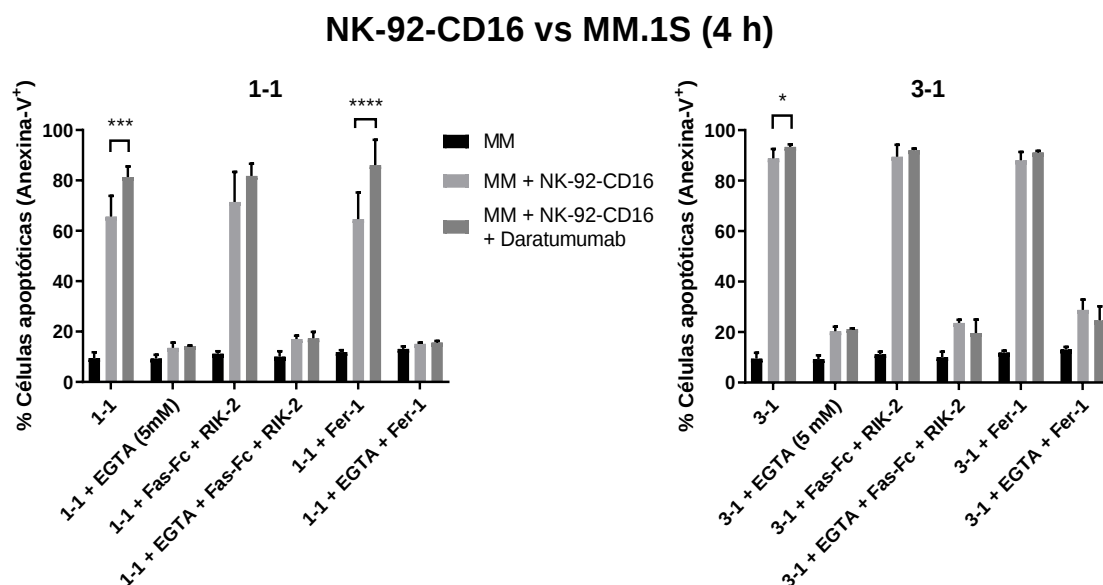


Figura 4.45. Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 durante 4 horas sobre la línea celular MM.1S. Las células NK-92-CD16 fueron preincubadas durante 1 hora con los distintos agentes bloqueantes, incluida ferostatina-1 (Fer-1), mientras que las células de MM se preincubaron 15 minutos con daratumumab (5 μ g/ml) en los casos indicados. Tras co-incubar las células durante 4 horas a diferentes ratios efector-diana, se determinó la muerte celular producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 3 experimentos distintos. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

En cuanto a los resultados con la línea NCI-H929 (Figura 4.46), éstos siguieron el mismo patrón observado en experimentos anteriores. Las células NK-92-CD16 produjeron más muerte celular *per se* que las células NK-92 (30% y 62% de citotoxicidad media a ratios 1-1 y 3-1, respectivamente, vs 19% y 36%, ver Figura 4.26). Además, se observó una significativa inducción de ADCC cuando se añadió daratumumab (5 μ g/ml) llegando a valores de citotoxicidad cercanos al 100% tanto a ratios 1-1 como 3-1. La menor sensibilidad de la línea NCI-H929 a las células NK-92-CD16 (en comparación con la línea MM.1S) combinada con su alta expresión de CD38 (ver Figura 4.6) podría explicar la ADCC incrementada para ambos ratios.

Los agentes bloqueantes no resultaron tóxicos *per se* (muerte celular promedio de los controles entre un 7% y un 10%) y tuvieron el mismo efecto que en la línea MM.1S (ver Figura 4.45). Hubo una inhibición de la citotoxicidad completa con EGTA (5 mM) a ratio 1-1 (de una muerte celular de 30% a 14%, al nivel de los controles) y casi completa a ratio 3-1 (muerte celular de 62% a 22%). En cambio, no hubo ningún efecto bloqueante ni de Fas-Fc y RIK-2, ni de ferostatina-1, solos o en combinación con EGTA (Figura 4.46).

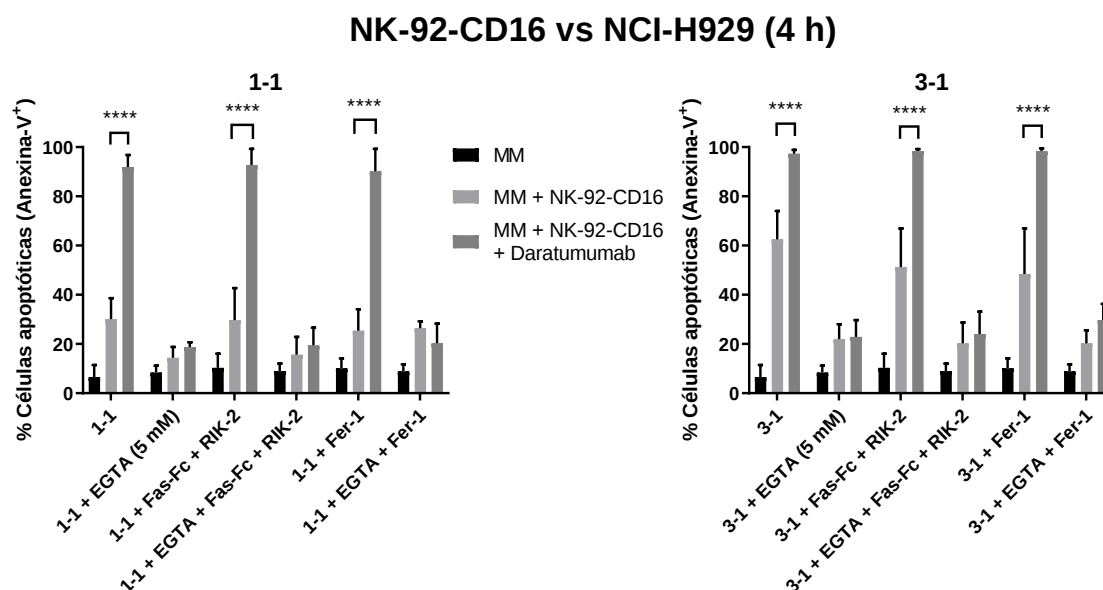


Figura 4.46. Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 durante 4 horas sobre la línea celular NCI-H929. Las células NK-92-CD16 fueron preincubadas durante 1 hora con los distintos agentes bloqueantes, incluida ferostatina-1 (Fer-1), mientras que las células de MM se preincubaron 15 minutos con daratumumab (5 μ g/ml) en los casos indicados. Tras co-incubar las células durante 4 horas a diferentes ratios efector-diana, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 3 experimentos diferentes. **** $p < 0,0001$.

En lo que respecta a las células RPMI 8226, que expresan bajos niveles de CD38 (ver Figura 4.6), y al contrario de lo encontrado con las células eNK (ver Figura 4.15), como puede apreciarse en la Figura 4.47 con las células NK-92-CD16 se produjo algo de ADCC (42% de muerte celular con daratumumab a ratio 1-1 en presencia de Fas-Fc y RIK-2 frente a 29% de media en las mismas condiciones pero sin daratumumab).

Este resultado es algo paradójico, ya que habíamos observado que las células eNK al expresar más CD38 que las células RPMI 8226 actuaban sobretodo de forma fratricida. En cambio, aunque las células NK-92-CD16 presentaban un nivel de expresión de CD38 mayor que el de las células eNK y que las células RPMI 8226 (ver Figura 4.6, Figura 4.11 y Figura 4.38), fueron capaces de realizar ADCC mediada por daratumumab. Aunque la diferencia de citotoxicidad observada entre las células RPMI 8226 co-incubadas con las células NK-92-CD16 y las co-incubadas con las células NK-92-CD16 en presencia de daratumumab no fue estadísticamente significativa, debido a la amplia SD, la tendencia fue manifiesta.

Los bloqueantes, de nuevo, no presentaron toxicidad por sí mismos (muerte celular en los controles entre 12% y 16%), similar a lo encontrado en las demás líneas de MM. El único agente capaz de inhibir la citotoxicidad fue EGTA (5 mM) a ratio 1-1 (muerte celular de 30% al 15%). A ratio 3-1 la inhibición fue parcial (muerte celular de 40% al 30%). No hubo ningún efecto

bloqueante ni de Fas-Fc ni RIK-2, ni de ferrostatina-1, ni por separado ni en combinación con EGTA.

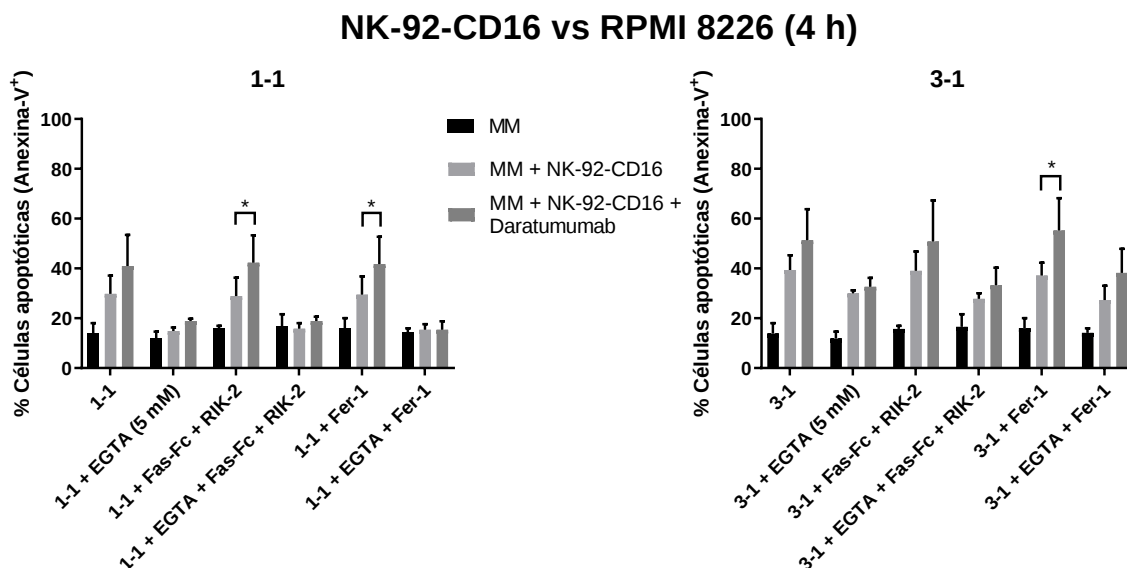


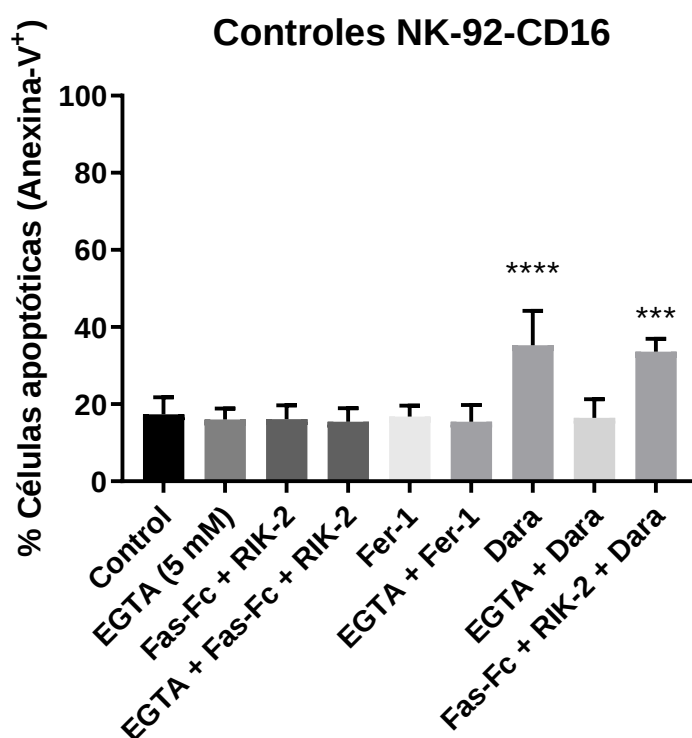
Figura 4.47. Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 durante 4 horas sobre la línea celular RPMI 8226. Las células NK-92-CD16 fueron preincubadas durante 1 hora con los distintos agentes bloqueantes, incluida ferrostatina-1 (Fer-1), mientras que las células de MM se preincubaron 15 minutos con daratumumab (5 μ g/ml) en los casos indicados. Tras co-incubar las células durante 4 horas a diferentes ratios efector-diana, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 3 experimentos distintos. * $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos con las tres líneas de MM, considerados en su conjunto, indican que a pesar de haberse detectado nuevamente la expresión intracelular de FasL y TRAIL por inmunoblot (ver Figura 4.42 y Figura 4.43), que incluso se incrementa en las células NK-92-CD16, estos ligandos no parecen contribuir a la citotoxicidad inducida por estas células con daratumumab.

El tratamiento con EGTA (5 mM) sí resultó eficaz en la inhibición de la citotoxicidad de las células NK-92-CD16 a 4 horas, lo que indica que el mecanismo de citotoxicidad empleado en esas condiciones por las células NK-92-CD16 fue el de la degranulación. La observación de que al pasar de ratio 1-1 a ratio 3-1 se perdiera parte del efecto inhibitor de EGTA es probable que se debiera al aumento de la cantidad de células efectoras, siendo la concentración de este reactivo insuficiente para bloquearlas a todas.

En experimentos independientes, realizados en paralelo, se comprobó que la actividad de las células NK-92-CD16 no se veía afectada por ninguno de dichos compuestos. Los resultados de todas las células NK-92-CD16 se recogen en la Figura 4.48.

El único agente que causó la muerte de las células efectoras fue el anticuerpo daratumumab, que indujo fratricidio debido al CD38 que expresan también ellas mismas (ver *Figura 4.38*). Este fratricidio fue inhibido por el efecto bloqueante de EGTA (5 mM) pero no por los agentes bloqueantes de FasL y TRAIL y tampoco por ferrostatina-1, del mismo modo que lo observado en las líneas de MM.



*Figura 4.48. Citotoxicidad de los distintos agentes bloqueantes y daratumumab sobre las células NK-92-CD16 durante 4 horas. Las células NK-92-CD16 se preincubaron durante 1 hora con los distintos agentes bloqueantes, incluida ferrostatina-1 (Fer-1). Después, en los casos indicados se añadió daratumumab (Dara, 5 µg/ml), y todas las células se incubaron durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células NK-92-CD16 anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media ± SD de 9 experimentos distintos. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.*

Aunque con los resultados de la *Figura 4.45*, de la *Figura 4.46* y de la *Figura 4.47* se descartó la posibilidad de que la ferroptosis participara en la muerte celular producida, se podría estar cometiendo un error experimental. En los experimentos mencionados, la muerte celular producida se determinó en base al marcaje por citometría de flujo de la exposición en membrana de PS. Este evento es un marcador biomolecular de la apoptosis (D. Tang et al., 2019; Taylor et al., 2008), pero en realidad la ferroptosis no cursa con exposición de PS, sino con daño de membrana entre otros marcadores (D. Tang et al., 2019; B. Yan et al., 2021).

En consecuencia, se realizó otro experimento de citotoxicidad con las células NK-92-CD16 sobre las tres líneas de MM llevando a cabo un doble marcaje con anexina-V DY634 y con 7-aminoactinomicina D (7AAD), una sonda fluorescente muy utilizada como marcador de muerte producida por daño o permeabilización de la membrana. Estos ensayos de citotoxicidad se realizaron tanto con las células NK-92-CD16 en solitario como combinadas con daratumumab.

En la *Figura 4.49* puede comprobarse que en realidad el componente exclusivamente necrótico o necroptótico marcado sólo con 7AAD fue residual. La muerte inducida por las células NK-92-CD16 sobre las líneas celulares de MM era esencialmente apoptótica, tal y como reflejaba el hecho de que casi la totalidad de las células muertas presentasen marcaje con anexina-V DY634. Por lo tanto, se confirmó que la implicación de la ferroptosis en la citotoxicidad de estas células era nula.

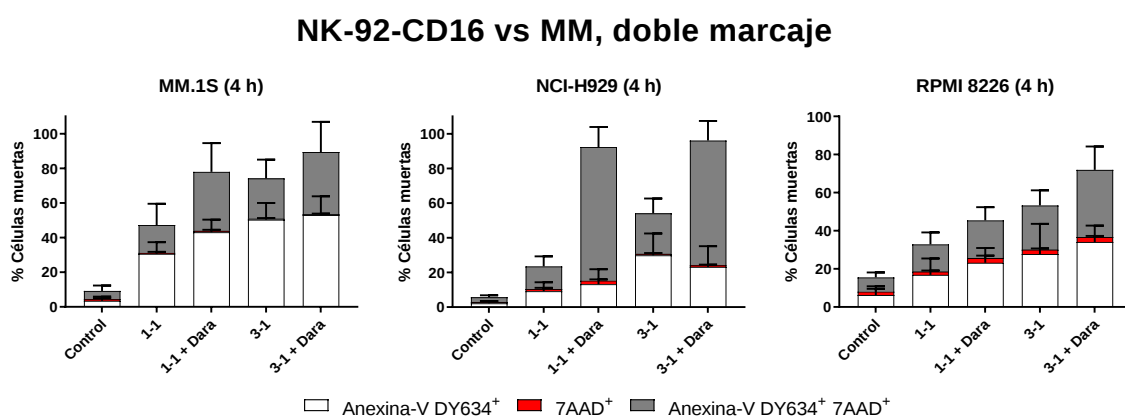


Figura 4.49. Doble marcaje de la citotoxicidad de las células NK-92-CD16 durante 4 horas sobre las líneas celulares de MM. Las células de MM se preincubaron 15 minutos con daratumumab (Dara, 5 µg/ml) en los casos indicados. Tras co-incubar las células durante 4 horas a diferentes ratios efector-diana se determinó la muerte celular producida mediante un doble marcaje por citometría de flujo con anexina-V DY634 y 7AAD. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM muertas. Los resultados se muestran como la media ± SD de cada tipo de marcaje en 3 experimentos distintos.

Seguidamente, se analizó la potencia citotóxica de las células NK-92-CD16 en solitario o en combinación con daratumumab, reduciendo progresivamente la relación entre células efectoras y diana desde 3-1 hasta 1-10 en los experimentos de citotoxicidad durante 4 horas. En la *Figura 4.50* se muestran los diferentes resultados obtenidos con las tres líneas celulares de MM.

En el caso de la línea MM.1S, la más sensible a la toxicidad inducida por las células NK-92-CD16, se observó un incremento prácticamente lineal de la muerte celular producida al aumentar el ratio efector-diana desde 1-4 a 3-1. Cuando las células NK-92-CD16 se combinaron con daratumumab la muerte celular aumentó debido a la ADCC, pero se mantuvo esa misma tendencia casi lineal. De hecho, el incremento de la muerte celular debida a la ADCC resultó casi constante, con un incremento medio en torno al 15%. A ratio 3-1 las células NK-92-CD16 en presencia de daratumumab eliminaron en 4 horas a más del 90% de las células de MM. Por otro lado, al ratio efector-diana más bajo analizado (1-10) las células NK-92-CD16 con daratumumab fueron capaces de eliminar hasta un 40% de la población tumoral en 4 horas.

Por su parte, las células NCI-H929, poco sensibles en general a las células NK, confirmaron una vez más esa baja sensibilidad. En la *Figura 4.50* se muestra que a ratios inferiores a 1-1 la citotoxicidad ejercida por las células NK-92-CD16 fue insignificante, aunque ésta aumento exponencialmente al incrementar los ratios efector-diana. Al aumentar el ratio hasta 3-1 se consiguió un efecto citotóxico significativo (54% de muerte celular). Al añadir daratumumab a las co-incubaciones la muerte celular aumentó en gran medida gracias a la ADCC, debido a la alta cantidad de CD38 expresada por estas dianas (*Figura 4.6*).

Por ejemplo, a ratios efector-diana superiores a 1-3 hubo un incremento de más del 60% en la muerte celular gracias a la ADCC. El punto de mayor diferencia fue el de ratio 1-1 (del 23% al 92% de muerte celular con daratumumab). En tan sólo 4 horas en presencia de daratumumab, a ratio 3-1, se eliminaron prácticamente todas las células de MM (96% de muerte celular) y aun a ratio 1-10, en presencia de daratumumab, se consiguió eliminar al 40% de las células de MM.

En cuanto a la línea RPMI 8226, los resultados no fueron tan positivos. En ausencia de anticuerpo su comportamiento se asemejó al de la línea NCI-H929. La citotoxicidad de las células NK-92-CD16 fue mínima, aunque fue aumentado algo al incrementar los ratios efector-diana. Al añadir daratumumab se detectó de nuevo ADCC a ratios 1-1 y 3-1, de manera más significativa que en los experimentos anteriores (*ver Figura 4.47*). No obstante, conforme disminuyó la proporción de células efectoras respecto a las células diana el efecto de la ADCC desapareció. Probablemente, las pocas células efectoras actuando sobre células diana poco sensibles debido a la poca expresión de CD38 no fueron capaces de producir un efecto citotóxico significativo.

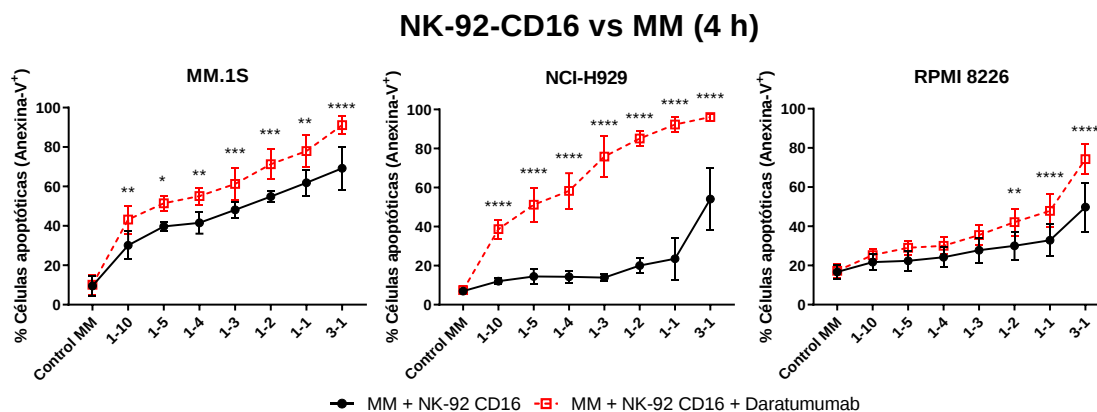


Figura 4.50. Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 durante 4 horas sobre las líneas celulares de MM, en función del ratio entre células efectoras y dianas. Las células de MM se preincubaron durante 15 minutos con daratumumab (5 µg/ml) en las condiciones indicadas. Tras co-incubar las células durante 4 horas a diferentes ratios efector-diana se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media ± SD de 4 experimentos diferentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

A continuación, se repitieron los experimentos incrementando el tiempo de co-incubación de las células hasta las 24 horas con el fin de intentar aumentar la citotoxicidad. No se evaluaron a 24 horas los ratios efector-diana que a las 4 horas ya habían presentado citotoxicidades muy altas (ratios 1-1 y 3-1). Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 4.51.

A las 24 horas las células MM.1S mantuvieron a grandes rasgos el comportamiento observado a las 4 horas. La relación entre el incremento en el ratio efector-diana y el aumento de la muerte celular mostró nuevamente una tendencia lineal, sobre todo cuando se añadió daratumumab, y el incremento que produjo la ADCC (alrededor del 14%) fue otra vez prácticamente constante e independiente del ratio. Ese incremento también fue independiente del tiempo de co-incubación de las células (alrededor del 15% a las 4 horas vs 14% a las 24 horas), lo que indica que la muerte inducida por ADCC era muy rápida. Comparando las curvas de citotoxicidad a 4 y 24 horas se puede apreciar un aumento del porcentaje de muerte celular a tiempos de co-incubación más prolongados. Dicho aumento con respecto al tiempo fue prácticamente idéntico en todas las condiciones y ratios (alrededor de un 26-27%) y supuso en algunas condiciones, a pesar de tener menos células efectoras que dianas, eliminar casi por completo a las células de MM en 24 horas (92% de media de muerte celular a ratio 1-2 por ejemplo). Aunque esta circunstancia no se repitió en todas las condiciones, sí se alcanzaron importantes resultados teniendo en cuenta las pocas células NK-92-CD16 enfrentadas a los tumores (por ejemplo, 71% de media de citotoxicidad a ratio 1-10 en presencia de daratumumab).

En cuanto a las células NCI-H929, los resultados fueron diferentes a los observados en los experimentos a 4 horas (ver Figura 4.50). Si entonces las células NK-92-CD16 sin daratumumab tenían una actividad casi inapreciable en ratios por debajo de 1-1, a las 24 horas

tuvieron un efecto significativo. A partir del ratio 1-5 se superó el 40% de citotoxicidad, llegándose hasta aproximadamente un 85% de muerte celular a ratio 1-2. En lo que respecta a la ADCC, a los ratios efector-diana más bajos (1-10, 1-5 y 1-4) se apreció un aumento con respecto al tiempo de co-incubación: alrededor de un 20% más de muerte celular respecto a la observada a las 4 horas. Los resultados obtenidos a 4 y 24 horas, a bajos ratios efector-diana, indican que la adición de daratumumab acelera la citotoxicidad sobre esta línea celular, logrando un efecto comparable al obtenido con las células NK-92-CD16 en solitario, a ratios superiores.

Por último, la citotoxicidad sobre la línea RPMI 8226 aumentó algo a las 24 horas. La muerte celular producida pasó de un 30% a las 4 horas a un 67% a las 24 horas, a un ratio efector-diana 1-2. Respecto a la ADCC, ésta mejoró sólo significativamente a los ratios efector-diana más bajos (1-10 y 1-5).

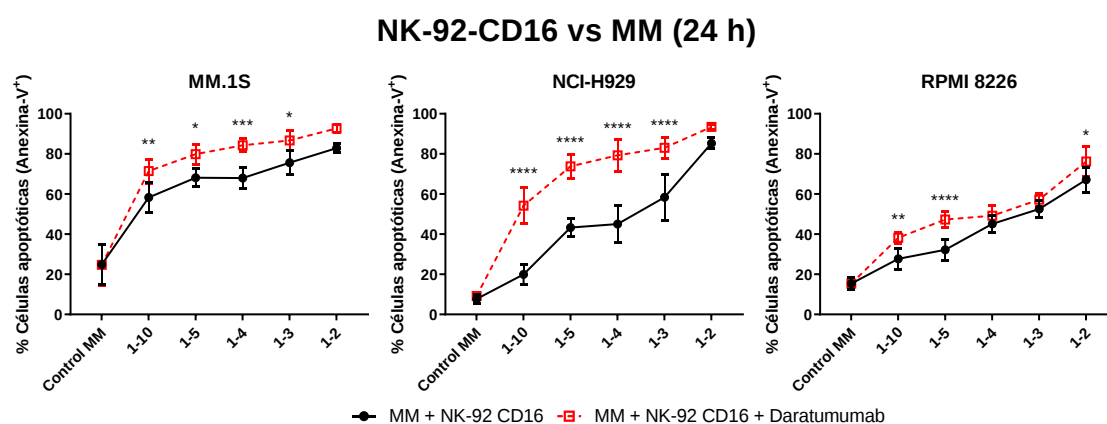


Figura 4.51. Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 durante 24 horas sobre las líneas celulares de MM, en función del ratio entre células efectoras y dianas. Las células de MM se preincubaron durante 15 minutos con daratumumab (5 µg/ml) en las condiciones indicadas. Tras co-incubar las células durante 24 horas a diferentes ratios efector-diana se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media ± SD de 3 experimentos diferentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Los resultados de ambos experimentos demostraron que las células NK-92-CD16 pueden ser muy eficaces incluso a ratios efector-diana relativamente bajos (1-10), especialmente sobre las líneas que expresan altos niveles de CD38, como MM.1S y NCI-H929. Dado el poco incremento de citotoxicidad inducida por daratumumab observado en los experimentos realizados sobre la línea celular RPMI 8226, que expresa bajos niveles de CD38 (ver Figura 4.6), se decidió seguir analizando sólo el comportamiento de las otras dos líneas celulares (MM.1S y NCI-H929).

Se estudió a continuación la actividad de la línea NK-92-CD16 en cultivos tridimensionales frente a la de los cultivos convencionales (bidimensionales), denominados en adelante como “cultivos en 2D”. En estos últimos, las células efectoras y diana se co-incubaban

en suspensión al añadir las a los pocillos, y luego decantaban por gravedad en el fondo de los pocillos. De esa manera podría argumentarse que las altas citotoxicidades conseguidas pudieran deberse, en parte, al enfrentamiento forzado entre las células NK-92-CD16 y sus dianas y que esta situación no sucedería en condiciones fisiológicas.

Para comprobar cómo sería el comportamiento de las células NK-92-CD16 en unas condiciones experimentales que se asemejaran más a las fisiológicas, se empleó el hidrogel GrowDex®. Este gel se utilizó para realizar experimentos de citotoxicidad celular en condiciones denominadas en adelante como “cultivos en 3D”. En este tipo de cultivos las células de MM fueron embebidas en la matriz del hidrogel, y las células NK-92-CD16 se añadieron sobre él externamente (ver apartado 3.4.7).

Ambos tipos de condiciones experimentales (cultivos en 2D y 3D) se analizaron en paralelo para compararlas adecuadamente. Para dar oportunidad a que las células NK-92-CD16 se infiltraran a través de la matriz, y reconocieran a sus dianas, se realizaron experimentos de 24 horas de incubación.

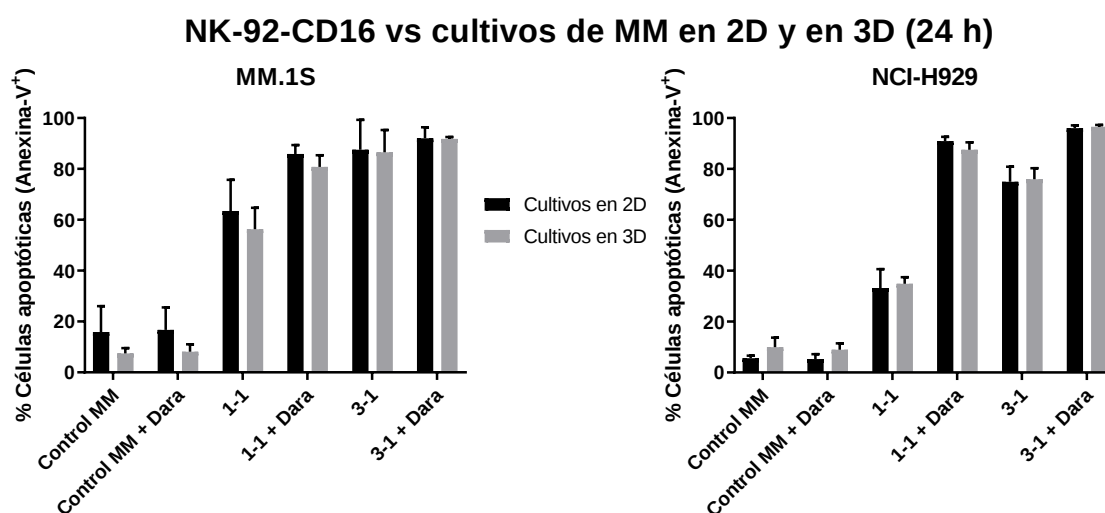


Figura 4.52. Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 en cultivos en 2D y en 3D. Las células de MM se resuspendieron en el hidrogel GrowDex® y se sembraron embebidas en él. En los casos indicados, las células de MM fueron preincubadas con daratumumab (Dara, 5 µg/ml). Las células NK-92-CD16 se añadieron en suspensión sobre el correspondiente hidrogel. Tras cultivarlas durante 24 horas a diferentes ratios efector-diana, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media ± SD de 3 experimentos diferentes.

Los resultados obtenidos con las células MM.1S y NCI-H929 se recogen en la Figura 4.52. En ella se puede comprobar que, en experimentos de 24 horas, no se observaron diferencias significativas entre la magnitud de la muerte celular producida en ambos tipos de cultivo en cualquiera de las dos líneas de MM.

Se puede concluir, por lo tanto, que en las condiciones experimentales empleadas las células NK-92-CD16 fueron capaces de infiltrarse a través de la matriz tridimensional y encontrar y matar a las células de MM, validando los resultados anteriores obtenidos utilizando cultivos bidimensionales.

4.4.4 Estabilidad de la expresión de CD16 y ZsGreen en la línea celular NK-92-CD16

Desde el momento en que se realizó la transfección de las células NK-92 con el plásmido pHIV-CD16-ZsGreen, se analizó de manera rutinaria la expresión de CD16 en las células obtenidas y este análisis periódico se mantuvo durante todo el periodo de realización de esta tesis doctoral. De esta forma se monitorizó cómo evolucionaba la población de células NK-92-CD16 y si la expresión de las dos proteínas transfectadas se mantenía estable o se iba perdiendo con el tiempo. La *Figura 4.53* recoge la evolución de la expresión de CD16 y ZsGreen durante un periodo aproximado de casi dos años.

En dicho gráfico se puede observar un rápido incremento del porcentaje de células positivas desde los reducidos valores iniciales, debidos a la baja eficiencia de transfección (ver *Figura 4.31*), y como tras las rondas de selección, una vez alcanzado un alto nivel de expresión, el porcentaje de células que expresaban las proteínas se mantuvo siempre por encima del 80% y en la mayor parte de las veces por encima del 90%. Cada proceso de enriquecimiento por citometría de flujo (*sorting*) se indica con una línea roja discontinua vertical, mientras que las líneas discontinuas horizontales naranja y verde indican el 80% y 90% del nivel de expresión respectivamente.

En ocasiones el porcentaje de células que expresaban el transgen fluctuó ligeramente, pero ese hecho se puede atribuir más bien a variaciones en la viabilidad de los cultivos. Tal y como se indicó al describir el comportamiento de la línea parental NK-92, estas células son muy sensibles al agotamiento de nutrientes del medio de cultivo o a la privación de IL-2. Si se producía alguna de esas circunstancias se observaba que algunas células empezaban a morir y perdían la expresión en membrana de CD16. Sin embargo, una vez renovado el medio de cultivo y tras la adición de IL-2 se recuperaba la viabilidad y la expresión de CD16. Por todo ello, la expresión de CD16 y ZsGreen en la línea NK-92-CD16 se consideró estable.

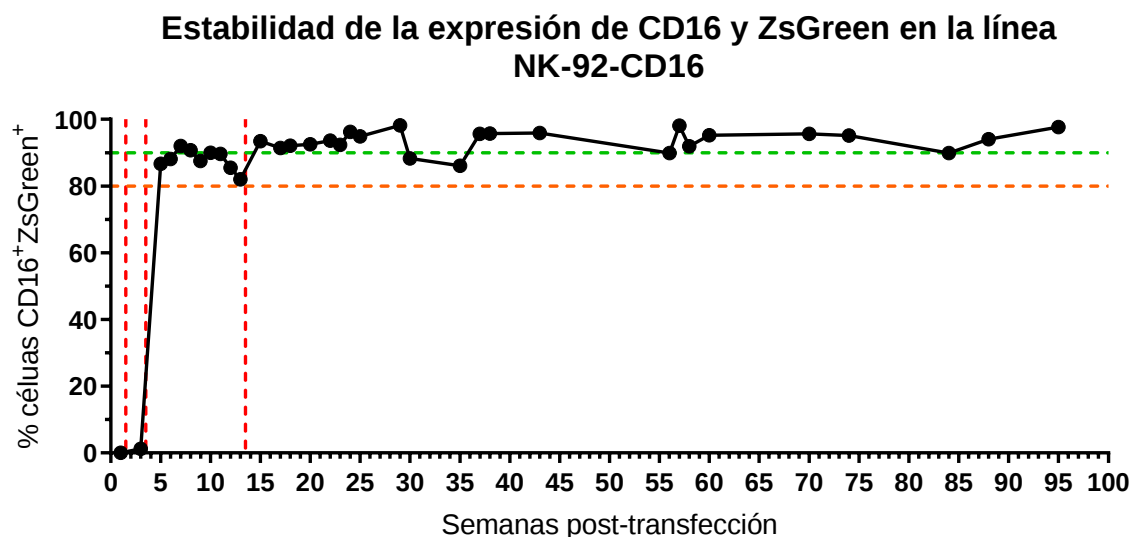


Figura 4.53. Evolución temporal de la expresión de CD16 y ZsGreen en las células NK-92-CD16. La expresión de ambas proteínas se determinó por citometría de flujo. En el gráfico se representa, en el eje de ordenadas, el porcentaje de células doble positivas (CD16⁺ZsGreen⁺) y en el de abscisas el tiempo en cultivo. Las líneas discontinuas verticales rojas indican los momentos en los que las células transfectadas se seleccionaron por citometría de flujo (sorting). A su vez, las líneas discontinuas horizontales naranja y verde indican el 80% y 90% de nivel de expresión, respectivamente.

4.4.5 Evaluación del potencial terapéutico de las células NK-92-CD16 en células de pacientes de mieloma múltiple

El conjunto de los experimentos mostrados en el apartado 4.4.3 demostró una gran capacidad citotóxica de las células NK-92-CD16 sobre las líneas celulares de MM, especialmente al combinarlas con daratumumab incluso a ratios efector-diana relativamente bajos. Estos datos sugerían que este tratamiento podría tener una aplicación terapéutica a nivel clínico, *a priori*.

No obstante, había que considerar que estas células se habían generado a partir de las células NK-92 y por tanto carecían de los principales receptores inhibitorios (Maki et al., 2001; Suck et al., 2016; Williams et al., 2017). Esto, unido a la alta actividad de estas células podría suponer un riesgo de citotoxicidad sobre las células sanas del organismo.

Para evaluar esta posibilidad, se analizó la citotoxicidad de las células NK-92-CD16 sobre PBMCs quiescentes y células activadas con PHA (blastos) obtenidas de donantes sanos. Estas células se encuentran principalmente en la circulación sanguínea, al igual que las células NK-92-CD16 que se pudieran infundir, y por lo tanto sería fácil que interaccionasen entre sí en caso de su uso terapéutico. Los experimentos se realizaron a diferentes ratios efector-diana, utilizando ratios tan altos como 5-1.

En la *Figura 4.54* se muestran los resultados obtenidos con las PBMCs. De la misma forma que ocurría al generar las células eNK a partir de PBMCs, se apreciaron diferencias de sensibilidad individuales debido a la idiosincrasia de cada donante. Las PBMCs del donante 2 fueron, por ejemplo, más sensibles a las células NK-92-CD16 que las del resto de donantes. Aun así, la muerte celular media producida durante 4 horas sobre las PBMCs del donante 2 al mayor de los ratios (5-1, 29%) fue baja.

En comparación con los resultados obtenidos sobre las tres líneas de MM, la media de los valores de la muerte celular producida sobre todas las PBMCs a ratio 5-1 (17%) fue bastante menor que la producida a ratio 1-1 sobre las células MM.1S, NCI-H929 y RPMI-8229 (62%, 24% y 33% de media respectivamente, ver *Figura 4.50*).

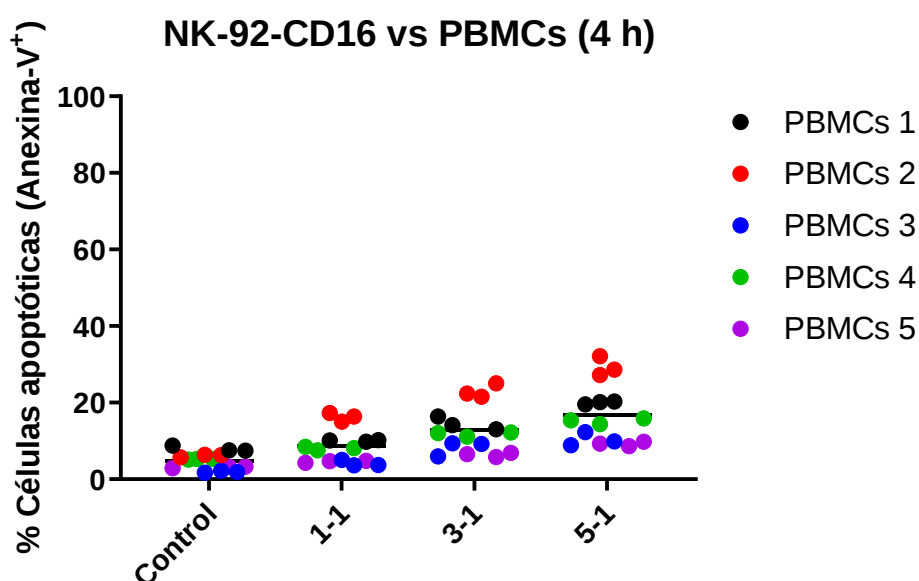


Figura 4.54. Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 durante 4 horas sobre linfocitos (PBMCs) de donantes sanos. Las células NK-92-CD16 se co-incubaron durante 4 horas con PBMCs de distintos donantes a diferentes ratios efector-diana. Después, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. El gráfico representa el porcentaje de PBMCs anexina-V DY634⁺ en cada caso. Los resultados se muestran como los valores individuales de cada experimento y la media global de todas las PBMCs de los diferentes donantes.

Con respecto al estudio sobre blastos (*Figura 4.55*), los resultados fueron más homogéneos que los obtenidos sobre las PBMCs (*Figura 4.54*). Aunque los valores medios de la muerte celular fueron ligeramente más elevados en todas las condiciones (incluso el control) respecto a las PBMCs, las observaciones fueron en esencia las mismas. La media de los valores de la muerte celular producida sobre todos los blastos a ratio 5-1 (20%) fue bastante menor que la muerte celular producida a ratio 1-1 sobre las células MM.1S, NCI-H929 y RPMI-8229 (62%, 24% y 33% de media respectivamente, ver *Figura 4.50*).

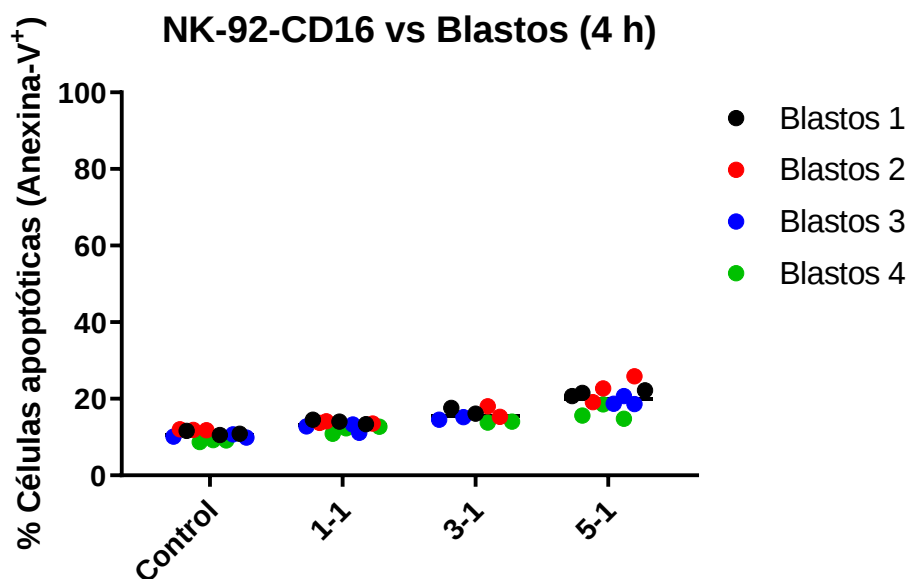


Figura 4.55. Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 durante 4 horas sobre linfocitos activados con PHA (blastos) procedentes de donantes sanos. Las células NK-92-CD16 se co-incubaron durante 4 horas con blastos de distintos donantes a diferentes ratios efector-diana. Después, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. El gráfico representa el porcentaje de blastos anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como los valores individuales de cada experimento y la media global de todos los blastos de los diferentes donantes.

Los resultados obtenidos con las PBMCs y los blastos indicaron que las células NK-92-CD16 son en gran medida selectivas sobre las células tumorales sin necesidad de ser direccionadas por un mAb, incluso utilizando cinco veces más células NK-92-CD16 que con las líneas de MM. Por ello, las células NK-92-CD16 no supondrían un riesgo significativo para los pacientes que se pudieran someter a esta terapia celular adoptiva.

Después de haber comprobado la escasa toxicidad de las células NK-92-CD16 sobre las células sanas, se analizó su efecto sobre muestras procedentes de pacientes de MM (ver apartado 3.4.8). Las muestras de aspirados de médula ósea de los pacientes de MM se centrifugaron en un gradiente de Ficoll (ver apartado 3.1.8) para purificar las BMMCs. Para determinar la cantidad de células plasmáticas de MM presentes en las BMMCs se analizó la presencia de CD38 en su membrana por citometría de flujo.

Por otro lado, la expresión de ZsGreen por parte de las células NK-92-CD16 permitió diferenciarlas de las BMMCs en el análisis por citometría de flujo. En la Figura 4.56A se muestra un ejemplo ilustrativo de la señal de ZsGreen obtenida por citometría de flujo en las células NK-92-CD16, así como la de las BMMCs sin ZsGreen (Figura 4.56B) y la distinción entre ambas poblaciones una vez co-incubadas para realizar el experimento (Figura 4.56E).

No obstante, para poder distinguir a las células plasmáticas de MM del resto de células mononucleares presentes en los aspirados medulares fue preciso hacer otro marcaje de membrana. En este caso no se pudo emplear el marcaje de CD38, ya que al ser la diana de daratumumab y haber estado en cultivo 4 horas con él, los epítomos para el anticuerpo del marcaje estarían ocupados o habría competición. Por lo tanto, se eligió la molécula CD138, un marcador molecular de membrana bastante específico de las células de MM, para identificarlas. En la *Figura 4.56C* y en la *Figura 4.56F* se muestra un ejemplo ilustrativo de los marcajes de CD138 de las BMMCs en solitario o co-incubadas con las células NK-92-CD16. Tras seleccionar la población de células de MM gracias al marcaje con CD138 se analizó en ellas la muerte celular producida gracias al marcaje con anexina-V DY634.

Los resultados obtenidos con las muestras de células plasmáticas de 20 pacientes de MM distintos aparecen recogidos en la *Figura 4.57*. En esta ocasión, como algunas de las muestras presentaban un porcentaje basal de muerte celular se determinó la muerte específica restando a la muerte celular de cada condición experimental la muerte de sus respectivos controles. En el gráfico puede apreciarse como las células NK-92-CD16, a los dos ratios ensayados, con y sin daratumumab, produjeron una muerte específica significativa. Con el ratio 3-1 se obtuvieron mejores resultados que con el ratio 1-1, y la presencia de daratumumab aumentó significativamente la citotoxicidad tanto a ratio 1-1 como a 3-1. En general, a ratio 3-1 en presencia de daratumumab se consiguió eliminar específicamente alrededor del 40% de las células de MM en tan sólo 4 horas, aunque se observó una mayor toxicidad en algunos casos individuales.

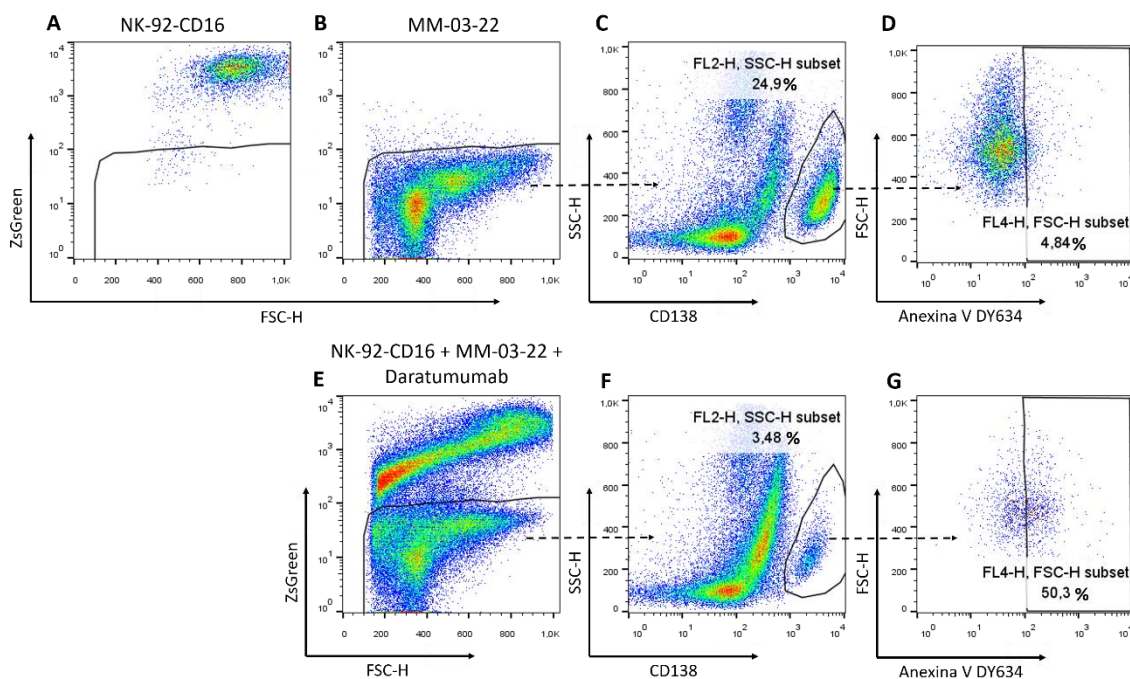


Figura 4.56. Esquema del análisis de la citotoxicidad ejercida por las células NK-92-CD16 sobre las células plasmáticas de pacientes de MM por citometría de flujo. En la figura se muestra como ejemplo el caso de la co-incubación de las células NK-92-CD16 con las células procedentes del paciente MM-03-22, tratadas con daratumumab. En (A) se muestra la fluorescencia de la proteína ZsGreen expresada por las células NK-92-CD16. Las células diana MM-03-22 que no expresan dicha proteína se muestran en el panel (B). En el panel (C) se recoge el marcaje con un mAb específico anti-CD138 en la membrana de las células de MM. El porcentaje de positividad se refiere a las BMMCs con alta expresión de CD138, que se corresponden con las células de MM en la muestra. La muerte celular en esta población se estimó evaluando la translocación de PS por marcaje con anexina-V DY634 y análisis por citometría de flujo (D). En este caso, ambas poblaciones se mezclaron a un ratio efector-diana 3-1 y se co-incubaron durante 4 horas en presencia de daratumumab. Finalizado ese tiempo, la fluorescencia de ZsGreen permitió distinguir entre las células NK-92-CD16 y las del paciente (E). En el panel (F) se recoge el porcentaje de BMMCs con alta expresión de CD138 remanentes, y que corresponden a las células de MM restantes en la muestra. Por último, para determinar la muerte de las células de MM producida por las células NK-92-CD16 se analizó la translocación de PS mediante marcaje con anexina-V DY634 de las células CD138⁺, por citometría de flujo (G). El porcentaje se refiere a las células de MM anexina-V DY634⁺.

Es interesante señalar que varias de las muestras analizadas procedían de pacientes que habían sufrido una recaída. En particular, las muestras MM-06-22 (recaída tras 2 líneas de tratamiento), MM-08-22 (recaída) y MM-18-22 (recaída tras 4 líneas de tratamiento). En los dos últimos casos se puede observar (Figura 4.57) como la sensibilidad inicial del tumor a las células NK-92-CD16, a ratio 3-1, era casi nula al igual que la muestra MM-10-22, de nuevo diagnóstico. No obstante, al añadir daratumumab se consiguió un importante incremento en la muerte celular

específica, gracias a la ADCC (por ejemplo, más de un 60% de muerte específica a ratio 3-1 en la muestra MM-18-22).

NK-92-CD16 vs células plasmáticas de pacientes de MM (4 h)

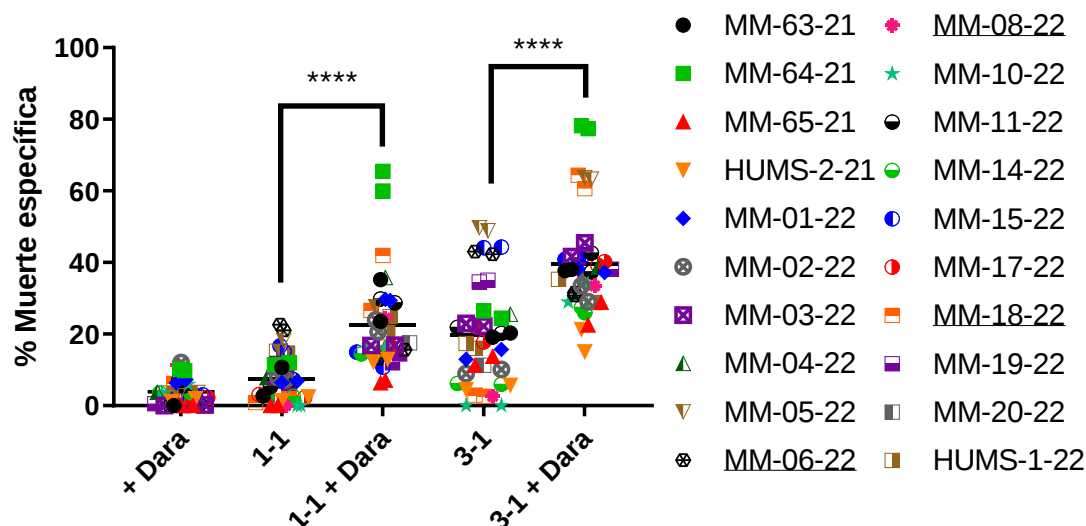


Figura 4.57. Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 sobre las células de MM procedentes de pacientes durante 4 horas. Las muestras procedentes de pacientes que habían sufrido una recaída se muestran subrayadas. En las condiciones indicadas, las BMMCs se preincubaron durante 15 minutos con daratumumab (Dara, 5 µg/ml). Tras co-incubarlas con las células NK-92-CD16 a diferentes ratios efector-diana durante 4 horas, se determinó la apoptosis producida evaluando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan la muerte celular específica, calculada para cada muestra restando el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺ del control al porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺ totales en cada condición. Los resultados se muestran como los valores individuales de cada experimento y la media de cada grupo de valores. ****p<0,0001.

Un análisis más detallado del papel de la ADCC en el incremento de la muerte observada en presencia de daratumumab indicó que las muestras MM-64-21, MM-05-22 y MM-18-22 fueron las más sensibles, mientras que las muestras HUMS-2-21 y MM-65-21 fueron de las más resistentes. También se observó que, sorprendentemente, en las muestras MM-06-22 y MM-15-22 la adición de daratumumab disminuía la muerte específica. Por ello se analizó si estos resultados se podían interpretar en función del nivel de expresión de CD38 en las células plasmáticas de cada muestra, a semejanza de lo observado en las líneas celulares de MM. El nivel de expresión de CD38 en las 20 muestras de pacientes analizadas se muestra en la Figura 4.58.

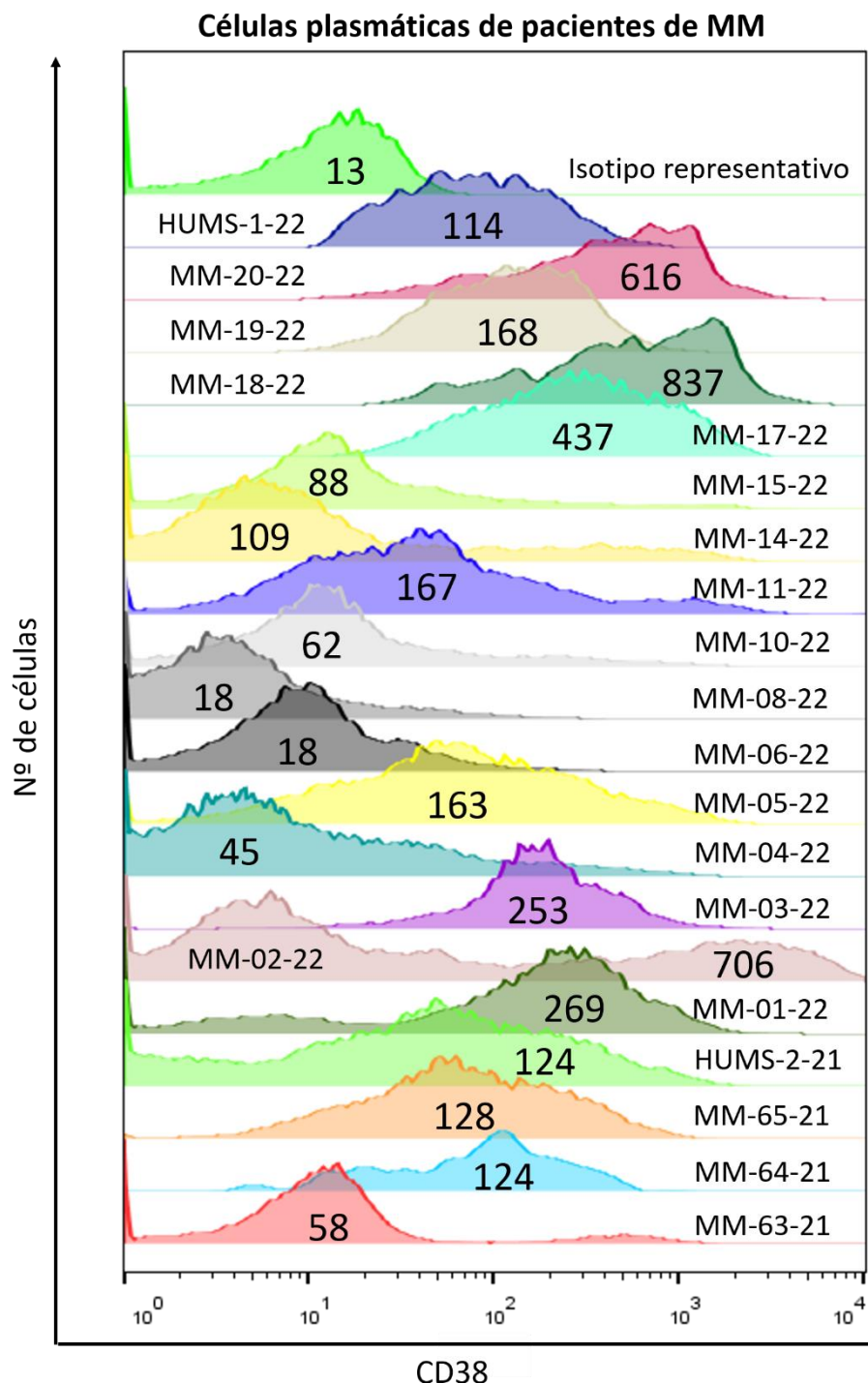


Figura 4.58. Expresión de CD38 en la membrana de las células plasmáticas de los pacientes de MM. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y el eje de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. La identificación de cada muestra se indica en uno de los laterales de la figura y el valor de su correspondiente MFI en el interior del área del histograma.

Atendiendo tanto a los histogramas como a la MFI de las diferentes muestras, puede verse que existía un perfil de expresión de CD38 variado entre todas ellas. Las que más CD38

expresaron fueron las muestras MM-02-22 (MFI: 706), MM-17-22 (MFI: 437), MM-18-22 (MFI: 837) y MM-20-22 (MFI: 616), mientras que las que menos CD38 expresaban fueron las muestras MM-63-21 (MFI: 58), MM-04-22 (MFI: 45), MM-06-22 (MFI: 18), MM-08-22 (MFI: 12) y MM-10-22 (MFI: 62). En la muestra MM-18-22 el alto nivel de citotoxicidad observado se correlacionaba con el elevado nivel de expresión de CD38. Sin embargo, las cinco muestras que mostraban los menores niveles de expresión de CD38 presentaban valores de muerte específica en presencia de daratumumab en torno a la media general, a pesar de su baja expresión de CD38. Este resultado sugiere que utilizar únicamente el nivel de expresión de CD38 no sirve para predecir la respuesta a células NK, *ex vivo*, coincidiendo con observaciones previas al respecto (Nooka et al., 2019), y que los ligandos de activación expresados en las células de MM también estarían interviniendo.

No obstante, el nivel de expresión de CD38 sirvió para explicar otros fenómenos. La muestra MM-18-22, constituida por células resistentes a 4 tandas de tratamiento, *in vivo*, y a las células NK-92-CD16, era una de las muestras más sensibles a daratumumab y mostraba una elevada expresión de CD38 (MFI: 837). En cuanto a las demás muestras de pacientes que habían sufrido recaídas, MM-06-22 y MM-08-22, expresaban bajos niveles de CD38 (MFIs de 18 y 12, respectivamente). En el momento de redactar esta tesis se desconoce si entre los tratamientos previos que recibieron estos pacientes se encontraba el anticuerpo daratumumab, por lo que no se pudo saber si esa baja expresión se debía a la eliminación previa de las células con mayores niveles de expresión de CD38, produciéndose una selección de células de MM con baja expresión de CD38. De todas formas, la muestra MM-08-22 co-incubada con células NK-92-CD16 a ratio 3-1 y en presencia de daratumumab pasó de valores de muerte específica casi nulos a valores en torno a la media general.

Por otra parte, las muestras MM-06-22 y MM-15-22 redujeron su muerte específica inducida por las células NK-92-CD16 cuando el ensayo se realizó en presencia de daratumumab. Este resultado podría correlacionarse con su baja expresión de CD38. Esa circunstancia, junto con el conjunto de ligandos activadores e inhibitorios de las células de MM favorecerían el fratricidio de las células NK-92-CD16 en vez del ataque al tumor. Finalmente, la muestra MM-10-22, de nuevo diagnóstico, fue completamente resistente a la acción de las células NK-92-CD16, pero resultó muy sensible a la adición de daratumumab, a pesar de expresar un nivel bajo de CD38 (MFI: 62).

En su conjunto, los resultados (*ver Figura 4.57*) indicaron una citotoxicidad significativa de las células NK-92-CD16, con casos de hasta un 80% de eliminación de las células de MM, especialmente en presencia de daratumumab, como en el caso del paciente MM-64-21 a ratio 3-1, aunque la media general estuvo en torno al 40%. Si se comparan los resultados obtenidos con las células de pacientes con los obtenidos utilizando las líneas celulares de MM, con éstas últimas se conseguían mayores niveles de muerte celular. Hay que tener en cuenta que, en las líneas celulares, todas las células eran tumorales mientras que, las muestras de pacientes (BMMCs) estaban compuestas por una mezcla de células plasmáticas y una gran cantidad de

células sanas presentes en el aspirado medular. En esta mezcla celular hay muchas células insensibles a las células NK-92-CD16. Además, es probable que estuvieran presentes células inmunosupresoras (Serrano Del Valle et al., 2022), lo que podría explicar el menor efecto tóxico de las células NK-92-CD16 sobre las células de pacientes. No obstante, habría que tener otro factor en cuenta. Podría suceder que en el análisis por citometría de flujo se estuviera subestimando la cantidad de muerte celular producida. Por un lado, algunas células de MM quedan destruidas y fragmentadas como resultado de la acción citotóxica de las células NK-92-CD16 y sus restos eran considerados como restos celulares por el citómetro de flujo. Por otro lado, porque las células de MM al morir pierden la expresión de CD138 en la membrana (Jourdan et al., 1998) al igual que ocurre con otras proteínas y como se ha observado en este trabajo con CD16.

En el esquema de análisis de las citometrías de flujo mostrado en la *Figura 4.56* hay un claro ejemplo de este fenómeno. En todos los experimentos de citotoxicidad realizados la cantidad de células diana sembradas fue siempre la misma (50.000 células de MM/pocillo), mientras que la cantidad de células efectoras se ajustó en función del ratio efector-diana. Así, en el caso de las muestras de pacientes la cantidad de BMMCs sembradas fue la misma en todos los casos, pero la abundancia relativa de células plasmáticas en la muestra varió de un paciente a otro. Sin embargo, en dicha figura se puede observar cómo la cantidad de células CD138⁺ (MM) presentes en el control tras 4 horas de cultivo (24,9%, *Figura 4.56C*) fue mucho mayor que la cantidad de células CD138⁺ remanentes tras el co-cultivo durante 4 horas con las células NK-92-CD16 en presencia de daratumumab (3,5%, *Figura 4.56F*). Esta pérdida aparente de células de MM durante el análisis ocurrió en la gran mayoría de pacientes.

Teniendo en cuenta esta circunstancia, en los experimentos con las muestras de pacientes de MM se recalculó la cantidad de células muertas en cada situación, asumiendo que el porcentaje perdido de células CD138⁺ correspondía a células muertas. La población analizada anteriormente correspondía únicamente a la fracción conservada de células CD138⁺ (vivas o en apoptosis temprana). Las nuevas estimaciones de la tasa de muerte específica, recalculada mediante esa corrección, se muestran en la *Figura 4.59*. Al comparar con la *Figura 4.57* se puede apreciar que la muerte específica producida aumentó, en general, incluso cuando se añadió únicamente daratumumab. Este resultado sugiere la presencia de células NK y macrófagos entre las BMMCs de los pacientes con potencial antitumoral a través de ADCC y fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP), respectivamente.

NK-92-CD16 vs células plasmáticas de pacientes de MM (4 h)

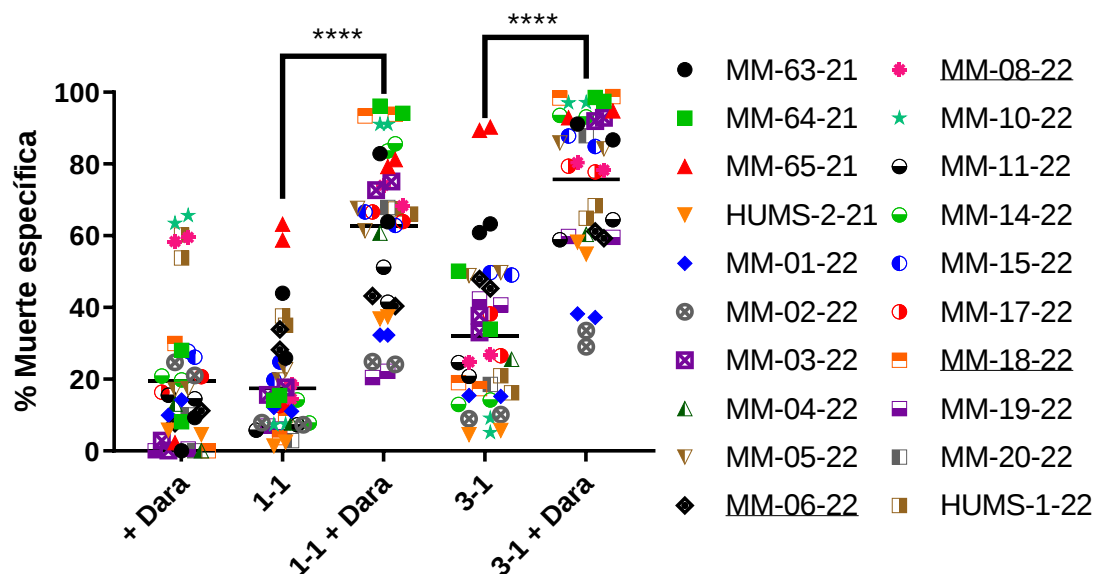


Figura 4.59. Cálculo mejorado de la citotoxicidad de las células NK-92-CD16 sobre las células de MM procedentes de pacientes durante 4 horas. Las muestras procedentes de pacientes que habían sufrido una recaída se muestran subrayadas. En las condiciones indicadas, las BMMCs se preincubaron durante 15 minutos con daratumumab (Dara, 5 μ g/ml). Tras co-incubarlas con las células NK-92-CD16 a diferentes ratios efector-diana durante 4 horas, se determinó la apoptosis producida evaluando la translocación de PS mediante un marcaje por citometría de flujo. Los gráficos representan la muerte celular específica, calculada para cada muestra restando el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺ del control al porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺ totales en cada condición. Los resultados se muestran como los valores individuales de cada experimento y la media de cada grupo de valores. **** $p < 0,0001$.

En cualquier caso, los resultados del análisis de la citotoxicidad de las células NK-92-CD16 sobre las células plasmáticas de pacientes de MM fueron muy positivos. Estas células demostraron un gran potencial terapéutico debido a la inducción específica de muerte celular, en especial cuando se combinaban con daratumumab.

4.4.6 Estudio del potencial terapéutico de las células NK-92-CD16 irradiadas

Quedaba todavía un aspecto pendiente de solucionar, concerniente a la seguridad, antes de poder plantear una posible aplicación clínica de estas células. Las células de la línea NK-92-CD16 son células tumorales humanas que, tal y como se explicó en la introducción (*ver apartado 1.3.6.2.1.1*), provienen de un linfoma no-Hodgkin de tipo NK (Gong et al., 1994; Yan et al., 1998) y tienen un potencial proliferativo ilimitado, *in vitro*. En teoría, una vez erradicasen el tumor contra el que se utilizaran podrían generar una nueva neoplasia si proliferasen de manera continuada dentro del organismo del paciente. Por ello, antes de poder inyectar las células NK-92-CD16 a los pacientes deben ser irradiadas para anular su potencial proliferativo (X. Tang et al., 2018).

Diferentes cantidades de células NK-92-CD16 ($2 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^6$ y $8 \cdot 10^6$) fueron sometidas a una dosis de radiación de 10 Gy con un acelerador lineal de electrones (*ver apartado 3.4.6*). Esta dosis se eligió por haber sido utilizada en distintos ensayos clínicos con terapias celulares basadas en células NK-92 (X. Tang et al., 2018; Williams et al., 2017). Aunque una dosis de radiación de esa magnitud es suficiente para impedir el crecimiento de las células NK-92, también se irradiaron $8 \cdot 10^6$ células NK-92-CD16 a una dosis mayor (15 Gy).

Para determinar los efectos producidos sobre las células se hizo un seguimiento de las mismas durante las semanas posteriores a la irradiación, determinándose la densidad celular, la viabilidad celular y la expresión de CD16. Los resultados se muestran en la *Figura 4.60*. En ella puede comprobarse como durante las primeras 48 horas post-irradiación la densidad celular se mantuvo en general en torno a la inicial ($4 \cdot 10^5$ células/ml) o incluso se redujo un poco. Es decir, no hubo proliferación de las células irradiadas durante esas 48 horas. Además, a partir de las 48 horas post-irradiación la densidad celular cayó bruscamente, de manera más pronunciada cuanto más radiación habían recibido las células, hasta tender progresivamente a cero.

Simultáneamente se analizó la viabilidad celular (*Figura 4.60B*), y ésta fue congruente con los resultados obtenidos respecto a la densidad celular (*Figura 4.60A*). A las 24 horas post-irradiación la viabilidad se mantuvo en valores similares a los iniciales y a las 48 horas se produjo un aumento de la cantidad de células muertas, llegando hasta el 40% y correspondiendo con el descenso observado en la densidad celular. A partir de ese momento, la cantidad de células muertas aumentó rápidamente hasta llegar al 100%.

Dado que las células NK-92-CD16 se diseñaron para ser utilizadas en combinación con daratumumab o con otros anticuerpos que indujeran ADCC, se estudió también cómo afectaba la irradiación a la expresión del receptor CD16. En la *Figura 4.60C* se muestra el porcentaje de células viables que expresaban CD16 y capaces por lo tanto de llevar a cabo la ADCC. A diferencia de los anteriores parámetros estudiados, que se mantuvieron relativamente estables las primeras 48 horas, la expresión de CD16 en las células NK-92-CD16 disminuyó desde el mismo momento desde el momento de la irradiación. La reducción de la expresión de CD16 durante las primeras 24 horas fue considerable, llegando hasta el 50% de pérdida en el caso de las células irradiadas a 15 Gy. Esto quiere decir que la expresión de CD16 se perdía antes de que las células murieran. La pérdida fue mayor cuanto más radiación recibieron las células.

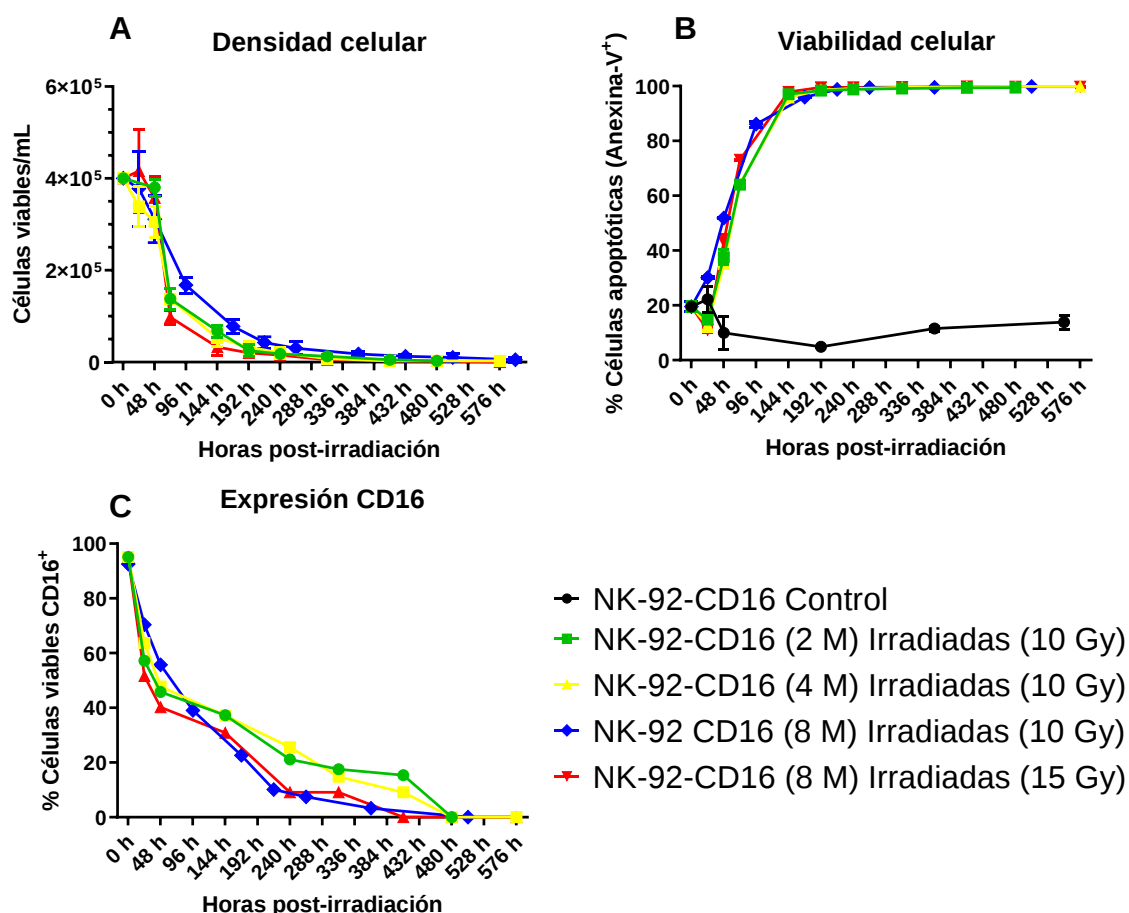


Figura 4.60. Efecto de la irradiación sobre diferentes parámetros de las células NK-92-CD16. A) Densidad celular. B) Viabilidad. C) Expresión de CD16. En los 3 casos, el eje de abscisas representa el tiempo transcurrido desde el momento de la irradiación de las células, mientras que el eje de ordenadas indica en cada caso los valores del parámetro en cuestión. En los paneles A y B los resultados se representan como la media $\pm$ SD de los correspondientes valores. En el panel C los resultados que se indican son valores individuales.

Para averiguar si la actividad citotóxica se encontraba afectada por la irradiación, especialmente la ADCC, se analizó la citotoxicidad celular ejercida por las células NK-92-CD16, tanto irradiadas como sin irradiar, sobre las líneas MM.1S y NCI-H929 durante las primeras 48 horas post-irradiación (Figura 4.61). Los resultados obtenidos sobre la línea MM.1S mostraron que las células irradiadas a 10 Gy mantuvieron una citotoxicidad cercana al 80% de los valores obtenidos con las células sin irradiar. Con las células irradiadas a 15 Gy, la pérdida de citotoxicidad fue mayor, igual o superior al 50% en todos los casos.

Respecto a los resultados obtenidos utilizando como diana la línea NCI-H929, a ratio 1-1, las células NK-92-CD16 irradiadas a cualquiera de las dosis empleadas produjeron una muerte similar a la de las células sin irradiar. Debemos recordar que la línea celular NCI-H929 se había mostrado, en general, bastante resistente a la acción de todos los tipos de células NK, sobre todo a bajos ratios efector-diana, condición en la que el nivel de muerte celular es reducido. En el resto de situaciones, los resultados fueron parecidos a los obtenidos con la línea MM.1S,

con unas pérdidas de actividad en torno al 20% al irradiar a 10 Gy, y superiores al 50% al irradiar a 15 Gy.

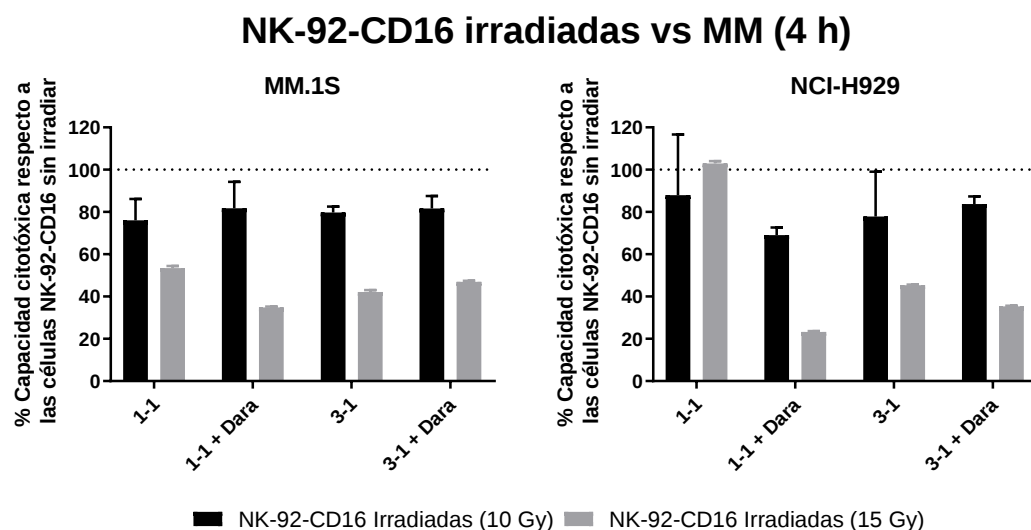


Figura 4.61. Capacidad citotóxica de las células NK-92-CD16 irradiadas comparada con la de las células NK-92-CD16 sin irradiar. Con ambos tipos de células se realizaron experimentos de citotoxicidad celular sobre las líneas celulares de MM durante 4 horas. En las condiciones indicadas, las células de MM se preincubaron 15 minutos con daratumumab (Dara, 5 µg/ml). Tras co-incubar las células NK-92-CD16 con las células de MM durante 4 horas a diferentes ratios efector-diana, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. La cantidad de apoptosis inducida por las células NK-92-CD16 no irradiadas se tomó como referencia y se le adjudicó el valor del 100% de citotoxicidad. La apoptosis inducida por las células NK-92-CD16 irradiadas se refirió a dicha referencia. Los gráficos representan el porcentaje de capacidad citotóxica que presentan las células irradiadas respecto al nivel de las células control, indicado por una línea horizontal discontinua. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 3 experimentos diferentes en el caso de las células irradiadas a 10 Gy, y la media $\pm$ SD de 2 determinaciones individuales de 1 experimento en el caso de las irradiadas a 15 Gy.

Por lo tanto, se puede concluir que la irradiación de las células NK-92-CD16 a 10 Gy permitiría una aplicación segura en los pacientes, ya que pierden su potencial replicativo y a partir de las 48-72 horas empezarían a morir. En esa ventana de tiempo, las células conservarían todavía una considerable actividad citotóxica (alrededor del 80% de su citotoxicidad inicial) para actuar sobre el tumor.

Recapitulando la información obtenida acerca de las células NK-92-CD16, se puede concluir que:

- La molécula CD16 se expresa correctamente en la membrana de las células NK-92-CD16 y es funcional, permitiendo llevar a cabo la ADCC
- La expresión de CD16 regula positivamente la expresión de moléculas citotóxicas como granzima B.
- Las células NK-92-CD16 son muy citotóxicas, *per se*, dependiendo de la línea tumoral a la que se enfrenten. Ejercen más citotoxicidad que sus células parentales, las células NK-92.
- Su elevada citotoxicidad directa o a través de la ADCC permite que incluso a ratios efector-diana muy bajos puedan eliminar un alto porcentaje de la población tumoral.
- La citotoxicidad de las células NK-92-CD16 está mediada por la vía de los gránulos citotóxicos.
- A pesar de expresar altos niveles de CD38, la tasa de fratricidio de las células NK-92-CD16 en presencia del anticuerpo anti-CD38 daratumumab no es un impedimento para llevar a cabo su acción antitumoral.
- Las células NK-92-CD16 son capaces de infiltrarse a través de matrices en 3D y encontrar a sus células diana, eficazmente.
- La expresión de CD16 y ZsGreen es estable, habiéndose mantenido su expresión durante casi dos años.
- Las células NK-92-CD16 ejercen niveles marginales de citotoxicidad sobre PBMCs o blastos T obtenidos de donantes sanos, lo que sugiere una cierta especificidad hacia las células tumorales, o al menos las de MM.
- La irradiación de las células NK-92-CD16 (10 Gy) permite su utilización segura como agente terapéutico manteniendo una elevada actividad citotóxica.
- Las células NK-92-CD16 son citotóxicas para las células plasmáticas procedentes de pacientes de MM, especialmente en combinación con daratumumab, incluso en células de pacientes con poca expresión de CD38. También son eficaces contra algunas células resistentes a tratamientos previos.

4.5 GENERACIÓN Y ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE CÉLULAS CAR-NK-92-CD16

4.5.1 Generación de la línea celular CAR-NK-92-CD16

En los resultados expuestos hasta este momento se ha visto un gran potencial de las células NK-92-CD16, especialmente cuando son combinadas con un mAb anti-CD38 (daratumumab), en el caso de células de MM. Como posible alternativa terapéutica se decidió generar células que expresasen un receptor de antígeno quimérico (CAR) a partir de las células NK-92-CD16. Se prefirió utilizar dicha línea para generar las células CAR, en vez de la parental NK-92, ya que al expresar de esa forma CD16, las células CAR podrían también combinarse con mAbs para aumentar su capacidad citotóxica.

Como diana del CAR se eligió la molécula SLAMF7 (CS1, CD319), otro marcador molecular del MM (*ver apartado 1.4.5.2*). Para la transfección, se construyó en primer lugar la secuencia quimérica del CAR con los scFv diseñados contra el antígeno en cuestión. Después, a diferencia de la primera transfección (*ver apartado 4.4.1*), al tratarse en este caso de un plásmido que ya había sido manipulado previamente, se comprobó antes del clonaje la integridad de diferentes alícuotas del plásmido pBaBe-Bax mediante digestión del DNA plasmídico.

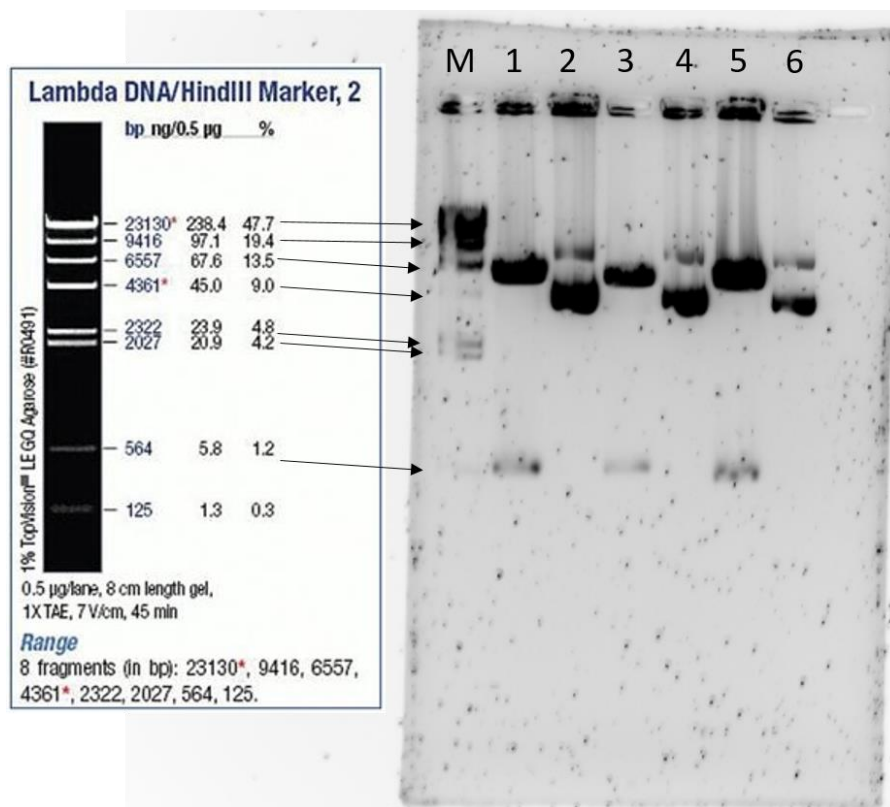


Figura 4.62. Electroforesis en gel de agarosa de diferentes alícuotas del plásmido pBaBe-Bax. En los carriles impares se cargaron las digestiones, mientras que en los carriles pares se cargaron las alícuotas del plásmido sin digerir como referencia. Por su parte, en la parte izquierda se compara el marcador de peso correspondiente a λ DNA/HindIII, que se cargó en el carril M. Imagen representativa de dos geles.

En la *Figura 4.62* se puede observar que las alícuotas se encontraban en buen estado. En los carriles pares se encuentran el plásmido pBaBe-Bax completo, de 6029 pares de bases, con sus formas superenrollada (aproximadamente a la altura del marcador de 4361 pares de bases) y circular abierta (algo por debajo de la altura del marcador de 9416 pares de bases). Por su parte, en los carriles impares se encuentran las digestiones realizadas, en las que se aprecia el inserto del gen Bax, de 525 pares de bases (a la altura del marcador de 564 pares de bases) y el esqueleto del plásmido de 6029 pares de bases (justo por debajo de la altura del marcador de 6557 pares de bases).

Tras la comprobación, se generó el plásmido pBaBe-SLAMF7-CAR insertando el constructo con la secuencia quimérica del CAR en el plásmido pBaBe-Bax, de manera que se reemplazase el gen de Bax (*ver apartado 3.2.6 y Figura 3.4.*). Una vez obtenido el nuevo plásmido, la transfección se llevó a cabo con sobrenadantes retrovirales generados previamente gracias a las células empaquetadoras HEK-293T. La incubación de las células NK-92-CD16 con los sobrenadantes se realizó siguiendo el mismo protocolo empleado en la transfección del receptor CD16 y ZsGreen (*ver apartado 3.3.1.1 y apartado 3.3.1.2*), con la salvedad de la adición de Vectofusin®.

Se desconoce la eficiencia inicial de esta transfección porque una vez finalizada la incubación con los sobrenadantes, las células se pusieron en cultivo en presencia de puomicina. En teoría, este antibiótico (AB) permitía seleccionar las células transfectadas ya que el gen de resistencia a puomicina también estaba codificado en el plásmido pBaBe-SLAMF7-CAR. Una vez las células NK-92-CD16 control cultivadas en paralelo con puomicina murieron por efecto del AB, éste fue retirado del medio de cultivo de las células transfectadas que, a partir de ese momento, se denominaron células CAR-NK-92-CD16 anti-SLAMF7, aunque para simplificar, en adelante se refieren como células CAR-NK-92-CD16.

A partir del momento en el que las células CAR-NK-92-CD16 supervivientes de la selección por AB se expandieron lo suficiente, se analizó la expresión del CAR por citometría de flujo (*ver apartado 3.5.2*). Para que el análisis fuera posible se realizó un marcaje secundario mediante una proteína quimérica (SLAMF7-Fc) reconocida por el propio CAR (*ver apartado 3.5.2*). En la *Figura 4.63A* se muestra el primer marcaje realizado tras la selección con puomicina, enfrentado a la señal de fluorescencia de la proteína ZsGreen introducida en la anterior transfección.

Tal y como puede apreciarse, el porcentaje de células que expresaban el CAR era aún muy bajo (7,2%). También se controló la especificidad de este marcaje, analizando la expresión del CAR en la línea parental NK-92-CD16, para de esta manera comprobar la ausencia de señales inespecíficas por la posible interacción del receptor CD16 con la proteína quimérica y el mAb utilizados (anti-IgG1 Fc). En la *Figura 4.63B* se puede comprobar como, en efecto, este marcaje secundario del CAR era específico y daba muy poca señal en las células NK-92-CD16.

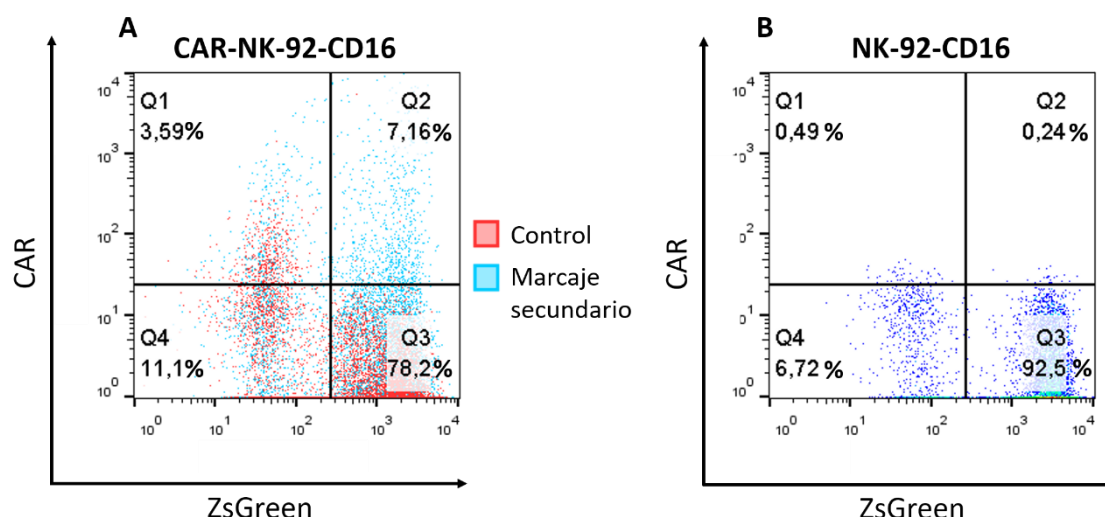


Figura 4.63. Porcentaje de células CAR-NK-92-CD16 en el cultivo tras la primera ronda de selección. En estos gráficos (tipo dot plot), el eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de la proteína ZsGreen, y el eje de ordenadas la intensidad de fluorescencia del marcaje secundario sobre el CAR. Los valores de cada célula aparecen representados como un punto en el sistema de coordenadas. Los porcentajes indican la fracción de la población de células transfectadas que es negativa o positiva para cada proteína. Dichos valores se establecieron tomando como punto de corte una intensidad de fluorescencia en la que el isotipo o control tuviera menos de 1% de señal positiva. A) Células CAR-NK-92-CD16. Los puntos rojos corresponden a las células incubadas sólo con el mAb anti-IgG1 Fc. Los puntos azules, por su parte, representan las células incubadas con el marcaje secundario completo (SLAMF7-Fc y mAb anti-IgG1 Fc. B) Células NK-92-CD16 control.

Tras la selección con puromicina el porcentaje de células transfectadas en el cultivo fue bajo, por lo que el marcaje secundario también se utilizó como herramienta para varias rondas de selección aislando por citometría de flujo la población celular que expresaba el CAR (ver apartado 3.5.3). En la Figura 4.64A se muestra el máximo nivel de expresión del CAR que se alcanzó a lo largo de las distintas rondas de selección realizadas (46,3%). Aunque este porcentaje era claramente mayor que el obtenido en el primer marcaje (46,3% vs 7,2%), aún se estaba lejos de obtener una línea celular CAR-NK-92-CD16 anti-SLAMF7 pura. En ese momento, en torno a la mitad de las células del cultivo expresaba el CAR y la otra mitad no.

Se determinó también la expresión en membrana de CD16, para verificar que sus niveles no hubieran disminuido o se hubiesen visto alterados por la segunda transfección. En la Figura 4.64B se muestra que el porcentaje de células positivas fue similar al de las células antes de efectuar esta segunda transfección (ver Figura 4.36), aunque algo menores en nivel de expresión (MFI de 64,6 vs 179).

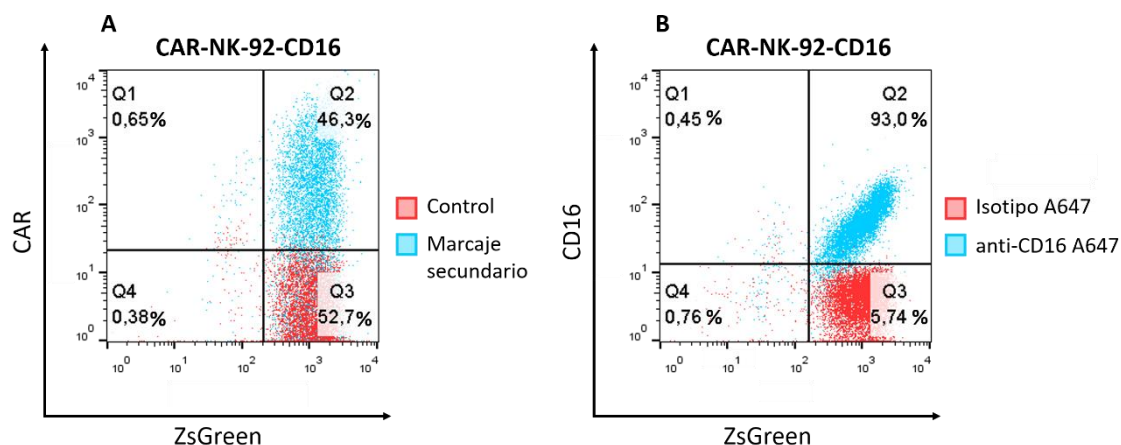


Figura 4.64. Expresión del CAR anti-SLAMF7 y CD16 en la membrana plasmática de las células CAR-NK-92-CD16. En estos gráficos (tipo dot plot), el eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de la proteína ZsGreen, y el eje de ordenadas la intensidad de fluorescencia del marcaje realizado sobre el CAR o CD16. A) Marcaje secundario para la detección del CAR anti-SLAMF7. B) Marcaje primario para la detección de CD16. Los valores de cada célula aparecen representados como un punto en el sistema de coordenadas. Los porcentajes indican la fracción de la población de células transfectadas que es negativa o positiva para cada proteína. Dichos valores se establecieron tomando como punto de corte una intensidad de fluorescencia en la que el control del marcaje secundario o del isotipo tuviera menos de 1% de señal positiva. Los puntos rojos corresponden a las células con el mAAb control o de isotipo, y los puntos azules a las células con el marcaje de interés. Diagramas representativos de 2 experimentos diferentes.

Al igual que en el caso previo de la transfección de CD16, la expresión en membrana del CAR anti-SLAMF7 se analizó de manera rutinaria. De esta forma se pudo monitorizar si la expresión de las proteínas transfectadas se mantenía estable o se iba perdiendo con el tiempo. La *Figura 4.65* recoge el resultado de los análisis realizados durante un año de la expresión de las proteínas CAR y ZsGreen (introducida en la primera transfección).

Al contrario que en el caso del análisis de la expresión y estabilidad de CD16, en el que se observaba un rápido incremento inicial de la expresión hasta los niveles máximos absolutos (ver *Figura 4.53*), el aumento en el porcentaje de población que expresaba el CAR fue lento, progresivo e incompleto. Con cada ciclo de selección (se hicieron varios ciclos tanto por citometría de flujo como utilizando puromicina) el porcentaje se incrementó moderadamente, hasta llegar a un máximo relativo de 46,3% de células transfectadas con el CAR anti-SLAMF7. No se consiguió superar la barrera del 50% de células transfectadas, pero la expresión del transgén se mantuvo estable.

Los sucesivos procesos de selección por citometría de flujo aparecen representados en la *Figura 4.65* por líneas rojas discontinuas verticales, mientras que las líneas discontinuas verticales moradas y azules indican el inicio y final, respectivamente, de los procesos de selección por puromicina. Por su parte, la línea discontinua horizontal naranja indica el nivel del 50% de expresión.

Estabilidad de la expresión del CAR anti-SLAMF7 y ZsGreen en la línea CAR-NK-92-CD16

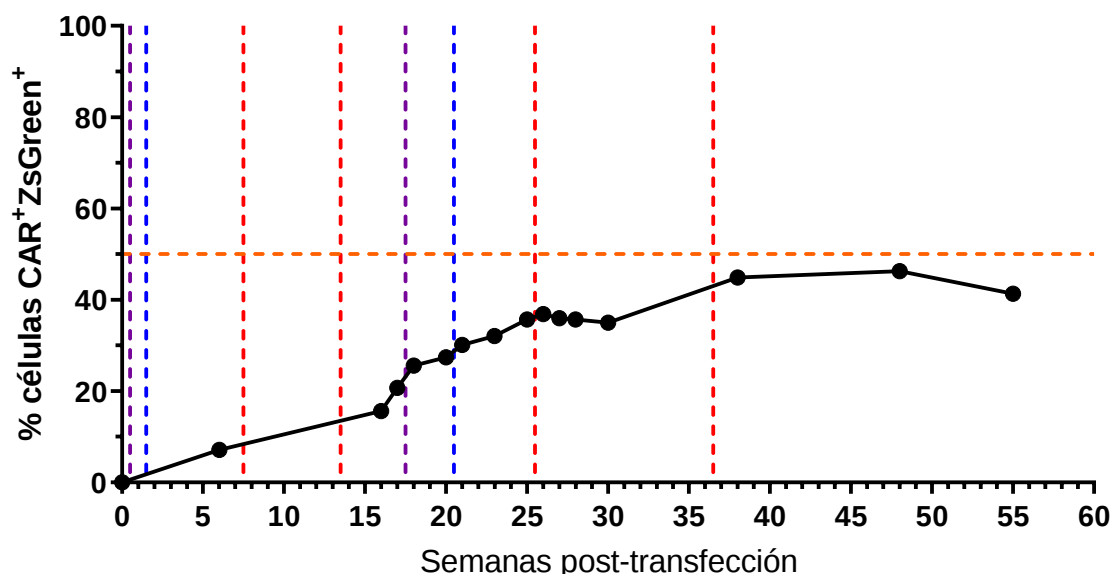


Figura 4.65. Evolución temporal de la expresión del CAR anti-SLAMF7 y ZsGreen en las células CAR-NK-92-CD16. La expresión de ambas proteínas se determinó por citometría de flujo. En el gráfico se representa, en el eje de ordenadas, el porcentaje de células doble positivas (CAR⁺ZsGreen⁺) mientras que en el de abscisas el tiempo en cultivo. Las líneas discontinuas verticales moradas indican el inicio de los periodos de selección por puomicina, mientras las líneas discontinuas verticales azules indican el final de dichos periodos. Por su parte, las líneas discontinuas rojas indican los momentos en los que las células transfectadas se seleccionaron por citometría de flujo. La línea discontinua horizontal naranja indica el nivel del 50% de expresión del transgén en las células.

Una vez conseguida la expresión del CAR anti-SLAMF7, aunque sólo en la mitad de las células, el siguiente aspecto a estudiar fue la capacidad citotóxica de las células CAR-NK-92-CD16 y comprobar si era igual o superior a la de las células NK-92-CD16. Dado que el efecto del CAR dependía de la expresión de su diana, en primer lugar, se analizó el nivel de expresión de SLAMF7 en las dianas celulares empleadas a lo largo de esta tesis doctoral. En la Figura 4.66 puede observarse que existía una gran diferencia entre las tres líneas de MM. Por un lado, la línea MM.1S expresaba SLAMF7 significativamente (99,5% de células SLAMF7⁺, MFI: 130), pero la línea RPMI 8226 no expresaba esta proteína (0,1% de células SLAMF7⁺). De forma más intermedia, la línea NCI-H929 expresaba SLAMF7, pero sin llegar a los valores porcentuales o de intensidad de las células MM.1S (79,1% de células SLAMF7⁺, MFI: 79).

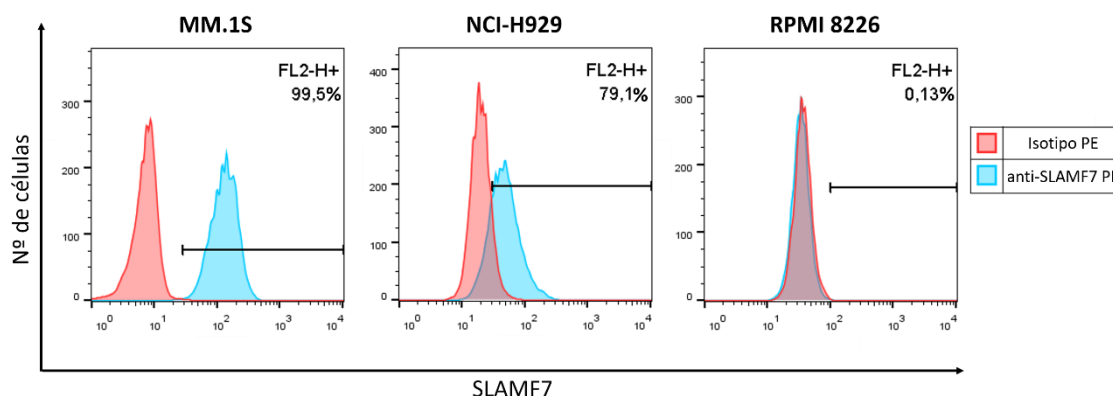


Figura 4.66. Expresión de SLAMF7 en la membrana plasmática de las líneas celulares de MM. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y el eje de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. Los histogramas rojos muestran la distribución de la señal base de fluorescencia debida al control de isotipo. Los histogramas azules, por su parte, representan el marcaje con un mAb específico anti-SLAMF7 en cada línea celular. Los porcentajes indican la fracción de la población de cada línea celular que se considera positiva. Histogramas representativos de 2 experimentos diferentes.

Dado que las células NK suelen expresar SLAMF7 (Hsi et al., 2008; Malaer & Mathew, 2017; Pittari et al., 2017), también se analizó su expresión en las células CAR-NK-92-CD16. En la *Figura 4.67A* se muestra el resultado del análisis por citometría de flujo, y se puede observar que la nueva línea generada tenía una expresión mayoritaria (90,5% de células SLAMF7⁺) de dicha proteína.

Este resultado sugería que los problemas encontrados para purificar las células CAR-NK-92-CD16 podrían deberse a la alta expresión de la diana de su propio CAR. Es decir, que se estuviera induciendo fratricidio en el cultivo y no se pudiera aumentar el porcentaje de células CAR-NK-92-CD16 por haberse alcanzado el equilibrio entre proliferación y fratricidio. No obstante, el análisis de las células CAR-NK-92-CD16 del cultivo por citometría de flujo demostró una elevada viabilidad (*Figura 4.67B*). Además, este resultado permitió constatar que las células CAR-NK-92-CD16 no sufrían fratricidio a pesar de expresar la diana del CAR anti-SLAMF7. Este resultado concuerda con el hecho de que los anticuerpos dirigidos contra SLAMF7 y utilizados en la clínica (como Elotuzumab) no producen fratricidio sobre las células NK efectoras (Benson & Byrd, 2012; van de Donk et al., 2012; Wang et al., 2018).

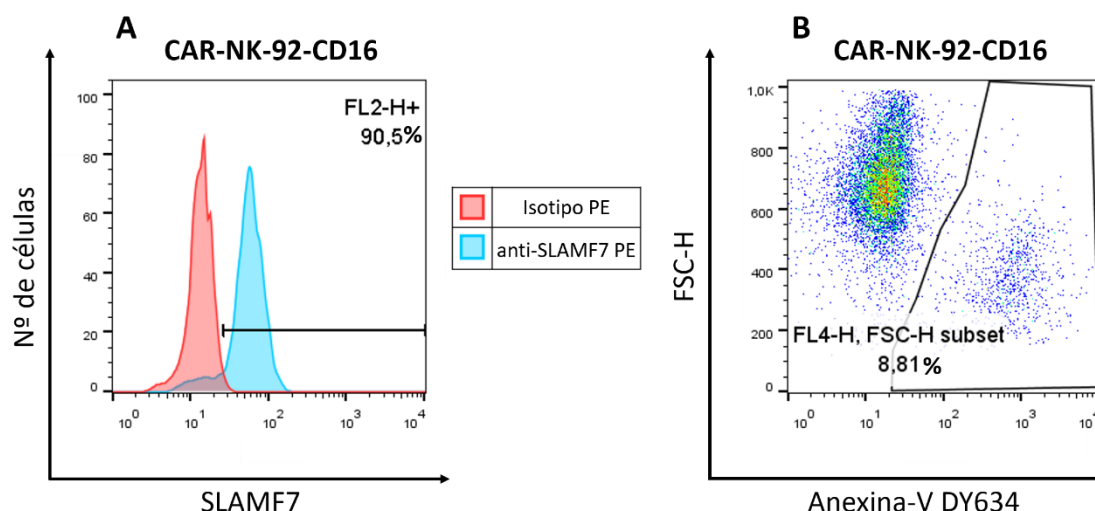


Figura 4.67. Expresión de SLAMF7 en la membrana plasmática de la línea celular CAR-NK-92-CD16 y efecto sobre su viabilidad. A) Expresión de SLAMF7. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de los marcajes, y el eje de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. El histograma rojo muestra la distribución de la señal base de fluorescencia debida al control de isotipo. El histograma azul, por su parte, representa el marcaje con un mAb específico anti-SLAMF7. El porcentaje indica la fracción de la población de la línea celular que es positiva. Dichos valores se establecieron tomando como punto de corte una intensidad de fluorescencia a la que el control del isotipo tuviera menos de 1% de señal positiva. B) Análisis de la viabilidad. La apoptosis basal de esta línea celular se evaluó determinando la translocación de PS por marcaje con anexina-V DY634 mediante citometría de flujo. El porcentaje hace referencia a las células CAR-NK-92-CD16 anexina-V DY634⁺. Diagramas representativos de 3 experimentos distintos.

4.5.2 Actividad antitumoral de las células CAR-NK-92-CD16

Para realizar el estudio de la capacidad citotóxica de la línea CAR-NK-92-CD16, los experimentos se realizaron únicamente sobre la línea celular MM.1S, ya que era la que expresaba mayores niveles de SLAMF7 (ver Figura 4.66). Los experimentos se realizaron durante 4 horas de manera similar a los mostrados anteriormente, utilizando como controles a las células NK-92-CD16. En la Figura 4.68 se puede apreciar que no existieron diferencias significativas entre los dos tipos de células efectoras.

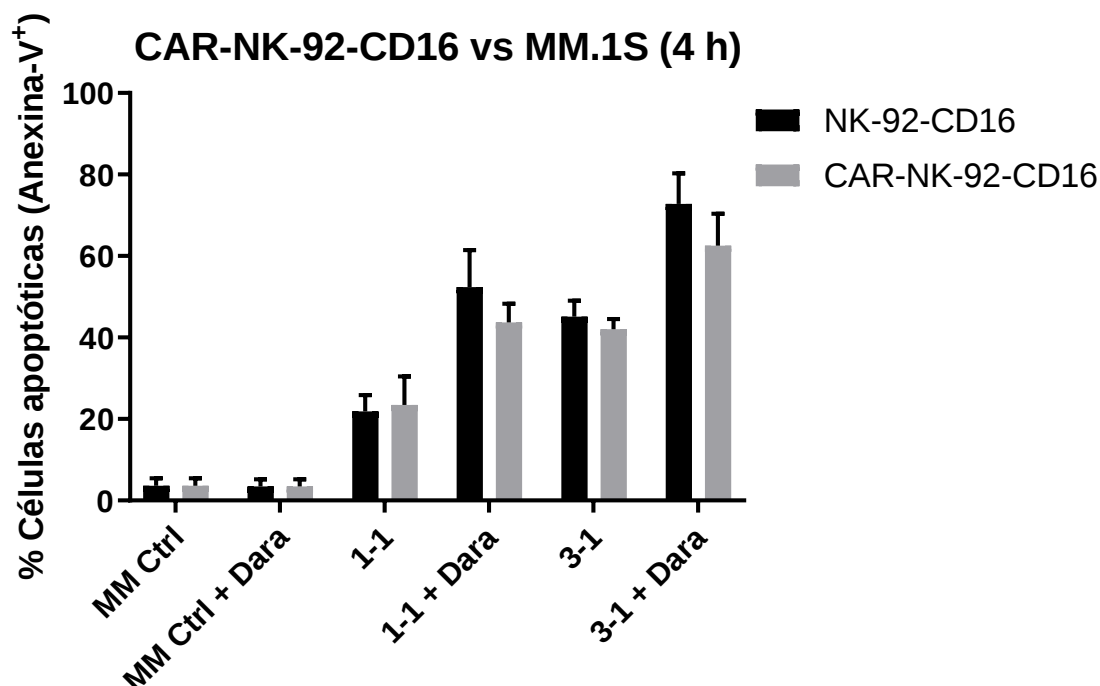


Figura 4.68. Citotoxicidad de las células CAR-NK-92-CD16 sobre la línea celular MM.1S durante 4 horas. Las células de MM se preincubaron durante 15 minutos con daratumumab (Dara, 5 μ g/ml) en los casos indicados. Tras co-incubar las células de MM con las distintas células efectoras durante 4 horas a diferentes ratios efector-diana, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. Los gráficos representan el porcentaje de células de MM anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 2 experimentos distintos. Ctrl: Control.

Esta falta de diferencias podría significar, o bien que el CAR anti-SLAMF7 expresado no era funcional (o no estaba bien diseñado), o que se necesitaría conseguir un mayor porcentaje de purificación para que su acción destacase sobre las propias células NK-92-CD16 presentes todavía entre las células CAR-NK-92-CD16. Otra posibilidad que habría que tener en cuenta es que, al tener en las condiciones *in vitro* a las células diana fácilmente accesibles, y ser éstas muy sensibles de base a la acción de las células NK-92 y las generadas a partir de ellas, esta circunstancia no diera opción a que se ejerza un papel diferencial en ese margen de tiempo.

Recapitulando toda la información obtenida acerca de la transfección de las células CAR-NK-92-CD16, se puede concluir que:

- El CAR anti-SLAMF7 diseñado se expresa en membrana, y si bien no se ha conseguido generar una línea celular que lo exprese al 100%, la expresión obtenida es estable.
- Las líneas celulares de MM utilizadas en este trabajo expresan niveles variables de SLAMF7, siendo la línea MM.1S la que lo expresa en toda la población.
- Las células CAR-NK-92-CD16 no presentan, al menos a este nivel de purificación y en experimentos *in vitro*, diferencias de actividad citotóxica respecto a las células NK-92-CD16.

4.6 ACCIÓN DE LAS CÉLULAS NK-92-CD16 Y CAR-NK-92-CD16 EN UN MODELO *IN VIVO* DE MIELOMA MÚLTIPLE

Todos los experimentos mostrados hasta el momento fueron realizados *in vitro*. Para poder evaluar la acción tanto de las células NK-92-CD16 como de las células CAR-NK-92-CD16 *in vivo*, como última parte del proyecto se decidió realizar un experimento en un modelo animal humanizado de MM.

Como modelo animal se eligieron los ratones NSG (NOD *scid gamma mouse*), que no poseen linfocitos B, T, ni células NK y son uno de los modelos experimentales más inmunodeficientes, permitiendo el injerto de tumores humanos. En cuanto a las células tumorales, teniendo en cuenta los resultados de la expresión de SLAMF7 (ver *Figura 4.66*), se eligió a la línea celular MM.1S. Para poder realizar el seguimiento del desarrollo tumoral *in vivo* mediante análisis de imagen (ver *apartado 3.7*) se utilizó la línea MM.1S-GFP-Luc, modificada genéticamente a partir de las células MM.1S para expresar la proteína fluorescente verde (GFP) y la enzima luciferasa (Luc).

4.6.1 Caracterización de la línea MM.1S-GFP-Luc

Antes de llevar a cabo el experimento se realizaron varias pruebas para comprobar que no existían diferencias importantes entre las células MM.1S utilizadas hasta el momento y las células MM.1S-GFP-Luc. En primer lugar, se comprobó que mantuvieran la expresión en membrana de CD38, fundamental para la acción de daratumumab. En la *Figura 4.69* se puede encontrar el resultado del análisis de expresión por citometría de flujo (ver *apartado 3.5.2*). Comparando con los correspondientes resultados de la línea parental MM.1S (ver *Figura 4.6*), la línea MM.1S-GFP-Luc mantenía unos niveles de expresión similares.

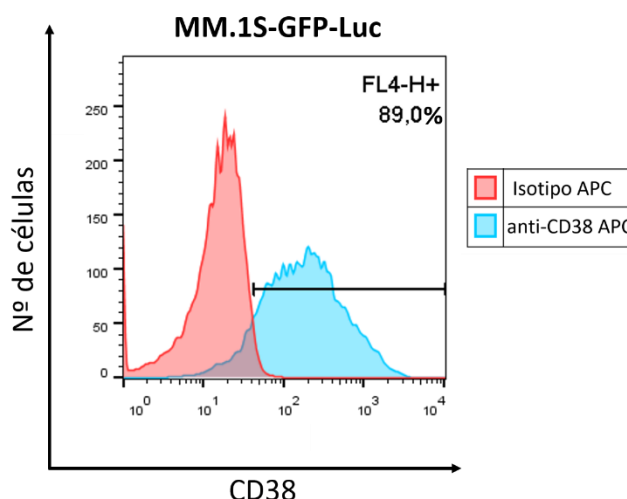


Figura 4.69. Expresión de CD38 en la membrana plasmática de la línea celular MM.1S-GFP-Luc. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia del marcaje, y el eje de ordenadas el número de células que presentan dicha intensidad. El histograma rojo muestra la distribución de la señal base de fluorescencia debida al control de isotipo. El histograma azul, por su parte, representa el marcaje con un mAb específico anti-CD38 de la línea celular. El porcentaje indica la fracción de la población de la línea celular que es positiva. Histograma representativo de 3 experimentos distintos.

En segundo lugar, aunque se podría presuponer que la sensibilidad a las células NK-92-CD16 y CAR-NK-92-CD16 sería similar a la vista en los resultados obtenidos con la línea MM.1S, se llevaron a cabo experimentos de citotoxicidad celular para comprobarlo. En este caso las dos líneas de células co-incubadas expresaban una proteína fluorescente verde (ZsGreen y GFP, respectivamente), lo que podría suponer un problema para distinguirlas por citometría de flujo. Sin embargo, en la *Figura 4.70* se puede ver cómo la proteína GFP mostraba más intensidad de fluorescencia que la proteína ZsGreen. Esto permitía que ambas poblaciones se pudieran diferenciar fácilmente al realizar el análisis por citometría de flujo.

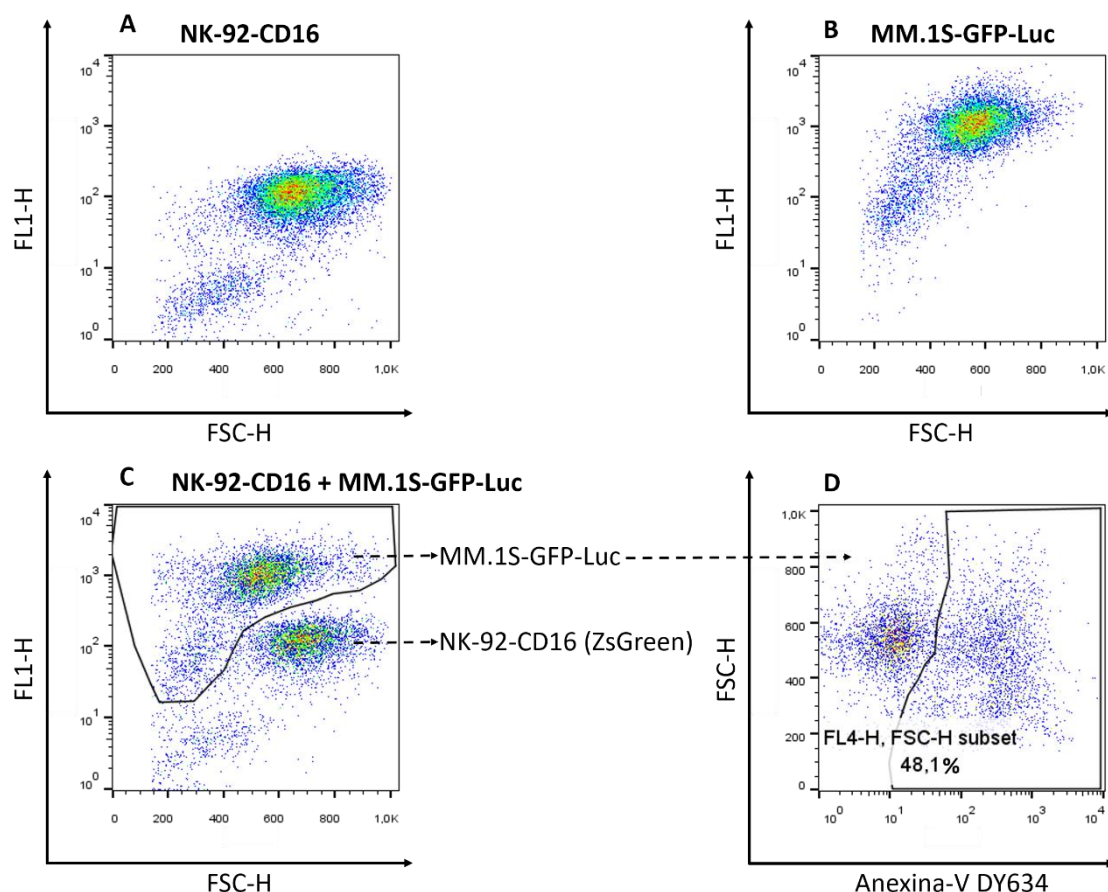


Figura 4.70. Esquema del análisis de citotoxicidad sobre la línea MM.1S-GFP-Luc por citometría de flujo, utilizando células NK-92-CD16 como efectoras. En (A) se muestran las células NK-92-CD16 en solitario, localizadas por la señal fluorescente de ZsGreen (FL1-H) frente al tamaño celular (FSC-H). Las células diana MM.1S-GFP-Luc y la señal fluorescente de GFP (FL1-H) se muestran a su vez en el panel (B). Ambas líneas celulares se mezclaron a diferentes ratios efector-diana y se co-incubaron durante 4 horas. Finalizado ese tiempo, la diferencia de intensidad entre la fluorescencia de las proteínas GFP y ZsGreen permitió distinguir entre las células MM.1S-GFP-Luc y NK-92-CD16 (C). Para poder determinar la apoptosis de las células MM.1S-GFP-Luc, se delimitó la región de células con mayor intensidad de fluorescencia y se analizó el marcaje con anexina-V DY634, indicativo de la translocación de PS (D). El porcentaje indicado se refiere a las células MM.1S-GFP-Luc anexina-V DY634⁺.

En cuanto a los resultados del ensayo de citotoxicidad sobre las células MM.1S-GFP-Luc, puede verse en la Figura 4.71 que en este caso parecía haber una pérdida de actividad de las células CAR-NK-92-CD16 respecto a las células NK-92-CD16, aunque ésta se recuperaba totalmente a ratio 3-1 en presencia de daratumumab.

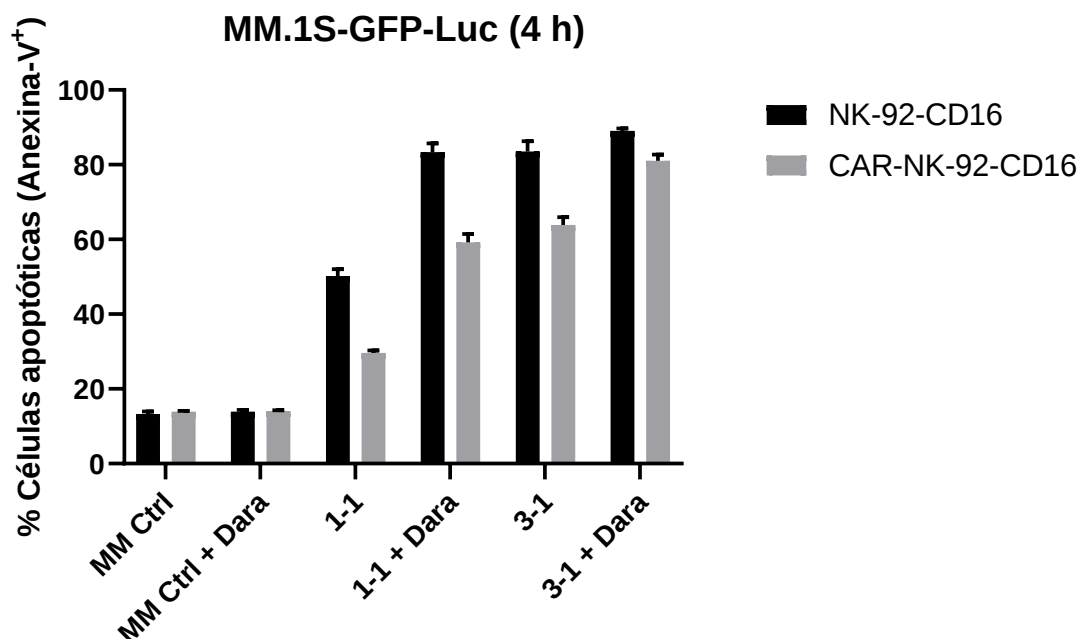


Figura 4.71. Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 y CAR-NK-92-CD16 sobre la línea celular MM.1S-GFP-Luc durante 4 horas. Las células de MM se preincubaron durante 15 minutos con daratumumab (Dara, 5 μ g/ml) en los casos indicados. Tras co-incubar a las diferentes células NK con sus dianas durante 4 horas, a diferentes ratios efector-diana, se determinó la apoptosis producida analizando la translocación de PS por citometría de flujo. El gráfico representa el porcentaje de células MM.1S-GFP-Luc anexina-V DY634⁺. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de 3 determinaciones individuales de 1 experimento. Ctrl: Control.

4.6.2 Efecto *in vivo* de las células NK-92-CD16 y CAR-NK-92-CD16 en combinación con daratumumab (anti-CD38) en un modelo humanizado de mieloma múltiple

El experimento con el modelo animal se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita previamente (ver apartado 3.7). Tres de los veinticinco ratones inoculados con las células de MM, fallecieron súbitamente antes de poder inyectar las células terapéuticas, aun sin exhibir tumores detectables a simple vista. Otros cuatro fallecieron repentinamente de la misma manera más adelante, cada uno de un grupo experimental diferente. Todos los ratones restantes se sacrificaron a la vez el último día del experimento (día 36, ver Figura 3.5.) por riesgo de ulceración de los tumores. Al no haber conseguido alcanzar los criterios de punto final, no se analizó el impacto de los tratamientos en la supervivencia.

Durante el transcurso del experimento se realizó un seguimiento del crecimiento de los tumores por dos técnicas diferentes. Por un lado, se midió el volumen de los tumores utilizando un calibre. Este procedimiento no se realizó hasta el día 27 porque fue la primera ocasión en la que los tumores eran detectables a simple vista. En la Figura 4.72 se puede observar cómo los tumores crecieron con el paso de los días, aunque sin diferencias significativas entre los diferentes grupos, debido a la alta variabilidad entre individuos del mismo grupo experimental. Sin embargo, tanto a los 27 como a los 34 días, pudo observarse cómo el tamaño medio de los

tumores tratados con las células CAR-NK-92-CD16 en presencia de daratumumab era menor que el del grupo control (un 49% menor a día 27 y un 18% a día 34).

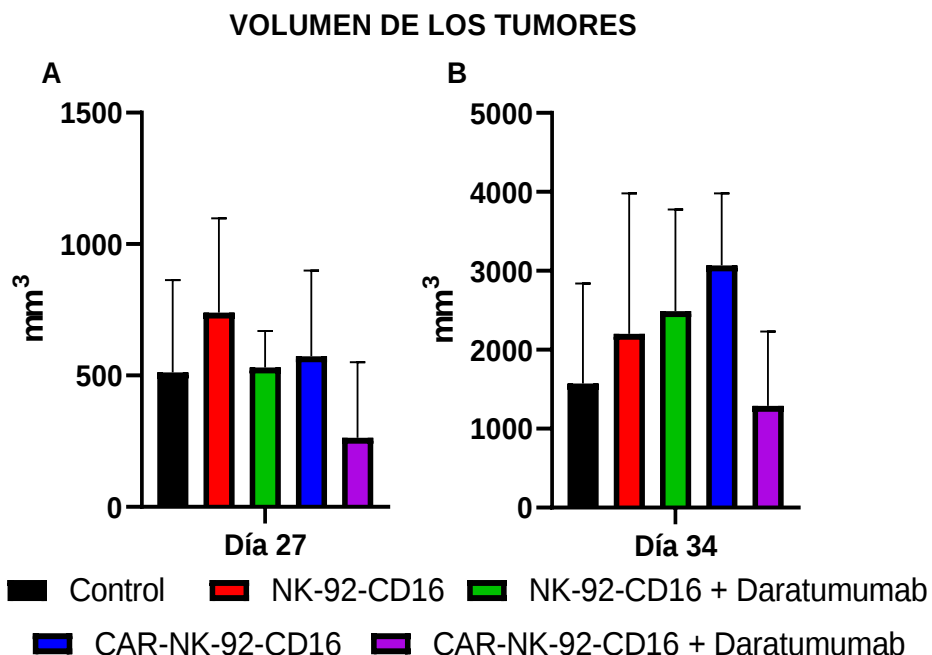


Figura 4.72. Crecimiento tumoral en función del volumen. El eje de abscisas indica los días en los que se realizó la medida y en el eje de ordenadas se representa el volumen determinado en cada uno de los grupos experimentales. A) Día 27. B) Día 34. Los resultados de los volúmenes calculados a partir de las medidas con el calibre se representan como la media $\pm$ SD de los valores de los ratones de cada grupo experimental.

Por otro lado, se determinó la bioluminiscencia producida por la luciferasa, enzima expresada por las células tumorales MM.1S-GFP-Luc, al procesar la luciferina. En la *Figura 4.73* se muestra la luminiscencia observada en los veinticinco ratones al principio del experimento (día 0). Estos datos permitieron organizar inicialmente a los ratones en los cinco grupos experimentales de forma equilibrada.

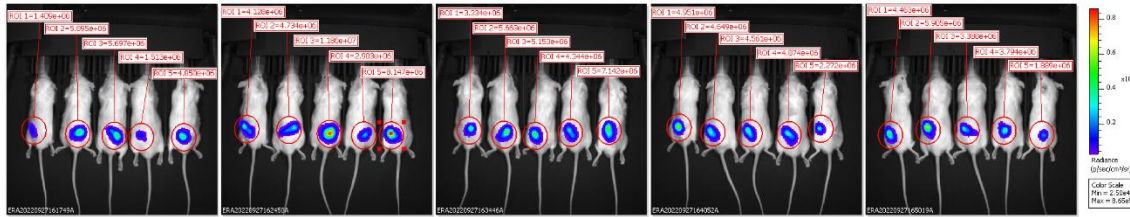


Figura 4.73. Bioluminiscencia de los tumores in vivo a las 5 horas de su inyección. Los ratones fueron sedados con isoflurano, y se les administraron intraperitonealmente 200 μ l de luciferina a 1 mg/ml. La señal de bioluminiscencia resultante se capturo mediante un aparato IVIS® Lumina III. Se trata de una imagen representativa de los distintos ratones a las 5 horas de haber inyectado las células MM.1S-GFP-Luc. No se indican aún los diferentes grupos experimentales ya que no se les habían inoculado todavía los distintos tipos de células NK.

Los resultados de la evolución de la bioluminiscencia de todos los ratones a lo largo del experimento se muestran en la Figura 4.74. En ella puede observarse que el crecimiento pasó primero por una fase de evolución lenta hasta el día 20, y a partir de ahí por una fase exponencial de crecimiento. La débil señal aparente registrada en los primeros días se debe a la diferencia de magnitud entre las señales al inicio (día 0) y al final (día 36) del experimento.

Bioluminiscencia de los tumores

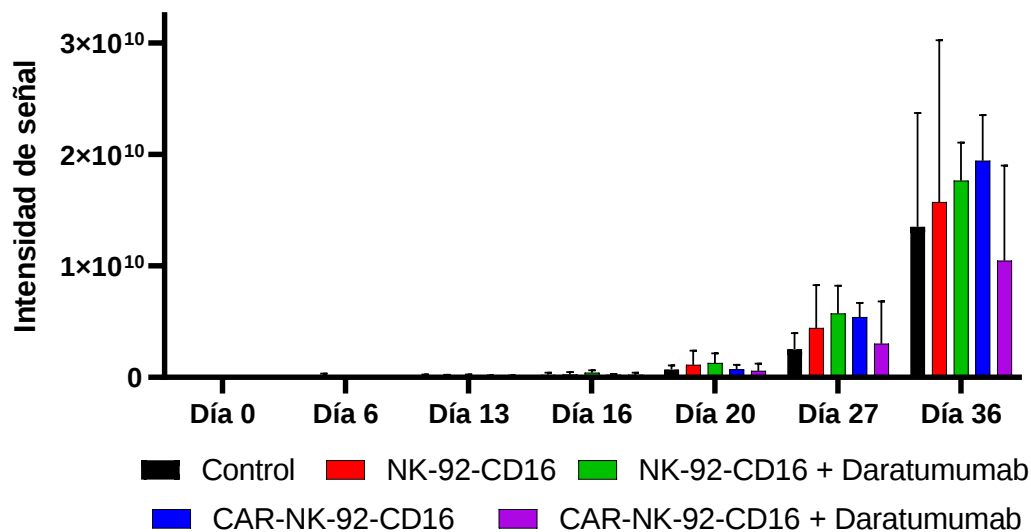


Figura 4.74. Crecimiento tumoral en función de su bioluminiscencia. Los ratones fueron sedados con isoflurano, y se les administraron 200 μ l de luciferina a 1 mg/ml vía intraperitoneal. La señal de bioluminiscencia resultante se capturó mediante un aparato IVIS® Lumina III. El eje de abscisas indica los días en los que se analizó el tamaño de los tumores a lo largo del experimento hasta el sacrificio de los ratones. Por su parte, el eje de ordenadas representa la intensidad de señal de bioluminiscencia captada por el aparato en cada uno de esos días. Los resultados se representan como la media $\pm$ SD de los valores de los ratones de cada grupo experimental.

Como se ha descrito en las medidas de tamaño (ver *Figura 4.72*), de nuevo el grupo experimental tratado con las células CAR-NK-92-CD16 combinadas con daratumumab mostró una señal de bioluminiscencia media más baja que la del grupo control, especialmente a día 36 (un 23% de inhibición). No obstante, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa, debido a la alta variabilidad entre individuos del mismo grupo.

Dado que los valores de bioluminiscencia obtenidos el día 0 no podían apreciarse en el gráfico anterior, en la *Figura 4.75A* se muestran de manera separada y ampliada. Sólo aparecen representados los veintidós ratones que llegaron a ser inoculados con las células terapéuticas y, por tanto, asignados a grupos experimentales concretos. Aunque se intentó que las medias de bioluminiscencia en los diferentes grupos fuera similar, sí que puede observarse que la media del grupo control fue algo más baja que en el resto de los grupos.

Para tratar de corregir este factor, se calculó el número de veces que la bioluminiscencia aumentó para cada ratón a lo largo del transcurso del experimento. En la *Figura 4.75B* se recogen los datos del ratio entre la bioluminiscencia del día final y la del día inicial $\pm$ la SD en cada grupo. Obviamente, sólo se han tenido en cuenta datos correspondientes a los ratones que sobrevivieron hasta ese día. De esta manera puede verse que el grupo control fue el que mayor media de crecimiento tumoral tuvo, en base al incremento de la bioluminiscencia. En este análisis alternativo, los cuatro grupos que recibieron tratamiento tuvieron un menor incremento medio de la bioluminiscencia, y, por ende, un menor crecimiento medio del tumor, siendo el de menor media el grupo tratado con las células CAR-NK-92-CD16 combinadas con daratumumab, que ya era el grupo que menor media presentaba en las mediciones de crecimiento por volumen y por señal de bioluminiscencia (ver *Figura 4.72* y *Figura 4.74*). Sin embargo, de nuevo la alta variabilidad en este caso del grupo control impide que estos resultados sean estadísticamente significativos. Se puede observar que parte de esta variabilidad se debe a los dos ratones del grupo control que empezaron el experimento siendo los que menor carga tumoral presentaban (ver *Figura 4.75A*), lo cual habría influido negativamente en el desarrollo de estos tumores.

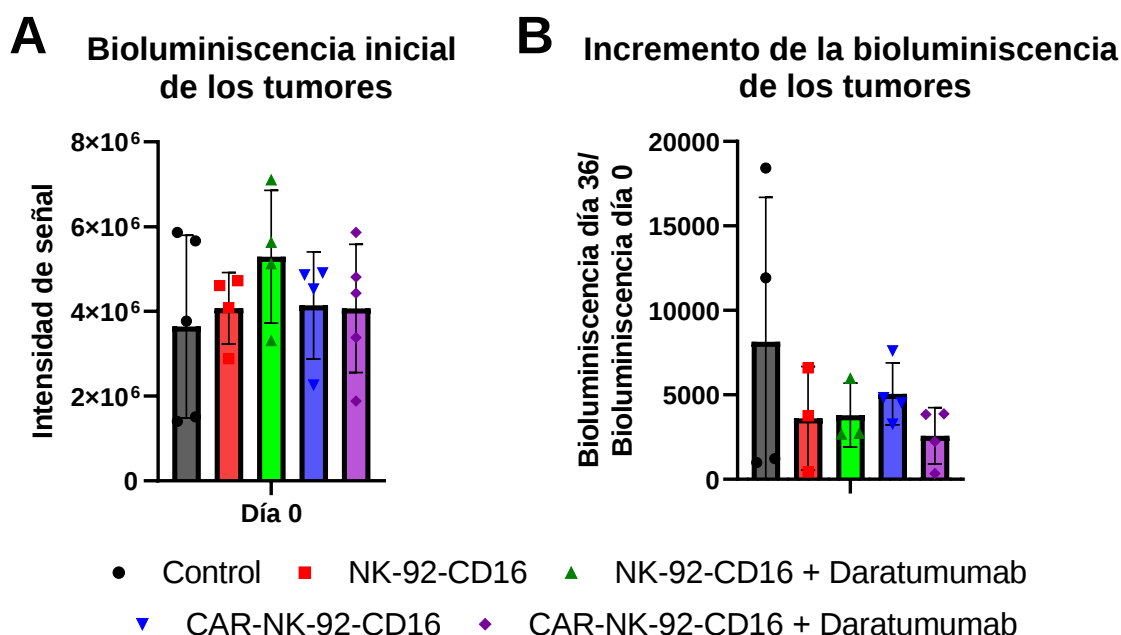


Figura 4.75. Evolución de la bioluminiscencia a lo largo del experimento *in vivo*. Los ratones fueron sedados con isoflurano, y se les administraron 200 μ l de luciferina a 1 mg/ml vía intraperitoneal. La señal de bioluminiscencia resultante se capturo mediante un aparato IVIS® Lumina III. A) Bioluminiscencia al inicio del experimento. El eje de abscisas indica el día de la adquisición de señal, y el eje de ordenadas representa la intensidad de señal de bioluminiscencia obtenida en cada animal. B) Incremento de la bioluminiscencia con el tiempo. Se calculó el ratio entre la señal bioluminiscente de cada ratón el último día de experimento y la señal inicial. El eje de ordenadas representa el número de veces que la señal de bioluminiscencia aumentó desde el principio hasta el final del experimento. En ambos casos los resultados aparecen como la media $\pm$ SD de los valores de los ratones de cada grupo experimental, con los valores individuales de cada ratón indicados como un punto.

Los resultados anteriores mostrados corresponden a mediciones realizadas en los ratones *in vivo*, pero también se obtuvieron datos adicionales *post-mortem*. El último día del experimento, se extrajeron los tumores y los bazo de los ratones, una vez fueron éstos sacrificados. Las muestras se procesaron (ver apartado 3.7) y se analizaron por citometría de flujo para determinar el porcentaje relativo tanto de las células tumorales (MM.1S-GFP-Luc) como de las células terapéuticas (NK-92-CD16 y CAR-NK-92-CD16). La detección y distinción de cada uno de estos tipos celulares fue posible gracias a la diferente intensidad de emisión de las proteínas fluorescentes (GFP en el caso de las células de MM, y ZsGreen en el caso de las efectoras) tal y como se ha indicado previamente (ver Figura 4.70).

En primer lugar, se analizó la cantidad de células MM.1S-GFP-Luc presentes en los diferentes grupos de tumores. En la Figura 4.76 aparecen los resultados, desglosados de manera individual para cada ratón. El grupo control fue bastante homogéneo (a excepción del ratón nº 4), con una media de $42,4\% \pm 3\%$ de células tumorales. En el resto de grupos, pudo comprobarse que la tendencia de los cuatro tratamientos fue reducir la cantidad de células

presentes en el tumor. Los grupos tratados con las células NK-92-CD16 en solitario y con las células CAR-NK-92-CD16 combinadas con daratumumab tuvieron resultados algo más heterogéneos, pero aun así la media grupal fue inferior a la del control: $36,1\% \pm 4\%$ y $37,4\% \pm 6\%$ respectivamente. Los dos grupos restantes, los tratados con células NK-92-CD16 combinadas con daratumumab y con las células CAR-NK-92-CD16 en solitario, tuvieron unos valores con menor variabilidad individual además de una media grupal inferior a la del control. De hecho, estos dos grupos tuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. En concreto, sus valores medios fueron de un $33,1\% \pm 0,3\%$ de células tumorales en el grupo tratado con las células NK-92-CD16 y daratumumab, y un $37\% \pm 1\%$ en el grupo que recibió las células CAR-NK-92-CD16.

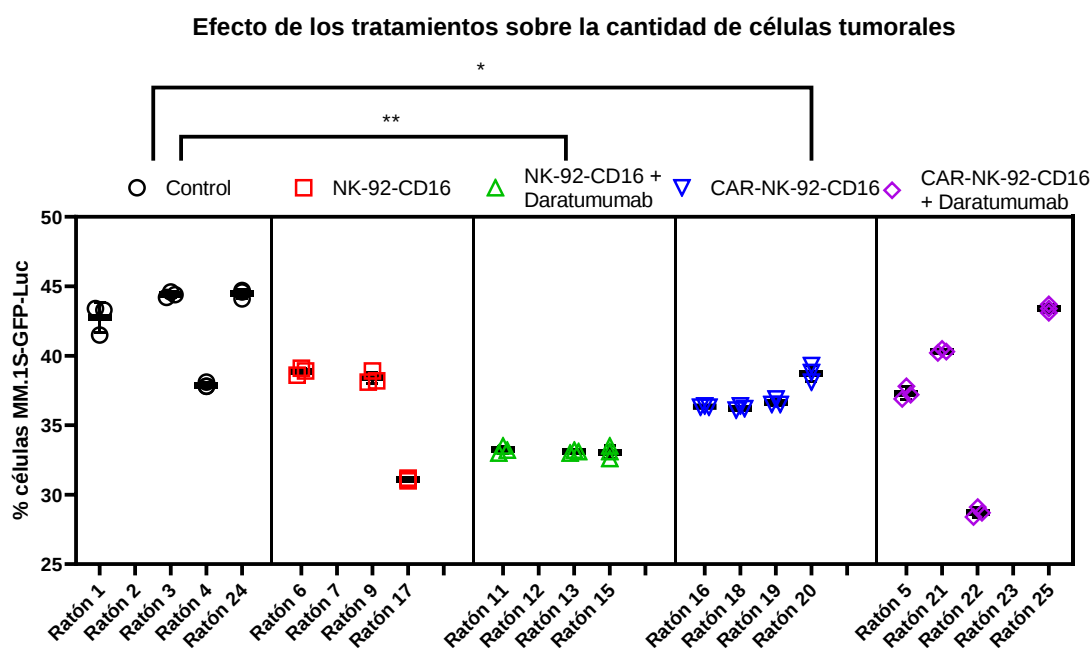


Figura 4.76. Cuantificación de la cantidad de células de MM presentes en el tumor. Las suspensiones celulares obtenidas de los tumores se analizaron por citometría de flujo, y las células MM.1S-GFP-Luc se detectaron y cuantificaron gracias a la fluorescencia de la proteína GFP. En el eje de abscisas se indican los ratones pertenecientes a cada grupo experimental, aunque de aquellos ratones que fallecieron antes del último día del experimento no se tienen datos. Por su parte, el eje de ordenadas representa el porcentaje de células MM.1S-GFP-Luc detectadas. Dado que cada muestra se analizó por triplicado, los resultados se muestran como los valores individuales para cada ratón, además de su media $\pm$ SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Al poder distinguir las células terapéuticas (tanto las células NK-92-CD16 como las células CAR-NK-92-CD16) de sus dianas por la fluorescencia emitida por la proteína ZsGreen, éstas también pudieron ser analizadas por citometría de flujo. La cantidad de células efectoras detectadas y cuantificadas en los tumores extraídos fue ínfima comparada con las cifras de las

células tumorales. En la *Figura 4.77* puede apreciarse que en ninguno de los grupos que recibieron tratamiento se superó el 1,5% de células terapéuticas infiltradas en el tumor.

A priori, éste podría parecer un mal resultado, pero hay que tener en cuenta la alta dependencia de las células NK-92 y las generadas a partir de ellas respecto a la IL-2, así como que la última tanda de células terapéuticas fue inyectada 6 días antes del sacrificio de los ratones y el análisis de los datos. Teniendo en cuenta la información obtenida en los cultivos *in vitro*, un periodo de 6 días sería un tiempo demasiado largo para que las células sobrevivieran sin haber añadido más IL-2 (tras 72 horas en cultivo sin IL-2, las células NK-92 empiezan a morir). Por tanto, las pocas células terapéuticas detectadas serían las únicas que todavía perduraran. No podemos estimar con precisión el número real de células que podrían haber llegado a infiltrarse, pero esto significa que tanto las células NK-92-CD16 como las células CAR-NK-92-CD16 fueron capaces de infiltrarse en cierta medida para llevar a cabo su acción antitumoral, puesta de manifiesto en una menor tasa de crecimiento de las células de MM (ver *Figura 4.75B*) y en la menor cantidad de células tumorales observadas en presencia de células NK (ver *Figura 4.76*)

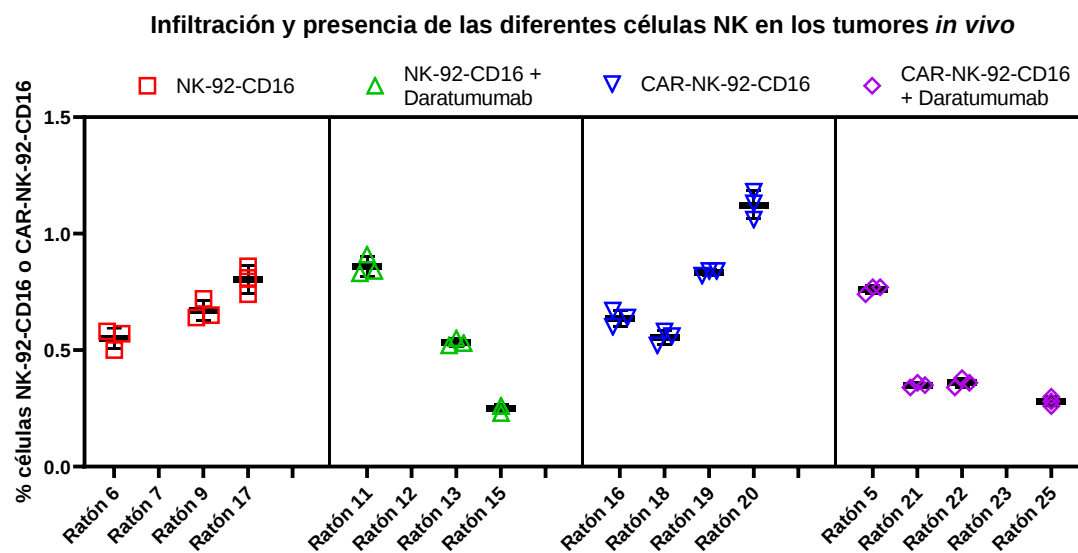


Figura 4.77. Cantidad de células NK infiltradas y presentes en los tumores. Las suspensiones celulares obtenidas de los tumores de células de MM se analizaron por citometría de flujo, y las células NK-92-CD16 o CAR-NK-92-CD16 (dependiendo del grupo experimental) se detectaron y cuantificaron gracias a la fluorescencia de la proteína ZsGreen. El eje de abscisas indica los valores en los diferentes ratones pertenecientes a cada grupo experimental. No se pudieron obtener datos de aquellos ratones que fallecieron antes del último día del periodo experimental. En el eje de ordenadas se indica el porcentaje de células terapéuticas detectadas. Dado que cada muestra se analizó por triplicado, los resultados se muestran como los valores individuales para cada ratón, además de su media $\pm$ SD.

En lo que respecta al análisis de los bazo extraídos, la cantidad de células tanto efectoras como tumorales detectadas no superó en ningún caso el 0,06%. Esto supone del orden de 100 veces menos células NK-92-CD16 ó CAR-NK-92-CD16 y 1.000 veces menos células

MM.1S-GFP-Luc que las encontradas en los tumores. Al igual que se ha comentado anteriormente, los bajos valores de células terapéuticas en circulación se explicarían por la falta de renovación de IL-2 en el experimento. Por otra parte, el hecho de haber detectado en el bazo células MM.1S-GFP-Luc podría significar que los tumores estaban iniciando ya la fase de metástasis.

Si bien estos resultados en su conjunto no son concluyentes, sí que resultan prometedores acerca del potencial terapéutico de las células NK-92-CD16 y CAR-NK-92-CD16. Sería necesario repetir el experimento *in vivo* modificando alguna de las condiciones experimentales para poder obtener resultados más robustos y estadísticamente significativos. Entre las posibles mejoras que se podrían implementar estaría la reducción del tiempo de espera desde que se inyectan las células tumorales hasta que se inoculan las células terapéuticas, y la administración periódica a los ratones de IL-2 para permitir una mayor supervivencia *in vivo* de las células terapéuticas, aumentando así su potencial antitumoral.

Recapitulando toda la información obtenida del experimento *in vivo*, se puede concluir que:

- El diseño y las condiciones experimentales utilizadas en el experimento *in vivo* no fueron las óptimas, por lo que sería necesario repetir el experimento en mejores condiciones para poder extraer resultados concluyentes y estadísticamente significativos.
- Las células NK-92-CD16 y CAR-NK-92-CD16 fueron capaces de infiltrarse en los tumores.
- Los cuatro tratamientos utilizados parecen tener una tendencia similar a limitar el crecimiento tumoral.
- Las células NK-92-CD16 fueron capaces, en combinación con daratumumab, de infiltrarse en los tumores y eliminar a las células de MM, reduciendo su cantidad relativa en comparación con el grupo control.
- La menor presencia de células de MM en los tumores tratados sólo con células CAR-NK-92-CD16 y la menor tendencia al crecimiento de los tumores en los grupos tratados con dichas células, tanto en solitario como combinadas con daratumumab, sugieren que el CAR anti-SLAMF7 es funcional. Además, de acuerdo con lo discutido en apartados previos (ver apartado 4.5.2), el incremento en la abundancia de células transfectadas CAR-NK-92-CD16 hasta llegar al 100% probablemente mejoraría los efectos teraoéuticos *in vivo*.

DISCUSIÓN GENERAL

El mieloma múltiple (MM) es el segundo cáncer hematológico más frecuente en países desarrollados (10% de las neoplasias sanguíneas) (Siegel et al., 2016), suponiendo el 1% de todas las neoplasias a nivel global (Cowan et al., 2018). Se caracteriza por la proliferación descontrolada de células plasmáticas monoclonales diferenciadas a partir de linfocitos B, que se acumulan en la médula ósea (Kumar et al., 2017; van de Donk et al., 2021). Las interacciones de estas células malignas con el microambiente de la médula ósea determinan la progresión del mieloma en los diferentes estadios de la enfermedad (Kumar et al., 2017).

Aunque los tratamientos han experimentado un gran avance en las últimas décadas, consiguiendo un aumento de la esperanza de vida de los pacientes, el MM todavía es, en última instancia, una patología incurable (van de Donk et al., 2021). Una terapia emergente, y que ha demostrado su utilidad en las neoplasias hematológicas, es la inmunoterapia. En particular, la terapia celular adoptiva basada en células asesinas naturales (*Natural Killer*, NK) o en células NK modificadas con un receptor de antígeno quimérico (CAR-NK) es una aproximación prometedora, ya que puede inducir potentes respuestas antitumorales de forma selectiva respetando a su vez a las células no cancerosas (Shimasaki et al., 2020). La elección de células NK en vez de linfocitos T para este tipo de terapias supone además ventajas, como menores costes y menos efectos adversos (Klingemann et al., 2016; Pittari et al., 2017), y abre la posibilidad de combinarlas con otra modalidad terapéutica como son los anticuerpos monoclonales (mAbs).

En este sentido, el mAb anti-CD38 daratumumab ha sido aprobado recientemente para el tratamiento del MM y exhibe efectos beneficiosos en un porcentaje elevado de casos (van de Donk et al., 2021; Viola et al., 2021). Este anticuerpo potencia la citotoxicidad de las células NK a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), además de tener efectos adicionales (Deckert et al., 2014; Touzeau et al., 2017; Viola et al., 2021).

A pesar de ya existir estudios y ensayos clínicos al respecto, la disposición de células NK en cantidades lo suficientemente grandes como para su uso terapéutico continúa siendo un problema importante (Pittari et al., 2017; Suck et al., 2016). Por lo tanto, el desarrollo de esta tesis se ha centrado en evaluar posibles fuentes de células que suplan dicho déficit, y, en particular, en la generación de un modelo de terapia celular contra el MM basado en células NK.

En un primer momento, se analizó la posibilidad de utilizar células NK activadas y expandidas (eNK), producidas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donantes sanos mediante un protocolo puesto a punto con anterioridad en nuestro laboratorio (Calvo et al., 2020; Reina-Ortiz et al., 2020; Sánchez-Martínez et al., 2018). Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto una vez más la capacidad de producir grandes cantidades de células activadas en cada expansión, con cifras en el orden de 10^8 células (Reina-Ortiz et al., 2020). Estas células eNK presentan una citotoxicidad celular basada principalmente en la ruta de los gránulos citotóxicos, con una contribución secundaria de los ligandos de los receptores mortales (ligandos mortales) en función de su nivel de expresión en cada expansión y en la sensibilidad de las células diana.

Entre las características observadas también destacan que las células generadas con este procedimiento no expresan moléculas como PD-1 (*Programmed cell Death protein 1*), de manera que no pueden recibir señalización inhibitoria a través de este eje regulatorio por parte de las células diana, y que su acción citotóxica contra el MM se ve incrementada al combinarlas con daratumumab. Esta potenciación es tanto mayor cuanto más CD38 expresan las células dianas.

Entre los aspectos negativos encontrados aparecen la vida limitada que tienen las células eNK y que obliga a realizar continuamente expansiones, así como los costes que eso conlleva. Y, sobre todo, se han evidenciado problemas de variabilidad a diferentes niveles entre cada expansión producida, debido a la genética intrínseca de las células de cada donante.

En algunos casos esta variabilidad ha afectado al nivel de implicación de la ruta de los ligandos mortales en función de la mayor o menor expresión de estas proteínas. Este hecho puede no tener tanta importancia dado que la principal vía citotóxica de las células eNK ha resultado ser la de los gránulos citotóxicos. Pero, en otros casos, la variabilidad ha afectado al nivel de muerte celular producida, ya sea por diferentes niveles de expresión de las proteínas citotóxicas, por diferencias en el reconocimiento de las dianas a través de los receptores activadores e inhibidores o por distintos grados de inducción de la ADCC.

Todo esto suponía un problema de reproducibilidad tanto de cara a su posible uso terapéutico como para el estudio de los mecanismos de la citotoxicidad inducida por estas células. Es por ello que, como alternativa, utilizamos las células NK-92.

Esta línea celular, al ser de origen tumoral, tiene una capacidad de expansión prácticamente ilimitada solventando ya de inicio una de las principales limitaciones de las células eNK (Gong et al., 1994; Shimasaki et al., 2020; Suck et al., 2016; Williams et al., 2017; Yan et al., 1998). Además, al estar activadas constitutivamente por su combinación de receptores activadores y la ausencia de receptores inhibitorios exhiben una alta citotoxicidad contra un amplio espectro de dianas tumorales (Klingemann et al., 2016; Shimasaki et al., 2020; Williams et al., 2017). De hecho, prácticamente en los primeros experimentos en los que se utilizaron estas células se comprobó que inducían más muerte sobre las células de MM que las células eNK.

No obstante, aunque las células NK-92 usadas en monoterapia ofrecían un mayor efecto que el de las células eNK, su carencia de expresión de CD16 impedía combinarlas con mAbs terapéuticos, como por ejemplo daratumumab (Gong et al., 1994; Klingemann et al., 2016; Maki et al., 2001; Shimasaki et al., 2020; Suck et al., 2016; Williams et al., 2017; Yan et al., 1998). Para corregir esta situación y poder aumentar su potencial citotóxico, se decidió generar una línea derivada de las células NK-92 que sobreexpresara dicho receptor.

La transfección, aunque ardua, fue un éxito. Tras varias rondas consecutivas de selección, facilitadas por la co-expresión de la proteína reportera ZsGreen, se consiguió generar la nueva línea NK-92-CD16. Esta línea ha mantenido de manera funcional y estable durante más

de dos años la expresión de ambas proteínas. La manipulación genética derivó además en un aumento de la capacidad citotóxica de las células, asociada aparentemente a la propia expresión de CD16, que conlleva un aumento de los niveles de proteínas citotóxicas como granzima B.

El estudio con distintos agentes bloqueantes reveló que la citotoxicidad sobre las dianas de MM tanto de las células NK-92 como de las NK-92-CD16, en las condiciones ensayadas, se debía únicamente a la ruta de los gránulos citotóxicos. Esto supone otra diferencia con respecto a las células eNK, a pesar de haberse detectado también la expresión intracelular de FasL (*Fas Ligand*) y TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) en las células NK-92 y en las generadas a partir de ellas. Además, dado que el marcaje con 7-aminoactinomicina D (7AAD) era despreciable, al contrario de lo observado con el marcaje de anexina-V DY634, se ha determinado que la muerte celular inducida por las células NK-92-CD16 sobre las células de MM es mayoritariamente apoptótica.

Una vez caracterizadas las células NK-92-CD16 el trabajo se centró en evaluar su posible utilidad para la terapia celular. Tras comprobar sus buenos resultados de citotoxicidad a ratios efector-diana 1-1 y 3-1 en ensayos de 4 horas, se analizaron también ratios con menor cantidad de células efectoras hasta llegar a 1-10. A dichos ratios la muerte celular producida a 4 y 24 horas era significativa, especialmente en presencia de daratumumab, consiguiéndose en algunas condiciones la eliminación casi completa de la población tumoral.

Cabía la posibilidad de que estos resultados pudieran estar sesgados por realizar los experimentos en condiciones de cultivo en 2D, de manera que se facilitaran las interacciones entre células. Sin embargo, cuando se repitió el ensayo de citotoxicidad en matrices tridimensionales, se comprobó la capacidad de las células NK-92-CD16 para infiltrarse en las estructuras tumorales sin que eso afecte al reconocimiento y eliminación de sus dianas.

Seguidamente, las células NK-92-CD16 se enfrentaron en solitario y combinadas con daratumumab a células plasmáticas procedentes de aspirados de médula ósea de pacientes de MM. Los resultados obtenidos en la combinación de las células NK-92-CD16 con daratumumab fueron muy prometedores. En muchas muestras se superó la barrera del 80% de muerte tumoral a ratios efector-diana 3-1. En todos los casos la combinación de las células NK-92-CD16 con daratumumab fue la que ofreció los mejores resultados gracias a la ADCC. Dicha combinación también fue efectiva en las células de pacientes que habían mostrado varias líneas de resistencia o en recaídas. Incluso tumores con muy poca expresión de CD38 pudieron ser eliminados. Estos resultados podrían quizá extrapolarse también a otros sistemas de combinación de las células NK-92-CD16 con los correspondientes mAbs dirigidos contra otros biomarcadores.

Todos estos resultados apoyaban sin duda el empleo de estas células como modelo de estudio *in vitro*, pero para poder aplicarlas en clínica como terapia era necesario exigirles mayores requisitos de seguridad. Aunque las células NK-92-CD16 han demostrado una gran selectividad hacia las células de MM sin necesidad de ser direccionadas por un mAb, respetando en gran medida las células sanas contra las que se han ensayado, no podrían ser administradas

directamente a los pacientes por tratarse de células tumorales (Gong et al., 1994; Klingemann et al., 2016; Suck et al., 2016).

Es por ello que en colaboración con el Departamento de Física y Protección Radiológica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa se comprobó que una dosis de irradiación de 10 Gy, empleada en estudios similares (Tang et al., 2018; Williams et al., 2017), servía para garantizar una administración segura. La irradiación genera un marco de actuación durante las primeras 48-72 horas tras el proceso, periodo de tiempo en el que la capacidad citotóxica ejercida por las células sería bastante similar a la de las células en condiciones estándar (un 80% aproximadamente). Con el paso de las horas las células NK-92-CD16 irradiadas dejan de ser viables, tal y como indicó el descenso en las cifras de viabilidad y de densidad celular de los cultivos monitorizados. Se advirtió además un descenso en la expresión de CD16 previo a la muerte de las pocas células todavía remanentes.

Después de constatar el potencial de las células NK-92-CD16 como modelo de terapia celular se decidió ir un paso más allá. Aunque las células tenían una gran actividad citotóxica, el mayor efecto sobre todo en las muestras procedentes de pacientes estaba normalmente asociado a la presencia de un mAb que inducía la ADCC, en nuestro caso daratumumab. Como alternativa a esta combinación, así como para explorar la posibilidad de aumentar todavía más la actividad citotóxica, se generaron, a partir de estas células, células CAR anti-SLAMF7. De esa forma, al expresarse en la membrana, el CAR actuaría induciendo la activación de las células efectoras de manera directa en vez de mediante la ADCC (Albinger et al., 2021; Klingemann et al., 2016; Pittari et al., 2017; Sadelain et al., 2013). Además, quedaría abierta la posibilidad de combinarlas con otro mAb a través del receptor CD16 para actuar simultáneamente contra dos dianas tumorales, aumentando así el espectro de acción y reduciendo el riesgo de escape del tumor.

En este caso, aunque se consiguió la transfección de las células NK-92-CD16 con el plásmido pBaBe-SLAMF7-CAR y se generaron las células CAR-NK-92-CD16 anti-SLAMF7, el proceso de selección no fue tan exitoso y la nueva línea sólo expresa el CAR en aproximadamente la mitad de las células. Estas células CAR-NK-92-CD16 mostraron un comportamiento similar *in vitro* al de las células NK-92-CD16, tanto en ausencia como en presencia de daratumumab, por lo que podrían surgir dudas respecto a la funcionalidad del CAR anti-SLAMF7 diseñado y expresado.

En el último experimento de esta tesis doctoral, realizado en un modelo animal *in vivo*, esas dudas parecieron disiparse. En este experimento se observaron indicios del efecto antitumoral de las células NK-92-CD16 y de las células CAR-NK-92-CD16, con una menor tasa de crecimiento tumoral en los grupos tratados respecto al grupo control mediante análisis por bioluminiscencia, así como una reducción de la cantidad de células malignas encontradas en el tumor. Aunque en cuanto a resultados el mejor grupo de tratamiento podría considerarse nuevamente el de las células NK-92-CD16 combinadas con daratumumab, el efecto en el grupo tratado sólo con las células CAR-NK-92-CD16 sugiere que el CAR anti-SLAMF7 es funcional.

En el experimento *in vivo* las diferencias que se han observado entre los distintos parámetros analizados en los grupos experimentales no llegaron a ser significativas y se evidenciaron fallos en el diseño experimental. Para poder disponer de datos concluyentes el experimento debería repetirse, pero, aun así, los resultados preliminares invitan al optimismo respecto al potencial terapéutico de ambas líneas celulares. Por último, de cara a la repetición del experimento *in vivo*, se debería modificar la cantidad de células y su forma de administración, al igual que la pauta temporal del experimento. Además, se debería implementar la administración periódica y frecuente de IL-2 para garantizar al máximo posible la viabilidad y actividad de las células terapéuticas, lo cual debería conducir a una potenciación de sus efectos.

CONCLUSIONES

- Las células NK activadas y expandidas (eNK) exhiben citotoxicidad sobre las distintas líneas celulares de mieloma múltiple (MM) humano y, al combinarlas con daratumumab, la citotoxicidad se ve incrementada en función del nivel de expresión de CD38 en la membrana de las células diana.
- En ambos casos el principal mecanismo citotóxico de las células eNK sobre las líneas celulares de MM es la vía de los gránulos citotóxicos y su magnitud depende de cada expansión generada, siendo variable en función de cada donante.
- Las células NK-92 presentan varias ventajas sobre las células eNK, entre ellas una mayor citotoxicidad celular, así como un crecimiento continuo y una reproducibilidad mucho mayor por tratarse de una línea celular establecida.
- El único mecanismo citotóxico de las células NK-92 que se ha constatado sobre las líneas celulares de MM es la vía de los gránulos citotóxicos. A pesar de haberse detectado expresión intracelular de FasL (*Fas Ligand*) y TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), no se ha observado contribución por su parte.
- La transfección de las células NK-92 con el plásmido pHIV-CD16-ZsGreen dio lugar a la nueva línea celular NK-92-CD16, en cuya membrana se expresa de manera funcional y estable la molécula CD16, permitiendo a estas células llevar a cabo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Además, la expresión de esta proteína regula positivamente la expresión de otras moléculas citotóxicas como granzima B.
- La mayor citotoxicidad de las células NK-92-CD16 respecto a su línea parental NK-92 permite que incluso a ratios efector-diana muy bajos consigan eliminar en solitario o en combinación con daratumumab una gran proporción de la población tumoral. Dicha citotoxicidad está mediada de igual manera por la vía de los gránulos citotóxicos e induce una muerte esencialmente apoptótica.
- Las células NK-92-CD16 son capaces de infiltrarse a través de matrices en 3D y encontrar a sus dianas sin que eso repercuta negativamente en su acción antitumoral.
- La irradiación de las células NK-92-CD16 a dosis de 10 Gy garantiza una aplicación segura en los pacientes a la par que permite una alta actividad citotóxica durante al menos 48 horas tras la irradiación.
- Las células NK-92-CD16 ejercen niveles marginales de citotoxicidad sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) o blastos T activados obtenidos de donantes sanos y son capaces de actuar sobre células plasmáticas procedentes de pacientes de MM, especialmente en combinación con daratumumab.
- Las células NK-92-CD16 son capaces de infiltrarse *in vivo* en tumores de MM humano generados en ratones inmunodeprimidos NSG (*NOD Scid gamma*) y de limitar el crecimiento tumoral, de acuerdo con las señales de bioluminiscencia. Además, en combinación con daratumumab pueden reducir la cantidad relativa de células tumorales en comparación con el grupo control.
- Las células CAR-NK-92-CD16, generadas mediante la transfección de las células NK-92-CD16 con el plásmido pBaBe-SLAMF7-CAR, expresan el receptor de antígeno

quimérico (CAR) anti-SLAMF7 de manera estable en la membrana, aunque no se haya conseguido purificar a homogeneidad la línea celular ni se observen diferencias de actividad citotóxica *in vitro* respecto a las células NK-92-CD16.

- Al igual que las células NK-92-CD16, las células CAR-NK-92-CD16 son capaces de infiltrarse *in vivo* en los tumores del modelo animal y de limitar el crecimiento tumoral en base a las señales de bioluminiscencia, tanto en solitario como combinadas con daratumumab. Esto, junto a la menor presencia de células tumorales en el grupo tratado sólo con células CAR-NK-92-CD16, sugiere que el CAR anti-SLAMF7 es funcional.

APÉNDICE

Translocaciones cromosómica					
Evento genómico	Oncogen implicado	Proteína codificada	Ruta afectada o efecto	Frecuencia en pacientes de MM	Prognosis
t(11;14)	CCND1	Ciclina D1	Progresión del ciclo celular	14%	Neutra o adversa
t(4;14)	NSD2	Histona-lisina N-metiltransferasa NSD2	Desregulación epigenética	11%	Adversa
	FGFR3	Receptor 3 del factor de crecimiento de los fibroblastos	Proliferación celular		
t(14;16)	MAF	Factor de transcripción Maf	Transcripción	3%	Neutra o adversa
t(14;20)	MAFB	Factor de transcripción MafB	Transcripción	1,5%	Adversa
t(6;14)	CCND3	Ciclina D3	Progresión del ciclo celular	≤1%	Neutra
t(8;14)	MYC	Proto-oncogen Myc	Activación de la transcripción de factores de crecimiento	15%	Adversa
Aneuploidías					
Tipo		Frecuencia en pacientes MM		Prognosis	
Hipodiploidías		35%		Sin determinar	
Pseudodiploidías		13%		Sin determinar	
Hiperdiploidías: Trisomías co-existentes entre los cromosomas 3, 5, 7, 9, 11, 15 y 19.		52%		Las de cromosoma 3 y cromosoma 5 pueden mejorar la prognosis de otros factores	
Pérdida (Del) o ganancia (Gain) de regiones cromosómicas					
Evento genómico	Oncogen implicado	Proteína codificada	Ruta afectada o efecto	Frecuencia en pacientes de MM	Prognosis
Del(1p)	CDKN2C FAF1 FAM46C	Inhibidor C de la quinasa dependiente de ciclina 4, Factor 1 asociado a Fas, Nucleotidil transferasa terminal 5C	Metabolismo DNA Metabolismo RNA	30%	Adversa
Del(11q)	BIRC2 BIRC3	Proteína 2 y Proteína 3 baculoviral que contienen repeticiones IAP	Apoptosis	Sin determinar	Sin determinar

Evento genómico	Oncogen implicado	Proteína codificada	Ruta afectada o efecto	Frecuencia en pacientes MM	Prognosis
Del(13q)	RB1 DIS3	Proteína asociada al retinoblastoma, Exonucleasa RRP44 del complejo exosómico	Ciclo celular, Metabolismo RNA	40%	Neutra
Del(17p)	TP53	p53	Reparación DNA	10%	Adversa
Del(12p)	CD27	CD27	Supervivencia y apoptosis	15%	Adversa
Del(14q)	TRAF3	Factor 3 asociado al receptor de TNF	Ruta de NK-κB y de las MAPK	10%	Sin determinar
Del(16q)	CYLD, WWOX	Ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa, Oxidoreductasa con dominio WW	Ruta de NK-κB, necrosis y apoptosis, Apoptosis	30%	Neutra
Gain(1q)	MCL1, CKS1B, BCL9	Mcl-1, Subunidad reguladora 1 de las quinasas dependientes de ciclinas, Célula B CLL/linfoma 9	Apoptosis, Ciclo celular, Ruta de Wnt	40%	Adversa
Gain(8q)	MYC	Proto-oncogen Myc	Activación de la transcripción de factores de crecimiento	15%	Neutra
Gain(11q)	CCND1	Ciclina D1	Progresión del ciclo celular	15%	Neutra
Mutaciones somáticas					
Oncogen implicado	Proteína codificada	Ruta afectada o efecto	Frecuencia en pacientes de MM	Prognosis	
KRAS	GTPasa KRas	Ruta de las MAPK	22%	Neutra	
NRAS	GTPasa NRas	Ruta de las MAPK	17%	Neutra	
BRAF	Serin-Treonin quinasa B-raf	Ruta de las MAPK	8%	Neutra	
TRAF3	Factor 3 asociado al receptor de TNF	Ruta de NK-κB y de las MAPK	15%	Neutra	
FAM46C	Nucleotidil transferasa terminal 5C	Metabolismo RNA	11%	Neutra	

Oncogen implicado	Proteína codificada	Ruta afectada o efecto	Frecuencia en pacientes MM	Prognosis
DIS3	Exonucleasa RRP44 del complejo exosómico	Metabolismo RNA	10%	Neutra
TP53	p53	Reparación DNA	8%	Adversa
IRF4	Factor 4 regulador del interferón	Diferenciación de las células plasmáticas	10%	Favorable
Alteraciones epigenéticas				
miRNA implicado		Ruta afectada o efecto		
miR-19a y miR-19b		Activación de JAK-STAT		

Tabla A.1. Principales eventos genéticos, tanto primarios como secundarios, causantes del MM. Información extraída de (Kumar et al., 2017; Manier et al., 2017; van de Donk et al., 2021), <https://www.uniprot.org/> y <https://www.genecards.org/>.

BIBLIOGRAFÍA

- Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2018). Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in Immunology*, 9(AUG), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>
- Agirre, X., Castellano, G., Pascual, M., Heath, S., Kulis, M., Segura, V., Bergmann, A., Esteve, A., Merkel, A., Raineri, E., Agueda, L., Blanc, J., Richardson, D., Clarke, L., Datta, A., Russiñol, N., Queirós, A. C., Beekman, R., Rodríguez-Madoz, J. R., ... Martín-Subero, J. I. (2015). Whole-epigenome analysis in multiple myeloma reveals DNA hypermethylation of B cell-specific enhancers. *Genome Research*, 25(4), 478–487. <https://doi.org/10.1101/gr.180240.114>
- Aktipis, C. A., Boddy, A. M., Jansen, G., Hibner, U., Hochberg, M. E., Maley, C. C., & Wilkinson, G. S. (2015). Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1673), 20140219. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0219>
- Alagpulinsa, D. A., Szalat, R. E., Poznansky, M. C., & Shmookler Reis, R. J. (2020). Genomic Instability in Multiple Myeloma. *Trends in Cancer*, 6(10), 858–873. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.05.006>
- Albinger, N., Hartmann, J., & Ullrich, E. (2021). Current status and perspective of CAR-T and CAR-NK cell therapy trials in Germany. *Gene Therapy*, 28(9), 513–527. <https://doi.org/10.1038/s41434-021-00246-w>
- Alegre, A., de la Rubia, J., Sureda Balari, A., Encinas Rodríguez, C., Suárez, A., Blanchard, M. J., Bargay Lleonart, J., Rodríguez-Otero, P., Insunza, A., Palomera, L., Peñarrubia, M. J., Ríos-Tamayo, R., Casado Montero, L. F., González, M. S., Potamianou, A., Couturier, C., Pei, H., Hevia, H., Milionis, I., ... Mateos, M.-V. (2020). Results of an Early Access Treatment Protocol of daratumumab Monotherapy in Spanish Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *HemaSphere*, 4(3), e380. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000380>
- Ali, S. A., Shi, V., Maric, I., Wang, M., Stroncek, D. F., Rose, J. J., Brudno, J. N., Stetler-Stevenson, M., Feldman, S. A., Hansen, B. G., Fellowes, V. S., Hakim, F. T., Gress, R. E., & Kochenderfer, J. N. (2016). T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood*, 128(13), 1688–1700. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-711903>
- An, N., Hou, Y. N., Zhang, Q. X., Li, T., Zhang, Q. L., Fang, C., Chen, H., Lee, H. C., Zhao, Y. J., & Du, X. (2018). Anti-Multiple Myeloma Activity of Nanobody-Based Anti-CD38 Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Molecular Pharmaceutics*, 15(10), 4577–4588. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00584>
- Anel, A., Buferne, M., Boyer, C., Schmitt-Verhulst, A. -M, & Golstein, P. (1994). T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein

- tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. *European Journal of Immunology*, 24(10), 2469–2476. <https://doi.org/10.1002/eji.1830241032>
- Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetyncck, S., Stewart, C. A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagné, F., Ugolini, S., & Vivier, E. (2006). Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. *Immunity*, 25(2), 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.06.013>
- Attal, M., Harousseau, J.-L., Stoppa, A.-M., Sotto, J.-J., Fuzibet, J.-G., Rossi, J.-F., Casassus, P., Maisonneuve, H., Facon, T., Ifrah, N., Payen, C., & Bataille, R. (1996). A Prospective, Randomized Trial of Autologous Bone Marrow Transplantation and Chemotherapy in Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 335(2), 91–97. <https://doi.org/10.1056/nejm199607113350204>
- Attal, M., Lauwers-Cances, V., Hulin, C., Leleu, X., Caillot, D., Escoffre, M., Arnulf, B., Macro, M., Belhadj, K., Garderet, L., Roussel, M., Payen, C., Mathiot, C., Feraud, J. P., Meuleman, N., Rollet, S., Maglio, M. E., Zeytoonjian, A. A., Weller, E. A., ... Moreau, P. (2017). Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 376(14), 1311–1320. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1611750>
- Augustson, B. M., Begum, G., Dunn, J. A., Barth, N. J., Davies, F., Morgan, G., Behrens, J., Smith, A., Child, J. A., & Drayson, M. T. (2005). Early Mortality After Diagnosis of Multiple Myeloma: Analysis of Patients Entered Onto the United Kingdom Medical Research Council Trials Between 1980 and 2002—Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *Journal of Clinical Oncology*, 23(36), 9219–9226. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.2086>
- Balkhi, M. Y. (2020). Chapter 3 - scFv Cloning, Vectors, and CAR-T Production in Laboratory for Preclinical Applications. In M. Y. Balkhi (Ed.), *Basics of Chimeric Antigen Receptor (CAR) Immunotherapy*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819573-4.00003-X>
- Barrow, A. D., Martin, C. J., & Colonna, M. (2019). The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Frontiers in Immunology*, 10(MAY), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00909>
- Battella, S., Cox, M. C., Santoni, A., & Palmieri, G. (2016). Natural killer (NK) cells and anti-tumor therapeutic mAb: unexplored interactions. *Journal of Leukocyte Biology*, 99(1), 87–96. <https://doi.org/10.1189/jlb.5VMR0415-141R>
- Baychelier, F., Sennepin, A., Ermonval, M., Dorgham, K., Debré, P., & Vieillard, V. (2013). Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood*, 122(17), 2935–2942. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-489054>
- Bedel, R., Thiery-Vuillemin, A., Grandclement, C., Balland, J., Remy-Martin, J.-P., Kantelip, B., Pallandre, J.-R., Pivot, X., Ferrand, C., Tiberghien, P., & Borg, C. (2011). Novel Role for

- STAT3 in Transcriptional Regulation of NK Immune Cell Targeting Receptor MICA on Cancer Cells. *Cancer Research*, 71(5), 1615–1626. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4540>
- Beldi-Ferchiou, A., Lambert, M., Dogniaux, S., Vély, F., Vivier, E., Olive, D., Dupuy, S., Levasseur, F., Zucman, D., Lebbé, C., Sène, D., Hivroz, C., & Caillat-Zucman, S. (2016). PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma. *Oncotarget*, 7(45), 72961–72977. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12150>
- Benson, D. M., Bakan, C. E., Mishra, A., Hofmeister, C. C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R. A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M. K., Greenfield, C. N., Porcu, P., Devine, S. M., Rotem-Yehudar, R., Lozanski, G., Byrd, J. C., & Caligiuri, M. A. (2010). The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood*, 116(13), 2286–2294. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-271874>
- Benson, D. M., & Byrd, J. C. (2012). CS1-Directed Monoclonal Antibody Therapy for Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 30(16), 2013–2015. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.4061>
- Berahovich, R., Zhou, H., Xu, S., Wei, Y., Guan, J., Guan, J., Harto, H., Fu, S., Yang, K., Zhu, S., Li, L., Wu, L., & Golubovskaya, V. (2018). CAR-T Cells Based on Novel BCMA Monoclonal Antibody Block Multiple Myeloma Cell Growth. *Cancers*, 10(9), 323. <https://doi.org/10.3390/cancers10090323>
- Bergsagel, P. L., Chesi, M., Nardini, E., Brents, L. A., Kirby, S. L., & Kuehl, W. M. (1996). Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13931–13936. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13931>
- Bergsagel, P. L., & Kuehl, W. M. (2005). Molecular Pathogenesis and a Consequent Classification of Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 23(26), 6333–6338. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.021>
- Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M., Zhan, F., Sawyer, J., Barlogie, B., & Shaughnessy, J. (2005). Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*, 106(1), 296–303. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0034>
- Bernal, M., Garrido, P., Jiménez, P., Carretero, R., Almagro, M., López, P., Navarro, P., Garrido, F., & Ruiz-Cabello, F. (2009). Changes in activatory and inhibitory natural killer (NK) receptors may induce progression to multiple myeloma: Implications for tumor evasion of T and NK cells. *Human Immunology*, 70(10), 854–857. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.07.004>
- Binsfeld, M., Fostier, K., Muller, J., Baron, F., Schots, R., Beguin, Y., Heusschen, R., & Caers, J.

- (2014). Cellular immunotherapy in multiple myeloma: Lessons from preclinical models. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1846(2), 392–404. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.08.001>
- Biran, N., Gournay Paleoudis, E., Feinman, R., Vesole, D. H., Zenreich, J., Wang, S., Ahn, J., Bansal, M., Rowley, S., Donato, M., Pecora, A. L., Richter, J., Anand, P., McBride, L., Ivanovski, K., Korngold, R., & Siegel, D. S. (2021). Pembrolizumab, lenalidomide and dexamethasone post autologous transplant in patients with high-risk multiple myeloma. *American Journal of Hematology*, 96(11), E430–E433. <https://doi.org/10.1002/ajh.26333>
- Blackadar, C. B. (2016). Historical review of the causes of cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 7(1), 54. <https://doi.org/10.5306/wjco.v7.i1.54>
- Blimark, C., Holmberg, E., Mellqvist, U. H., Landgren, O., Bjorkholm, M., Hultcrantz, M., Kjellander, C., Turesson, I., & Kristinsson, S. Y. (2015). Multiple myeloma and infections: A population-based study on 9253 multiple myeloma patients. *Haematologica*, 100(1), 107–113. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.107714>
- Blunt, M. D., & Khakoo, S. I. (2020). Activating killer cell immunoglobulin-like receptors: Detection, function and therapeutic use. *International Journal of Immunogenetics*, 47(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/iji.12461>
- Bock, F. J., & Tait, S. W. G. (2020). Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(2), 85–100. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>
- Bolli, N., Maura, F., Minvielle, S., Gloznik, D., Szalat, R., Fullam, A., Martincorena, I., Dawson, K. J., Samur, M. K., Zamora, J., Tarpey, P., Davies, H., Fulciniti, M., Shammas, M. A., Tai, Y. T., Magrangeas, F., Moreau, P., Corradini, P., Anderson, K., ... Munshi, N. (2018). Genomic patterns of progression in smoldering multiple myeloma. *Nature Communications*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05058-y>
- Borrego, F., Masilamani, M., Kabat, J., Sanni, T. B., & Coligan, J. E. (2005). The cell biology of the human natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor. *Molecular Immunology*, 42(4), 485–488. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.031>
- Bossi, G., & Griffiths, G. M. (1999). Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nature Medicine*, 5(1), 90–96. <https://doi.org/10.1038/4779>
- Brandt, C. S., Baratin, M., Yi, E. C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C. D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E., & Levin, S. D. (2009). The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *Journal of Experimental Medicine*, 206(7), 1495–1503. <https://doi.org/10.1084/jem.20090681>
- Braud, V. M., Allan, D. S. J., O'Callaghan, C. A., Söderström, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S.,

- Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L., & McMichael, A. J. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, 391(6669), 795–799. <https://doi.org/10.1038/35869>
- Brentjens, R. J., Davila, M. L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L. G., Bartido, S., Stefanski, J., Taylor, C., Olszewska, M., Borquez-Ojeda, O., Qu, J., Wasielewska, T., He, Q., Bernal, Y., Rijo, I. V., Hedvat, C., Kobos, R., Curran, K., ... Sadelain, M. (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Science Translational Medicine*, 5(177). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005930>
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Barber, D. F., Ljunggren, H.-G., & Long, E. O. (2005). Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *Journal of Experimental Medicine*, 202(7), 1001–1012. <https://doi.org/10.1084/jem.20051143>
- Bu, D.-X., Singh, R., Choi, E. E., Ruella, M., Nunez-Cruz, S., Mansfield, K. G., Bennett, P., Barton, N., Wu, Q., Zhang, J., Wang, Y., Wei, L., Cogan, S., Ezell, T., Joshi, S., Latimer, K. J., Granda, B., Tschantz, W. R., Young, R. M., ... Milone, M. C. (2018). Pre-clinical validation of B cell maturation antigen (BCMA) as a target for T cell immunotherapy of multiple myeloma. *Oncotarget*, 9(40), 25764–25780. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25359>
- Cai, X., Zhan, H., Ye, Y., Yang, J., Zhang, M., Li, J., & Zhuang, Y. (2021). Current Progress and Future Perspectives of Immune Checkpoint in Cancer and Infectious Diseases. *Frontiers in Genetics*, 12(November), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.785153>
- Calvo, T., Reina-Ortiz, C., Giraldo, D., Gascón, M., Woods, D., Asenjo, J., Marco-Brualla, J., Azaceta, G., Izquierdo, I., Palomera, L., Sánchez-Martínez, D., Marzo, I., Naval, J., Vilches, C., Villalba, M., & Anel, A. (2020). Expanded and activated allogeneic NK cells are cytotoxic against B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells with sporadic cases of resistance. *Scientific Reports*, 10(1), 19398. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76051-z>
- Cantley, L. C., Auger, K. R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., & Soltoff, S. (1991). Oncogenes and signal transduction. *Cell*, 64(2), 281–302. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90639-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90639-G)
- Cao, X., Shores, E. W., Hu-Li, J., Anver, M. R., Kelsail, B. L., Russell, S. M., Drago, J., Noguchi, M., Grinberg, A., Bloom, E. T., Paul, W. E., Katz, S. I., Love, P. E., & Leonard, W. J. (1995). Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor γ chain. *Immunity*, 2(3), 223–238. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90047-0](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90047-0)
- Carlsten, M., Korde, N., Kotecha, R., Reger, R., Bor, S., Kazandjian, D., Landgren, O., & Childs, R. W. (2016). Checkpoint Inhibition of KIR2D with the Monoclonal Antibody IPH2101 Induces Contraction and Hyporesponsiveness of NK Cells in Patients with Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 22(21), 5211–5222. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1108>

- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(7), 395–417. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>
- Carpenter, R. O., Evbuomwan, M. O., Pittaluga, S., Rose, J. J., Raffeld, M., Yang, S., Gress, R. E., Hakim, F. T., & Kochenderfer, J. N. (2013). B-cell Maturation Antigen is a Promising Target for Adoptive T-cell Therapy of Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 19(8), 2048–2060. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2422>
- Carretero, M., Cantoni, C., Bellón, T., Bottino, C., Biassoni, R., Rodríguez, A., Pérez-Villar, J. J., Moretta, L., Moretta, A., & López-Botet, M. (1997). The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *European Journal of Immunology*, 27(2), 563–567. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270230>
- Casucci, M., Di Robilant, B. N., Falcone, L., Camisa, B., Norelli, M., Genovese, P., Gentner, B., Gullotta, F., Ponzoni, M., Bernardi, M., Marcatti, M., Saudemont, A., Bordignon, C., Savoldo, B., Ciceri, F., Naldini, L., Dotti, G., Bonini, C., & Bondanza, A. (2013). CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Blood*, 122(20), 3461–3472. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-493361>
- Caumartin, J., Favier, B., Daouya, M., Guillard, C., Moreau, P., Carosella, E. D., & LeMaoult, J. (2007). Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *The EMBO Journal*, 26(5), 1423–1433. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601570>
- Cavo, M., Gay, F., Beksac, M., Pantani, L., Petrucci, M. T., Dimopoulos, M. A., Dozza, L., van der Holt, B., Zweegman, S., Oliva, S., van der Velden, V. H. J., Zamagni, E., Palumbo, G. A., Patriarca, F., Montefusco, V., Galli, M., Maisnar, V., Gamberi, B., Hansson, M., ... Sonneveld, P. (2020). Autologous haematopoietic stem-cell transplantation versus bortezomib–melphalan–prednisone, with or without bortezomib–lenalidomide–dexamethasone consolidation therapy, and lenalidomide maintenance for newly diagnosed multiple myeloma (EMN02/HO95): a mult. *The Lancet Haematology*, 7(6), e456–e468. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(20\)30099-5](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(20)30099-5)
- Chen, K. H., Wada, M., Pinz, K. G., Liu, H., Shuai, X., Chen, X., Yan, L. E., Petrov, J. C., Salman, H., Senzel, L., Leung, E. L. H., Jiang, X., & Ma, Y. (2018). A compound chimeric antigen receptor strategy for targeting multiple myeloma. *Leukemia*, 32(2), 402–412. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.302>
- Chijioke, O., Müller, A., Feederle, R., Barros, M. H. M., Krieg, C., Emmel, V., Marcenaro, E., Leung, C. S., Antsiferova, O., Landtwin, V., Bossart, W., Moretta, A., Hassan, R., Boyman, O., Niedobitek, G., Delecluse, H.-J., Capaul, R., & Münz, C. (2013). Human natural killer cells prevent infectious mononucleosis features by targeting lytic Epstein-Barr virus infection. *Cell Reports*, 5(6), 1489–1498. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.041>
- Child, J. A., Morgan, G. J., Davies, F. E., Owen, R. G., Bell, S. E., Hawkins, K., Brown, J., Drayson, M. T., & Selby, P. J. (2003). High-Dose Chemotherapy with Hematopoietic Stem-

- Cell Rescue for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 348(19), 1875–1883.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa022340>
- Chiossone, L., Dumas, P.-Y., Vienne, M., & Vivier, E. (2018). Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nature Reviews Immunology*, 18(11), 671–688.
<https://doi.org/10.1038/s41577-018-0061-z>
- Cho, F.-N., Chang, T.-H., Shu, C.-W., Ko, M.-C., Liao, S.-K., Wu, K.-H., Yu, M.-S., Lin, S.-J., Hong, Y.-C., Chen, C.-H., Hung, C.-H., & Chang, Y.-H. (2014). Enhanced Cytotoxicity of Natural Killer Cells following the Acquisition of Chimeric Antigen Receptors through Trogocytosis. *PLoS ONE*, 9(10), e109352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109352>
- Cho, S.-F., Anderson, K. C., & Tai, Y.-T. (2018). Targeting B Cell Maturation Antigen (BCMA) in Multiple Myeloma: Potential Uses of BCMA-Based Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01821>
- Chu, J., Deng, Y., Benson, D. M., He, S., Hughes, T., Zhang, J., Peng, Y., Mao, H., Yi, L., Ghoshal, K., He, X., Devine, S. M., Zhang, X., Caligiuri, M. A., Hofmeister, C. C., & Yu, J. (2014). CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma. *Leukemia*, 28(4), 917–927. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.279>
- Chu, J., He, S., Deng, Y., Zhang, J., Peng, Y., Hughes, T., Yi, L., Kwon, C.-H., Wang, Q.-E., Devine, S. M., He, X., Bai, X.-F., Hofmeister, C. C., & Yu, J. (2014). Genetic Modification of T Cells Redirected toward CS1 Enhances Eradication of Myeloma Cells. *Clinical Cancer Research*, 20(15), 3989–4000. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2510>
- Cifaldi, L., Prencipe, G., Caiello, I., Bracaglia, C., Locatelli, F., De Benedetti, F., & Strippoli, R. (2015). Inhibition of Natural Killer Cell Cytotoxicity by Interleukin-6: Implications for the Pathogenesis of Macrophage Activation Syndrome. *Arthritis & Rheumatology*, 67(11), 3037–3046. <https://doi.org/10.1002/art.39295>
- Clémenceau, B., Congy-Jolivet, N., Gallot, G., Vivien, R., Gaschet, J., Thibault, G., & Vié, H. (2006). Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is mediated by genetically modified antigen-specific human T lymphocytes. *Blood*, 107(12), 4669–4677. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3775>
- Clémenceau, B., Vivien, R., Pellat, C., Foss, M., Thibault, G., & Vié, H. (2013). The human natural killer cytotoxic cell line NK-92, once armed with a murine CD16 receptor, represents a convenient cellular tool for the screening of mouse mAbs according to their ADCC potential. *MAbs*, 5(4), 587–594. <https://doi.org/10.4161/mabs.25077>
- Clemens, P. L., Yan, X., Lokhorst, H. M., Lonial, S., Losic, N., Khan, I., Jansson, R., Ahmadi, T., Lantz, K., Zhou, H., Puchalski, T., & Xu, X. S. (2017). Pharmacokinetics of daratumumab Following Intravenous Infusion in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma After Prior

- Proteasome Inhibitor and Immunomodulatory Drug Treatment. *Clinical Pharmacokinetics*, 56(8), 915–924. <https://doi.org/10.1007/s40262-016-0477-1>
- Coiffier, B. (2003). Monoclonal antibodies in the management of newly diagnosed, aggressive B-cell lymphoma. *Current Hematology Reports*, 2(1), 23–29.
- Coley, W. B. (1893). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. *The American Journal of the Medical Sciences*, 105, 487–510. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1984929>
- Costa, F., Marchica, V., Storti, P., Malavasi, F., & Giuliani, N. (2021). PD-L1/PD-1 Axis in Multiple Myeloma Microenvironment and a Possible Link with CD38-Mediated Immune-Suppression. *Cancers*, 13(2), 164. <https://doi.org/10.3390/cancers13020164>
- Costa, F., Toscani, D., Chillemi, A., Quarona, V., Bolzoni, M., Marchica, V., Vescovini, R., Mancini, C., Martella, E., Campanini, N., Schifano, C., Bonomini, S., Accardi, F., Horenstein, A. L., Aversa, F., Malavasi, F., & Giuliani, N. (2017). Expression of CD38 in myeloma bone niche: A rational basis for the use of anti-CD38 immunotherapy to inhibit osteoclast formation. *Oncotarget*, 8(34), 56598–56611. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17896>
- Cotter, T. G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer*, 9(7), 501–507. <https://doi.org/10.1038/nrc2663>
- Cowan, A. J., Allen, C., Barac, A., Basaleem, H., Bensenor, I., Curado, M. P., Foreman, K., Gupta, R., Harvey, J., Hosgood, H. D., Jakovljevic, M., Khader, Y., Linn, S., Lad, D., Mantovani, L., Nong, V. M., Mokdad, A., Naghavi, M., Postma, M., ... Fitzmaurice, C. (2018). Global Burden of Multiple Myeloma: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *JAMA Oncology*, 4(9), 1221. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2128>
- Cyster, J. G. (2003). Homing of antibody secreting cells. *Immunological Reviews*, 194, 48–60. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00041.x>
- Dai, H.-S., & Caligiuri, M. A. (2018). Molecular Basis for the Recognition of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection by Human Natural Killer Cells. *Frontiers in Immunology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00183>
- Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A., & Dalton, W. S. (1999). Cell Adhesion Mediated Drug Resistance (CAM-DR): Role of Integrins and Resistance to Apoptosis in Human Myeloma Cell Lines. *Blood*, 93(5), 1658–1667. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10029595>
- de Haart, S. J., Holthof, L., Noort, W. A., Minnema, M. C., Emmelot, M. E., Aarts-Riemens, T., Doshi, P., Sasser, K., Yuan, H., de Bruijn, J., Martens, A. C. M., van de Donk, N. W. C. J., Lokhorst, H. M., Groen, R. W. J., & Mutis, T. (2016). Sepantronium bromide (YM155) improves daratumumab-mediated cellular lysis of multiple myeloma cells by abrogation of bone marrow stromal cell-induced resistance. *Haematologica*, 101(8), e339–e342.

<https://doi.org/10.3324/haematol.2015.139667>

- de Miguel, D., Ramirez-Labrada, A., Uranga, I., Hidalgo, S., Santiago, L., Galvez, E. M., Arias, M., & Pardo, J. (2022). Inflammatory cell death induced by cytotoxic lymphocytes: a dangerous but necessary liaison. *The FEBS Journal*, 289(15), 4398–4415. <https://doi.org/10.1111/febs.16093>
- de Visser, J. A. G. M., & Rozen, D. E. (2006). Clonal interference and the periodic selection of new beneficial mutations in *Escherichia coli*. *Genetics*, 172(4), 2093–2100. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.052373>
- de Weers, M., Tai, Y.-T., van der Veer, M. S., Bakker, J. M., Vink, T., Jacobs, D. C. H., Oomen, L. A., Peipp, M., Valerius, T., Slootstra, J. W., Mutis, T., Bleeker, W. K., Anderson, K. C., Lokhorst, H. M., van de Winkel, J. G. J., & Parren, P. W. H. I. (2011). Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. *The Journal of Immunology*, 186(3), 1840–1848. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003032>
- Deaglio, S., Aydin, S., Vaisitti, T., Bergui, L., & Malavasi, F. (2008). CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target. *Trends in Molecular Medicine*, 14(5), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.02.005>
- Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B., & Robson, S. C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *Journal of Experimental Medicine*, 204(6), 1257–1265. <https://doi.org/10.1084/jem.20062512>
- Deaglio, S., Mehta, K., & Malavasi, F. (2001). Human CD38: A (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leukemia Research*, 25(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(00\)00093-X](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(00)00093-X)
- Deckert, J., Wetzel, M.-C., Bartle, L. M., Skaletskaya, A., Goldmacher, V. S., Vallée, F., Zhou-Liu, Q., Ferrari, P., Pouzieux, S., Lahoute, C., Dumontet, C., Plesa, A., Chiron, M., Lejeune, P., Chittenden, T., Park, P. U., & Blanc, V. (2014). SAR650984, A Novel Humanized CD38-Targeting Antibody, Demonstrates Potent Antitumor Activity in Models of Multiple Myeloma and Other CD38+ Hematologic Malignancies. *Clinical Cancer Research*, 20(17), 4574–4583. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0695>
- Dhar, P., & Wu, J. D. (2018). NKG2D and its ligands in cancer. *Current Opinion in Immunology*, 51(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.02.004>
- Díaz-Rodríguez, E., Álvarez-Fernández, S., Chen, X., Paiva, B., López-Pérez, R., García-Hernández, J. L., San Miguel, J. F., & Pandiella, A. (2011). Deficient Spindle Assembly Checkpoint in Multiple Myeloma. *PLoS ONE*, 6(11), e27583.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027583>

- Dimopoulos, M. A., Goldschmidt, H., Niesvizky, R., Joshua, D., Chng, W.-J., Oriol, A., Orlowski, R. Z., Ludwig, H., Facon, T., Hajek, R., Weisel, K., Hungria, V., Minuk, L., Feng, S., Zahlten-Kumeli, A., Kimball, A. S., & Moreau, P. (2017). Carfilzomib or bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): an interim overall survival analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 18(10), 1327–1337. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30578-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30578-8)
- Dimopoulos, M. A., Moreau, P., Palumbo, A., Joshua, D., Pour, L., Hájek, R., Facon, T., Ludwig, H., Oriol, A., Goldschmidt, H., Rosiñol, L., Straub, J., Suvorov, A., Araujo, C., Rimashevskaya, E., Pika, T., Gaidano, G., Weisel, K., Goranova-Marinova, V., ... Chng, W.-J. (2016). Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *The Lancet Oncology*, 17(1), 27–38. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00464-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00464-7)
- Dimopoulos, M. A., Oriol, A., Nahi, H., San-Miguel, J., Bahlis, N. J., Usmani, S. Z., Rabin, N., Orlowski, R. Z., Komarnicki, M., Suzuki, K., Plesner, T., Yoon, S.-S., Ben Yehuda, D., Richardson, P. G., Goldschmidt, H., Reece, D., Lisby, S., Khokhar, N. Z., O'Rourke, L., ... Moreau, P. (2016). Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 375(14), 1319–1331. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1607751>
- Dimopoulos, M. A., Spencer, A., Attal, M., Prince, H. M., Harousseau, J.-L., Dmoszynska, A., Miguel, J. S., Hellmann, A., Facon, T., Foà, R., Corso, A., Masliak, Z., Olesnyckyj, M., Yu, Z., Patin, J., Zeldis, J. B., & Knight, R. D. (2007). Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 357(21), 2123–2132. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa070594>
- Dopfer, E. P., Minguet, S., & Schamel, W. W. A. (2011). A New Vampire Saga: The Molecular Mechanism of T Cell Trogocytosis. *Immunity*, 35(2), 151–153. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.08.004>
- Dosani, T., Carlsten, M., Maric, I., & Landgren, O. (2015). The cellular immune system in myelomagenesis: NK cells and T cells in the development of MM and their uses in immunotherapies. *Blood Cancer Journal*, 5(4), e306–e306. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.32>
- Drent, E., Groen, R. W. J., Noort, W. A., Themeli, M., van Bueren, J. J. L., Parren, P. W. H. I., Kuball, J., Sebestyen, Z., Yuan, H., de Bruijn, J., van de Donk, N. W. C. J., Martens, A. C. M., Lokhorst, H. M., & Mutis, T. (2016). Pre-clinical evaluation of CD38 chimeric antigen receptor engineered T cells for the treatment of multiple myeloma. *Haematologica*, 101(5), 616–625. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.137620>

- Dunn, G. P., Koebel, C. M., & Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*, 6(11), 836–848. <https://doi.org/10.1038/nri1961>
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>
- Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G., & Schindler, D. G. (1993). Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), 720–724. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.720>
- Faguet, G. B. (2015). A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. *International Journal of Cancer*, 136(9), 2022–2036. <https://doi.org/10.1002/ijc.29134>
- Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H.-G., & Bryceson, Y. T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*, 115(11), 2167–2176. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-238469>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Fernández de Larrea, C., Staehr, M., Lopez, A. V., Ng, K. Y., Chen, Y., Godfrey, W. D., Purdon, T. J., Ponomarev, V., Wendel, H.-G., Brentjens, R. J., & Smith, E. L. (2020). Defining an Optimal Dual-Targeted CAR T-cell Therapy Approach Simultaneously Targeting BCMA and GPRC5D to Prevent BCMA Escape–Driven Relapse in Multiple Myeloma. *Blood Cancer Discovery*, 1(2), 146–154. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-20-0020>
- Feyler, S., von Lilienfeld-Toal, M., Jarmin, S., Marles, L., Rawstron, A., Ashcroft, A. J., Owen, R. G., Selby, P. J., & Cook, G. (2009). CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are increased whilst CD3+CD4–CD8–αβTCR+ Double Negative T cells are decreased in the peripheral blood of patients with multiple myeloma which correlates with disease burden. *British Journal of Haematology*, 144(5), 686–695. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07530.x>
- Finn, O. J. (2018). The dawn of vaccines for cancer prevention. *Nature Reviews Immunology*, 18(3), 183–194. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.140>
- Fionda, C., Soriani, A., Zingoni, A., Santoni, A., & Cippitelli, M. (2015). NKG2D and DNAM-1 Ligands: Molecular Targets for NK Cell-Mediated Immunotherapeutic Intervention in Multiple Myeloma. *BioMed Research International*, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/178698>

- Fisher, D. T., Appenheimer, M. M., & Evans, S. S. (2014). The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Seminars in Immunology*, 26(1), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.01.008>
- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M. R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., Lopez-Vergès, S., Lanier, L. L., Weisdorf, D., & Miller, J. S. (2012). Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood*, 119(11), 2665–2674. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-386995>
- Foulds, L. (1954). The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Research*, 14(5), 327–339. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13160960>
- Frerichs, K. A., Nagy, N. A., Lindenbergh, P. L., Bosman, P., Marin Soto, J., Broekmans, M., Groen, R. W. J., Themeli, M., Nieuwenhuis, L., Stege, C., Nijhof, I. S., Mutis, T., Zweegman, S., Lokhorst, H. M., & van de Donk, N. W. C. J. (2018). CD38-targeting antibodies in multiple myeloma: mechanisms of action and clinical experience. *Expert Review of Clinical Immunology*, 14(3), 197–206. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2018.1443809>
- Freud, A. G., Mundy-Bosse, B. L., Yu, J., & Caligiuri, M. A. (2017). The broad spectrum of human natural killer cell diversity. *Immunity*, 47(5), 820–833. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.008>
- Freud, A. G., Yu, J., & Caligiuri, M. A. (2014). Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Seminars in Immunology*, 26(2), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.02.008>
- Friedmann-Morvinski, D., Bendavid, A., Waks, T., Schindler, D., & Eshhar, Z. (2005). Redirected primary T cells harboring a chimeric receptor require costimulation for their antigen-specific activation. *Blood*, 105(8), 3087–3093. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3737>
- Friend, R., Bhutani, M., Voorhees, P. M., & Usmani, S. Z. (2017). Clinical potential of SLAMF7 antibodies – focus on elotuzumab in multiple myeloma. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 893–900. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S98053>
- Gazdar, A. F., Oie, H. K., Kirsch, I. R., & Hollis, G. F. (1986). Establishment and characterization of a human plasma cell myeloma culture having a rearranged cellular myc proto-oncogene. *Blood*, 67(6), 1542–1549. <https://doi.org/10.1182/blood.v67.6.1542.1542>
- Ghobrial, I. M., Detappe, A., Anderson, K. C., & Steensma, D. P. (2018). The bone-marrow niche in MDS and MGUS: implications for AML and MM. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(4), 219–233. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.197>
- Gogishvili, T., Danhof, S., Prommersberger, S., Rydzek, J., Schreder, M., Brede, C., Einsele, H., & Hudecek, M. (2017). SLAMF7-CAR T cells eliminate myeloma and confer selective fratricide of SLAMF7+ normal lymphocytes. *Blood*, 130(26), 2838–2847. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-778423>

- Goldman-Leikin, R. E., Salwen, H. R., Herst, C. V., Variakojis, D., Lu Bian, M., Le Beau, M. M., Selvanayagan, P., Marder, R., Anderson, R., Weitzman, S., & Rosen, S. T. (1989). Characterization of a novel myeloma cell line, MM.1. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 113(3), 325–334.
- Gómez-Benito, M., Martínez-Lorenzo, M. J., Anel, A., Marzo, I., & Naval, J. (2007). Membrane expression of DR4, DR5 and caspase-8 levels, but not Mcl-1, determine sensitivity of human myeloma cells to Apo2L/TRAIL. *Experimental Cell Research*, 313(11), 2378–2388. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.018>
- Gong, J. H., Maki, G., & Klingemann, H. G. (1994). Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*, 8(4), 652–658. <https://europepmc.org/article/med/8152260>
- Gonsalves, W. I., Rajkumar, S. V., Gupta, V., Morice, W. G., Timm, M. M., Singh, P. P., Dispenzieri, A., Buadi, F. K., Lacy, M. Q., Kapoor, P., Gertz, M. A., & Kumar, S. K. (2014). Quantification of clonal circulating plasma cells in newly diagnosed multiple myeloma: implications for redefining high-risk myeloma. *Leukemia*, 28(10), 2060–2065. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.98>
- González, D., Van Der Burg, M., García-Sanz, R., Fenton, J. A., Langerak, A. W., González, M., Van Dongen, J. J. M., San Miguel, J. F., & Morgan, G. J. (2007). Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*, 110(9), 3112–3121. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-069625>
- Greenstein, S., Krett, N. L., Kurosawa, Y., Ma, C., Chauhan, D., Hideshima, T., Anderson, K. C., & Rosen, S. T. (2003). Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines. *Experimental Hematology*, 31(4), 271–282. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(03\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(03)00023-7)
- Greiner, D. L., Hesselton, R. A., & Shultz, L. D. (1998). SCID Mouse Models of Human Stem Cell Engraftment. *STEM CELLS*, 16(3), 166–177. <https://doi.org/10.1002/stem.160166>
- Gross, G., Waks, T., & Eshhar, Z. (1989). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 10024–10028. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.10024>
- Grote, S., Traub, F., Mittelstaet, J., Seitz, C., Kaiser, A., Handgretinger, R., & Schleicher, S. (2021). Adapter Chimeric Antigen Receptor (AdCAR)-Engineered NK-92 Cells for the Multiplex Targeting of Bone Metastases. *Cancers*, 13(5), 1124. <https://doi.org/10.3390/cancers13051124>
- Grupp, S. A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D. L., Rheingold, S. R., Teachey, D. T., Chew, A., Hauck, B., Wright, J. F., Milone, M. C., Levine, B. L., & June, C. H. (2013). Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *New England*

- Journal of Medicine*, 368(16), 1509–1518. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215134>
- Guo, B., Chen, M., Han, Q., Hui, F., Dai, H., Zhang, W., Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, H., & Han, W. (2016). CD138-directed adoptive immunotherapy of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells for multiple myeloma. *Journal of Cellular Immunotherapy*, 2(1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.jocit.2014.11.001>
- Hajdu, S. I. (2011). A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*, 117(5), 1097–1102. <https://doi.org/10.1002/cncr.25553>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hata, A. N., Engelman, J. A., & Faber, A. C. (2015). The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics. *Cancer Discovery*, 5(5), 475–487. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0011>
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry. Biokhimiia*, 62(11), 1180–1190. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9467840>
- Hecht, M.-L., Rosental, B., Horlacher, T., Hershkovitz, O., De Paz, J. L., Noti, C., Schauer, S., Porgador, A., & Seeberger, P. H. (2009). Natural Cytotoxicity Receptors NKp30, NKp44 and NKp46 Bind to Different Heparan Sulfate/Heparin Sequences. *Journal of Proteome Research*, 8(2), 712–720. <https://doi.org/10.1021/pr800747c>
- Herberman, R. B., Nunn, M. E., Holden, H. T., & Lavrin, D. H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *International Journal of Cancer*, 16(2), 230–239. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910160205>
- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., Bruns, C. J., & Heeschen, C. (2007). Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell*, 1(3), 313–323. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.06.002>
- Heuck, C. J., Mehta, J., Bhagat, T., Gundabolu, K., Yu, Y., Khan, S., Chrysofakis, G., Schinke, C., Tariman, J., Vickrey, E., Pulliam, N., Nischal, S., Zhou, L., Bhattacharyya, S., Meagher, R., Hu, C., Maqbool, S., Suzuki, M., Parekh, S., ... Singhal, S. B. (2013). Myeloma is characterized by stage specific alterations in DNA methylation that occur early during myelomagenesis. *The Journal of Immunology*, 190(6), 2966–2975.

- <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202493>
- Horenstein, A. L., Chillemi, A., Quarona, V., Zito, A., Roato, I., Morandi, F., Marimpietri, D., Bolzoni, M., Toscani, D., Oldham, R. J., Cuccioloni, M., Kate Sasser, A., Pistoia, V., Giuliani, N., & Malavasi, F. (2015). Nad⁺-metabolizing ectoenzymes in remodeling tumor–host interactions: The human myeloma model. *Cells*, 4(3), 520–537. <https://doi.org/10.3390/cells4030520>
- Horenstein, A. L., Chillemi, A., Zaccarello, G., Bruzzzone, S., Quarona, V., Zito, A., Serra, S., & Malavasi, F. (2013). A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *Oncot Immunology*, 2(9), 1–14. <https://doi.org/10.4161/onci.26246>
- Hsi, E. D., Steinle, R., Balasa, B., Szmania, S., Draksharapu, A., Shum, B. P., Huseni, M., Powers, D., Nanisetti, A., Zhang, Y., Rice, A. G., van Abbema, A., Wong, M., Liu, G., Zhan, F., Dillon, M., Chen, S., Rhodes, S., Fuh, F., ... Williams, M. B. (2008). CS1, a Potential New Therapeutic Antibody Target for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 14(9), 2775–2784. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4246>
- Hui, L., & Chen, Y. (2015). Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Letters*, 368(1), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.039>
- Iannello, A., Samarani, S., Debbeche, O., Ahmad, R., Boulassel, M.-R., Tremblay, C., Toma, E., Routy, J.-P., & Ahmad, A. (2009). Potential Role of Interleukin-18 in the Immunopathogenesis of AIDS: Involvement in Fratricidal Killing of NK Cells. *Journal of Virology*, 83(12), 5999–6010. <https://doi.org/10.1128/JVI.02350-08>
- Ichim, G., & Tait, S. W. G. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, 16(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.58>
- Jackson, H. J., Rafiq, S., & Brentjens, R. J. (2016). Driving CAR T-cells forward. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13(6), 370–383. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.36>
- Jaime-Sánchez, P., Uranga-Murillo, I., Aguiló, N., Khouili, S. C., Arias, M. A., Sancho, D., & Pardo, J. (2020). Cell death induced by cytotoxic CD8 + T cells is immunogenic and primes caspase-3–dependent spread immunity against endogenous tumor antigens. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8(1), e000528. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000528>
- Janssen, L. M. E., Ramsay, E. E., Logsdon, C. D., & Overwijk, W. W. (2017). The immune system in cancer metastasis: friend or foe? *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 5(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0283-9>
- Jarauta, V., Jaime, P., Gonzalo, O., de Miguel, D., Ramírez-Labrada, A., Martínez-Lostao, L., Anel, A., Pardo, J., Marzo, I., & Naval, J. (2016). Inhibition of autophagy with chloroquine potentiates carfilzomib-induced apoptosis in myeloma cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 382(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.08.019>

- Jayaraman, J., Mellody, M. P., Hou, A. J., Desai, R. P., Fung, A. W., Pham, A. H. T., Chen, Y. Y., & Zhao, W. (2020). CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102931>
- Jelinek, T., Paiva, B., & Hajek, R. (2018). Update on PD-1/PD-L1 Inhibitors in Multiple Myeloma. *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02431>
- Jiang, H., Zhang, W., Shang, P., Zhang, H., Fu, W., Ye, F., Zeng, T., Huang, H., Zhang, X., Sun, W., Man-Yuen Sze, D., Yi, Q., & Hou, J. (2014). Transfection of chimeric anti-CD138 gene enhances natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells. *Molecular Oncology*, 8(2), 297–310. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.12.001>
- Jinushi, M., Vanneman, M., Munshi, N. C., Tai, Y. T., Prabhala, R. H., Ritz, J., Neuberg, D., Anderson, K. C., Carrasco, D. R., & Dranoff, G. (2008). MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(4), 1285–1290. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711293105>
- Johnson, D. B., Nebhan, C. A., Moslehi, J. J., & Balko, J. M. (2022). Immune-checkpoint inhibitors: long-term implications of toxicity. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 19(4), 254–267. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00600-w>
- Joly, E., & Hudrisier, D. (2003). What is trogocytosis and what is its purpose? *Nature Immunology*, 4(9), 815–815. <https://doi.org/10.1038/ni0903-815>
- Jost, S., & Altfeld, M. (2013). Control of Human Viral Infections by Natural Killer Cells. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 163–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100001>
- Jourdan, M., Ferlin, M., Legouffe, E., Horvathova, M., Liautard, J., Rossi, J. F., Wijdenes, J., Brochier, J., & Klein, B. (1998). The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *British Journal of Haematology*, 100(4), 637–646. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00623.x>
- Juriscic, V., Srdic, T., Konjevic, G., Markovic, O., & Colovic, M. (2007). Clinical stage-depending decrease of NK cell activity in multiple myeloma patients. *Medical Oncology*, 24(3), 312–317. <https://doi.org/10.1007/s12032-007-0007-y>
- Kärre, K. (2008). Natural killer cell recognition of missing self. *Nature Immunology*, 9(5), 477–480. <https://doi.org/10.1038/ni0508-477>
- Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K., & Yagita, H. (1995). Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *Journal of Experimental Medicine*, 182(6), 1777–1783. <https://doi.org/10.1084/jem.182.6.1777>
- Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N.,

- Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., Brasel, K., Morrissey, P. J., Stocking, K., Schuh, J. C. L., Joyce, S., & Peschon, J. J. (2000). Reversible Defects in Natural Killer and Memory Cd8 T Cell Lineages in Interleukin 15–Deficient Mice. *Journal of Experimental Medicine*, 191(5), 771–780. <https://doi.org/10.1084/jem.191.5.771>
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x>
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., & Wigzell, H. (1975). "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *European Journal of Immunology*, 5(2), 117–121. <https://doi.org/10.1002/eji.1830050209>
- Kim, N., Lee, H. H., Lee, H. J., Choi, W. S., Lee, J., & Kim, H. S. (2019). Natural killer cells as a promising therapeutic target for cancer immunotherapy. *Archives of Pharmacal Research*, 42(7), 591–606. <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01143-y>
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S. M., Lybarger, L., Song, Y.-J., Yang, L., French, A. R., Sunwoo, J. B., Lemieux, S., Hansen, T. H., & Yokoyama, W. M. (2005). Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*, 436(7051), 709–713. <https://doi.org/10.1038/nature03847>
- Kim, Y., Suh, N., Sporn, M., & Reed, J. C. (2002). An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22320–22329. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202458200>
- Klingemann, H. G., Boissel, L., & Toneguzzo, F. (2016). Natural Killer Cells for Immunotherapy – Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. *Frontiers in Immunology*, 7(MAR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00091>
- Klingemann, H. G. (2013). Cellular therapy of cancer with natural killer cells—where do we stand? *Cytotherapy*, 15(10), 1185–1194. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.03.011>
- Kochenderfer, J. N., Wilson, W. H., Janik, J. E., Dudley, M. E., Stetler-Stevenson, M., Feldman, S. A., Maric, I., Raffeld, M., Nathan, D.-A. N., Lanier, B. J., Morgan, R. A., & Rosenberg, S. A. (2010). Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*, 116(20), 4099–4102. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-281931>
- Köhler, M., Greil, C., Hudecek, M., Lonial, S., Raje, N., Wäsch, R., & Engelhardt, M. (2018). Current developments in immunotherapy in the treatment of multiple myeloma. *Cancer*, 124(10), 2075–2085. <https://doi.org/10.1002/cncr.31243>
- Konjević, G. M., Vuletić, A. M., Mirjačić Martinović, K. M., Larsen, A. K., & Jurišić, V. B. (2019). The role of cytokines in the regulation of NK cells in the tumor environment. *Cytokine*,

- 117(February), 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.02.001>
- Krajewska, M., Krajewski, S., Banares, S., Huang, X., Turner, B., Bubendorf, L., Kallioniemi, O. P., Shabaik, A., Vitiello, A., Peehl, D., Gao, G. J., & Reed, J. C. (2003). Elevated Expression of Inhibitor of Apoptosis Proteins in Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 9(13), 4914–4925.
- Krejci, J., Casneuf, T., Nijhof, I. S., Verbist, B., Bald, J., Plesner, T., Syed, K., Liu, K., van de Donk, N. W. C. J., Weiss, B. M., Ahmadi, T., Lokhorst, H. M., Mutis, T., & Sasser, A. K. (2016). Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*, 128(3), 384–394. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-687749>
- Krejci, J., Frerichs, K. A., Nijhof, I. S., van Kessel, B., van Velzen, J. F., Bloem, A. C., Broekmans, M. E. C., Zweegman, S., van Meerloo, J., Musters, R. J. P., Poddighe, P. J., Groen, R. W. J., Chiu, C., Plesner, T., Lokhorst, H. M., Sasser, A. K., Mutis, T., & van de Donk, N. W. C. J. (2017). Monocytes and Granulocytes Reduce CD38 Expression Levels on Myeloma Cells in Patients Treated with daratumumab. *Clinical Cancer Research*, 23(24), 7498–7511. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2027>
- Krzywinska, E., Allende-Vega, N., Cornillon, A., Vo, D.-N., Cayrefourcq, L., Panabieres, C., Vilches, C., Déchanet-Merville, J., Hicheri, Y., Rossi, J.-F., Cartron, G., & Villalba, M. (2015). Identification of Anti-tumor Cells Carrying Natural Killer (NK) Cell Antigens in Patients With Hematological Cancers. *EBioMedicine*, 2(10), 1364–1376. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.08.021>
- Kumar, S. K. (2018). Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. *Immunology*, 154(3), 383–393. <https://doi.org/10.1111/imm.12921>
- Kumar, S. K., Dimopoulos, M. A., Kastritis, E., Terpos, E., Nahi, H., Goldschmidt, H., Hillengass, J., Leleu, X., Beksac, M., Alsina, M., Oriol, A., Cavo, M., Ocio, E. M., Mateos, M. V., O'Donnell, E. K., Vij, R., Lokhorst, H. M., Van De Donk, N. W. C. J., Min, C., ... Durie, B. G. M. (2017). Natural history of relapsed myeloma, refractory to immunomodulatory drugs and proteasome inhibitors: a multicenter IMWG study. *Leukemia*, 31(11), 2443–2448. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.138>
- Kumar, S. K., & Rajkumar, S. V. (2018). The multiple myelomas — current concepts in cytogenetic classification and therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(7), 409–421. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0018-y>
- Kumar, S. K., Rajkumar, V., Kyle, R. A., van Duin, M., Sonneveld, P., Mateos, M.-V., Gay, F., & Anderson, K. C. (2017). Multiple myeloma. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17046. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>
- Kyle, R. A., Remstein, E. D., Therneau, T. M., Dispenzieri, A., Kurtin, P. J., Hodnefield, J. M.,

- Larson, D. R., Plevak, M. F., Jelinek, D. F., Fonseca, R., Melton, L. J., & Rajkumar, S. V. (2007). Clinical Course and Prognosis of Smoldering (Asymptomatic) Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 356(25), 2582–2590. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa070389>
- Kyle, R. A., Therneau, T. M., Rajkumar, S. V., Larson, D. R., Plevak, M. F., Offord, J. R., Dispenzieri, A., Katzmann, J. A., & Melton, L. J. (2006). Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *New England Journal of Medicine*, 354(13), 1362–1369. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa054494>
- Lad, D., Huang, Q., Hoeppli, R., Garcia, R., Xu, L., Levings, M., Song, K., & Broady, R. (2019). Evaluating the role of Tregs in the progression of multiple myeloma. *Leukemia and Lymphoma*, 60(9), 2134–2142. <https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1579324>
- Lam, V. C., & Lanier, L. L. (2017). NK cells in host responses to viral infections. *Current Opinion in Immunology*, 44(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.11.003>
- Landgren, O., Kyle, R. A., Pfeiffer, R. M., Katzmann, J. A., Caporaso, N. E., Hayes, R. B., Dispenzieri, A., Kumar, S., Clark, R. J., Baris, D., Hoover, R., & Rajkumar, S. V. (2009). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*, 113(22), 5412–5417. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-194241>
- Larsen, B. D., & Sørensen, C. S. (2017). The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *The FEBS Journal*, 284(8), 1160–1170. <https://doi.org/10.1111/febs.13970>
- Lazarova, M., & Steinle, A. (2019). Impairment of NKG2D-Mediated Tumor Immunity by TGF- β . *Frontiers in Immunology*, 10(November), 10–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02689>
- LeBlanc, H. N., & Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death & Differentiation*, 10(1), 66–75. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401187>
- Lee, D. W., Barrett, D. M., Mackall, C., Orentas, R., & Grupp, S. A. (2012). The Future Is Now: Chimeric Antigen Receptors as New Targeted Therapies for Childhood Cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(10), 2780–2790. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1920>
- Leivas, A., Valeri, A., Córdoba, L., García-Ortiz, A., Ortiz, A., Sánchez-Vega, L., Graña-Castro, O., Fernández, L., Carreño-Tarragona, G., Pérez, M., Megías, D., Paciello, M. L., Sánchez-Pina, J., Pérez-Martínez, A., Lee, D. A., Powell, D. J., Río, P., & Martínez-López, J. (2021). NKG2D-CAR-transduced natural killer cells efficiently target multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*, 11(8), 146. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00537-w>
- Levine, A. J. (1997). p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*, 88(3), 323–331. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81871-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81871-1)
- Linkermann, A., Stockwell, B. R., Krautwald, S., & Anders, H. (2014). Regulated cell death and

- inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nature Reviews Immunology*, 14(11), 759–767. <https://doi.org/10.1038/nri3743>
- Liu, E., Marin, D., Banerjee, P., Macapinlac, H. A., Thompson, P., Basar, R., Nassif Kerbauy, L., Overman, B., Thall, P., Kaplan, M., Nandivada, V., Kaur, I., Nunez Cortes, A., Cao, K., Daher, M., Hosing, C., Cohen, E. N., Kebriaei, P., Mehta, R., ... Rezvani, K. (2020). Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *New England Journal of Medicine*, 382(6), 545–553. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910607>
- Liu, Q., Xu, Y., Mou, J., Tang, K., Fu, X., Li, Y., Xing, Y., Rao, Q., Xing, H., Tian, Z., Wang, M., & Wang, J. (2020). Irradiated chimeric antigen receptor engineered NK-92MI cells show effective cytotoxicity against CD19+ malignancy in a mouse model. *Cytotherapy*, 22(10), 552–562. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.06.003>
- Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF Receptor Superfamilies. *Cell*, 104(4), 487–501. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00237-9)
- Lodolce, J. P., Boone, D. L., Chai, S., Swain, R. E., Dassopoulos, T., Trettin, S., & Ma, A. (1998). IL-15 Receptor Maintains Lymphoid Homeostasis by Supporting Lymphocyte Homing and Proliferation. *Immunity*, 9(5), 669–676. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80664-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80664-0)
- Lokhorst, H. M., Plesner, T., Laubach, J. P., Nahi, H., Gimsing, P., Hansson, M., Minnema, M. C., Lassen, U., Krejci, J., Palumbo, A., van de Donk, N. W. C. J., Ahmadi, T., Khan, I., Uhlar, C. M., Wang, J., Sasser, A. K., Losic, N., Lisby, S., Basse, L., ... Richardson, P. G. (2015). Targeting CD38 with daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 373(13), 1207–1219. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1506348>
- Lonial, S., Weiss, B. M., Usmani, S. Z., Singhal, S., Chari, A., Bahlis, N. J., Belch, A., Krishnan, A., Vescio, R. A., Mateos, M. V., Mazumder, A., Orlowski, R. Z., Sutherland, H. J., Bladé, J., Scott, E. C., Oriol, A., Berdeja, J., Gharibo, M., Stevens, D. A., ... Voorhees, P. M. (2016). Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. *The Lancet*, 387(10027), 1551–1560. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01120-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01120-4)
- Lugini, L., Cecchetti, S., Huber, V., Luciani, F., Macchia, G., Spadaro, F., Paris, L., Abalsamo, L., Colone, M., Molinari, A., Podo, F., Rivoltini, L., Ramoni, C., & Fais, S. (2012). Immune Surveillance Properties of Human NK Cell-Derived Exosomes. *The Journal of Immunology*, 189(6), 2833–2842. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101988>
- Mahaweni, N. M., Bos, G. M. J., Mitsiades, C. S., Tilanus, M. G. J., & Wieten, L. (2018). Daratumumab augments alloreactive natural killer cell cytotoxicity towards CD38+ multiple myeloma cell lines in a biochemical context mimicking tumour microenvironment conditions. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 67(6), 861–872. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2140-1>

- Mahindra, A., Hideshima, T., & Anderson, K. C. (2010). Multiple myeloma: biology of the disease. *Blood Reviews*, 24(SUPPL. 1), S5–S11. [https://doi.org/10.1016/S0268-960X\(10\)70003-5](https://doi.org/10.1016/S0268-960X(10)70003-5)
- Maki, G., Klingemann, H.-G., Martinson, J. A., & Tam, Y. K. (2001). Factors Regulating the Cytotoxic Activity of the Human Natural Killer Cell Line, NK-92. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 10(3), 369–383. <https://doi.org/10.1089/152581601750288975>
- Malaer, J. D., & Mathew, P. A. (2017). CS1 (SLAMF7, CD319) is an effective immunotherapeutic target for multiple myeloma. *American Journal of Cancer Research*, 7(8), 1637–1641. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28861320>
- Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., Horenstein, A. L., Ortolan, E., Vaisitti, T., & Aydin, S. (2008). Evolution and Function of the ADP Ribosyl Cyclase/CD38 Gene Family in Physiology and Pathology. *Physiological Reviews*, 88(3), 841–886. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2007>
- Malavasi, F., Funaro, A., Roggero, S., Horenstein, A., Calosso, L., & Mehta, K. (1994). Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunology Today*, 15(3), 95–97. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90148-1](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90148-1)
- Malmberg, K.-J., Carlsten, M., Björklund, A., Sohlberg, E., Bryceson, Y. T., & Ljunggren, H.-G. (2017). Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer. *Seminars in Immunology*, 31(July), 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.08.002>
- Maloney, D. G. (2003). Rituximab for follicular lymphoma. *Current Hematology Reports*, 2(1), 13–22. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(08\)70036-6](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(08)70036-6)
- Maloney, D. G., Grillo-López, A. J., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., Neidhart, J. A., Janakiraman, N., Foon, K. A., Liles, T.-M., Dallaire, B. K., Wey, K., Royston, I., Davis, T., & Levy, R. (1997). IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Patients With Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*, 90(6), 2188–2195. <https://doi.org/10.1182/blood.V90.6.2188>
- Manier, S., Kawano, Y., Bianchi, G., Roccaro, A. M., & Ghobrial, I. M. (2016). Cell autonomous and microenvironmental regulation of tumor progression in precursor states of multiple myeloma. *Current Opinion in Hematology*, 23(4), 426–433. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000259>
- Manier, S., Salem, K. Z., Park, J., Landau, D. A., Getz, G., & Ghobrial, I. M. (2017). Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(2), 100–113. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.122>
- Marcenaro, E., Augugliaro, R., Falco, M., Castriconi, R., Parolini, S., Sivori, S., Romeo, E., Millo, R., Moretta, L., Bottino, C., & Moretta, A. (2003). CD59 is physically and functionally associated with natural cytotoxicity receptors and activates human NK cell-mediated cytotoxicity. *European Journal of Immunology*, 33(12), 3367–3376.

<https://doi.org/10.1002/eji.200324425>

- Martínez-Lorenzo, M. J., Alava, M. A., Anel, A., Piñeiro, A., & Naval, J. (1996). Release of preformed Fas ligand in soluble form is the major factor for activation-induced death of Jurkat T cells. *Immunology*, 89(4), 511–517. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1996.d01-782.x>
- Martínez-Lorenzo, M. J., Alava, M. A., Gamen, S., Kim, K. J., Chuntharapai, A., Piñeiro, A., Naval, J., & Anel, A. (1998). Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *European Journal of Immunology*, 28(9), 2714–2725. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199809\)28:09<2714::AID-IMMU2714>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199809)28:09<2714::AID-IMMU2714>3.0.CO;2-9)
- Martínez-Lorenzo, M. J., Anel, A., Gamen, S., Monleón, I., Lasierra, P., Larrad, L., Piñeiro, A., Alava, M. A., & Naval, J. (1999). Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(3), 1274–1281. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415024>
- Martínez-Lostao, L., Anel, A., & Pardo, J. (2015). How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clinical Cancer Research*, 21(22), 5047–5056. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0685>
- Mateos, M.-V., Hernández, M.-T., Salvador, C., Rubia, J. de la, de Arriba, F., López-Corral, L., Rosiñol, L., Paiva, B., Palomera, L., Bargay, J., Oriol, A., Prosper, F., López, J., Arguiñano, J.-M., Bladé, J., Lahuerta, J.-J., & San-Miguel, J. (2022). Lenalidomide-dexamethasone versus observation in high-risk smoldering myeloma after 12 years of median follow-up time: A randomized, open-label study. *European Journal of Cancer*, 174, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2022.07.030>
- Matsuoka, Y., Moore, G. E., Yagi, Y., & Pressman, D. (1967). Production of Free Light Chains of Immunoglobulin by a Hematopoietic Cell Line Derived from a Patient with Multiple Myeloma. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 125(4), 1246–1250. <https://doi.org/10.3181/00379727-125-32327>
- Mattiuzzi, C., & Lippi, G. (2019). Current Cancer Epidemiology. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 9(4), 217. <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191008.001>
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology*, 12(1), 991–1045. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.005015>
- Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., Chew, A., Gonzalez, V. E., Zheng, Z., Lacey, S. F., Mahnke, Y. D., Melenhorst, J. J., Rheingold, S. R., Shen, A., Teachey, D. T., Levine, B. L., June, C. H., Porter, D. L., & Grupp, S. A. (2014). Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 371(16), 1507–1517. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407222>

- McArdel, S. L., Terhorst, C., & Sharpe, A. H. (2016). Roles of CD48 in regulating immunity and tolerance. *Clinical Immunology*, 164(1), 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.01.008>
- Mihara, K., Bhattacharyya, J., Kitanaka, A., Yanagihara, K., Kubo, T., Takei, Y., Asaoku, H., Takihara, Y., & Kimura, A. (2012). T-cell immunotherapy with a chimeric receptor against CD38 is effective in eliminating myeloma cells. *Leukemia*, 26(2), 365–367. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.205>
- Mikkilineni, L., & Kochenderfer, J. N. (2021). CAR T cell therapies for patients with multiple myeloma. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(2), 71–84. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0427-6>
- Minute, L., Teijeira, A., Sánchez-Paulete, A. R., Ochoa, M. C., Álvarez, M., Otano, I., Etxeberría, I., Bolaños, E., Azpilikueta, A., Garasa, S., Casares, N., Luis Pérez Gracia, J., Rodríguez-Ruiz, M. E., Berraondo, P., & Melero, I. (2020). Cellular cytotoxicity is a form of immunogenic cell death. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8(1), e000325. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000325>
- Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>
- Mitwasi, N., Feldmann, A., Arndt, C., Koristka, S., Berndt, N., Jureczek, J., Loureiro, L. R., Bergmann, R., Máthé, D., Hegedüs, N., Kovács, T., Zhang, C., Oberoi, P., Jäger, E., Seliger, B., Rössig, C., Temme, A., Eitler, J., Tonn, T., ... Bachmann, M. (2020). “UniCAR”-modified off-the-shelf NK-92 cells for targeting of GD2-expressing tumour cells. *Scientific Reports*, 10(1), 2141. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59082-4>
- Monleón, I., Martínez-Lorenzo, M. J., Monteagudo, L., Lasierra, P., Taulés, M., Iturralde, M., Piñeiro, A., Larrad, L., Alava, M. A., Naval, J., & Anel, A. (2001). Differential Secretion of Fas Ligand- or APO2 Ligand/TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Carrying Microvesicles During Activation-Induced Death of Human T Cells. *The Journal of Immunology*, 167(12), 6736–6744. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.12.6736>
- Moreau, P., Masszi, T., Grzasko, N., Bahlis, N. J., Hansson, M., Pour, L., Sandhu, I., Ganly, P., Baker, B. W., Jackson, S. R., Stoppa, A.-M., Simpson, D. R., Gimsing, P., Palumbo, A., Garderet, L., Cavo, M., Kumar, S., Touzeau, C., Buadi, F. K., ... Richardson, P. G. (2016). Oral ixazomib, lenalidomide, and dexamethasone for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 374(17), 1621–1634. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516282>
- Morgan, G. J., Walker, B. A., & Davies, F. E. (2012). The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*, 12(5), 335–348. <https://doi.org/10.1038/nrc3257>
- Morvan, M. G., & Lanier, L. L. (2016). NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nature Reviews Cancer*, 16(1), 7–19. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.5>

- Murphy, K., & Weaver, C. (2017). Janeway 's Immunobiology 9th Edition. In *Garland Science*.
- Nagai, H., & Kim, Y. H. (2017). Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns. *Journal of Thoracic Disease*, 9(3), 448–451. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.02.75>
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by Death Factor. *Cell*, 88(3), 355–365. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81874-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81874-7)
- Nanbakhsh, A., Best, B., Riese, M., Rao, S., Wang, L., Medin, J., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2018). Dextran Enhances the Lentiviral Transduction Efficiency of Murine and Human Primary NK Cells. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(131), 1–7. <https://doi.org/10.3791/55063>
- Nevens, A. M., Subramanian, A., Tapia, J. L., Delgado, D. P., Tyler, R. C., Jensen, D. R., Ouellette, A. J., & Volkman, B. F. (2016). A Requirement for Metamorphic Interconversion in the Antimicrobial Activity of Chemokine XCL1. *Biochemistry*, 55(27), 3784–3793. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00353>
- Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 275–301. <https://doi.org/10.1042/EBC20160017>
- Nijhof, I. S., Groen, R. W. J., Lokhorst, H. M., Van Kessel, B., Bloem, A. C., Van Velzen, J., De Jong-Korlaar, R., Yuan, H., Noort, W. A., Klein, S. K., Martens, A. C. M., Doshi, P., Sasser, K., Mutis, T., & Van De Donk, N. W. C. J. (2015). Upregulation of CD38 expression on multiple myeloma cells by all-trans retinoic acid improves the efficacy of daratumumab. *Leukemia*, 29(10), 2039–2049. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.123>
- Nijhof, I. S., Casneuf, T., van Velzen, J., van Kessel, B., Axel, A. E., Syed, K., Groen, R. W. J., van Duin, M., Sonneveld, P., Minnema, M. C., Zweegman, S., Chiu, C., Bloem, A. C., Mutis, T., Lokhorst, H. M., Sasser, A. K., & van de Donk, N. W. C. J. (2016). CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma. *Blood*, 128(7), 959–970. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-703439>
- Nooka, A. K., Kaufman, J. L., Hofmeister, C. C., Joseph, N. S., Heffner, T. L., Gupta, V. A., Sullivan, H. C., Neish, A. S., Dhodapkar, M. V., & Lonial, S. (2019). Daratumumab in multiple myeloma. *Cancer*, 125(14), 2364–2382. <https://doi.org/10.1002/cncr.32065>
- Novo, N., Romero-Tamayo, S., Marcuello, C., Boneta, S., Blasco-Machin, I., Velázquez-Campoy, A., Villanueva, R., Moreno-Loshuertos, R., Lostao, A., Medina, M., & Ferreira, P. (2022). Beyond a platform protein for the degradosome assembly: The Apoptosis-Inducing Factor as an efficient nuclease involved in chromatinolysis. *PNAS Nexus*, 2(2), 1–11. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgac312>
- Nowell, P. C. (1976). The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations. *Science*, 194(4260), 23–28. <https://doi.org/10.1126/science.959840>

- Ntanasis-Stathopoulos, I., Gavriatopoulou, M., Kastritis, E., Terpos, E., & Dimopoulos, M. A. (2020). Multiple myeloma: Role of autologous transplantation. *Cancer Treatment Reviews*, 82(November 2019), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101929>
- O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(3), 151–167. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>
- O'Kennedy, R., Murphy, C., & Devine, T. (2016). Technology advancements in antibody purification. *Antibody Technology Journal*, Volume 6(August), 17–32. <https://doi.org/10.2147/ANTI.S64762>
- Ochoa, M. C., Minute, L., Rodriguez, I., Garasa, S., Perez-Ruiz, E., Inogés, S., Melero, I., & Berraondo, P. (2017). Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunology & Cell Biology*, 95(4), 347–355. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.6>
- Ollier, J., Vivien, R., Vié, H., & Clémenceau, B. (2017). Transfection of FcγRIIIa (CD16) Alone Can Be Sufficient To Enable Human αβTCR T Lymphocytes To Mediate Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *ImmunoHorizons*, 1(5), 63–70. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1700022>
- Orange, J. S. (2013). Natural killer cell deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol*, 132(3), 515–525. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405546-9.00039-X>
- Ormhøj, M., Bedoya, F., Frigault, M. J., & Maus, M. V. (2017). CARs in the lead against Multiple Myeloma. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 12(2), 119–125. <https://doi.org/10.1007/s11899-017-0373-2>
- Orr, M. T., & Lanier, L. L. (2010). Natural Killer Cell Education and Tolerance. *Cell*, 142(6), 847–856. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.031>
- Overdijk, M. B., Jansen, J. H. M., Nederend, M., Lammerts van Bueren, J. J., Groen, R. W. J., Parren, P. W. H. I., Leusen, J. H. W., & Boross, P. (2016). The Therapeutic CD38 Monoclonal Antibody daratumumab Induces Programmed Cell Death via Fcγ Receptor–Mediated Cross-Linking. *The Journal of Immunology*, 197(3), 807–813. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501351>
- Overdijk, M. B., Verploegen, S., Bögels, M., Van Egmond, M., Lammerts Van Bueren, J. J., Mutis, T., Groen, R. W. J., Breij, E., Martens, A. C. M., Bleeker, W. K., & Parren, P. W. (2015). Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma. *MAbs*, 7(2), 311–320. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1007813>
- Paíno, T., Sarasquete, M. E., Paiva, B., Krzeminski, P., San-Segundo, L., Corchete, L. A., Redondo, A., Garayoa, M., García-Sanz, R., Gutiérrez, N. C., Ocio, E. M., & San-Miguel, J.

- F. (2014). Phenotypic, Genomic and Functional Characterization Reveals No Differences between CD138++ and CD138low Subpopulations in Multiple Myeloma Cell Lines. *PLoS ONE*, 9(3), e92378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092378>
- Palumbo, A., Cavallo, F., Gay, F., Di Raimondo, F., Ben Yehuda, D., Petrucci, M. T., Pezzatti, S., Caravita, T., Cerrato, C., Ribakovsky, E., Genuardi, M., Cafo, A., Marcatti, M., Catalano, L., Offidani, M., Carella, A. M., Zamagni, E., Patriarca, F., Musto, P., ... Cavo, M. (2014). Autologous Transplantation and Maintenance Therapy in Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 371(10), 895–905. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1402888>
- Palumbo, A., Chanan-Khan, A., Weisel, K., Nooka, A. K., Masszi, T., Beksac, M., Spicka, I., Hungria, V., Munder, M., Mateos, M. V., Mark, T. M., Qi, M., Schecter, J., Amin, H., Qin, X., Deraedt, W., Ahmadi, T., Spencer, A., & Sonneveld, P. (2016). Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 375(8), 754–766. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1606038>
- Paradis, E., Douillard, H., Koutroumanis, M., Goodyer, C., & LeBlanc, A. (1996). Amyloid β Peptide of Alzheimer's Disease Downregulates Bcl-2 and Upregulates Bax Expression in Human Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 16(23), 7533–7539. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-23-07533.1996>
- Pardo, J., Aguiló, J. I., Anel, A., Martin, P., Joeckel, L., Borner, C., Wallich, R., Müllbacher, A., Froelich, C. J., & Simon, M. M. (2009). The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes and Infection*, 11(4), 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.02.004>
- Pardo, J., Balkow, S., Anel, A., & Simon, M. M. (2002). Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perfacilitated tumor control. *European Journal of Immunology*, 32(10), 2881–2886. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200210\)32:10<2881::AID-IMMU2881>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200210)32:10<2881::AID-IMMU2881>3.0.CO;2-K)
- Pardo, J., Bosque, A., Brehm, R., Wallich, R., Naval, J., Müllbacher, A., Anel, A., & Simon, M. M. (2004). Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *The Journal of Cell Biology*, 167(3), 457–468. <https://doi.org/10.1083/jcb.200406115>
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Paul, S., & Lal, G. (2017). The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 8(SEP). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01124>
- Pazina, T., MacFarlane, A. W., Bernabei, L., Dulaimi, E., Kotcher, R., Yam, C., Bezman, N. A., Robbins, M. D., Ross, E. A., Campbell, K. S., & Cohen, A. D. (2021). Alterations of NK Cell

- Phenotype in the Disease Course of Multiple Myeloma. *Cancers*, 13(2), 226. <https://doi.org/10.3390/cancers13020226>
- Pende, D., Falco, M., Vitale, M., Cantoni, C., Vitale, C., Munari, E., Bertaina, A., Moretta, F., Del Zotto, G., Pietra, G., Mingari, M. C., Locatelli, F., & Moretta, L. (2019). Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Frontiers in Immunology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01179>
- Pende, D., Spaggiari, G. M., Marcenaro, S., Martini, S., Rivera, P., Capobianco, A., Falco, M., Lanino, E., Pierri, I., Zambello, R., Bacigalupo, A., Mingari, M. C., Moretta, A., & Moretta, L. (2005). Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood*, 105(5), 2066–2073. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3548>
- Pérez-Persona, E., Vidriales, M. B., Mateo, G., García-Sanz, R., Mateos, M. V., De Coca, A. G., Galende, J., Martín-Núñez, G., Alonso, J. M., De Heras, N. Las, Hernández, J. M., Martín, A., López-Berges, C., Orfao, A., & San Miguel, J. F. (2007). New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*, 110(7), 2586–2592. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-088443>
- Pittari, G., Vago, L., Festuccia, M., Bonini, C., Mudawi, D., Giaccone, L., & Bruno, B. (2017). Restoring Natural Killer Cell Immunity against Multiple Myeloma in the Era of New Drugs. *Frontiers in Immunology*, 8(NOV), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01444>
- Plesner, T., & Krejcik, J. (2018). Daratumumab for the Treatment of Multiple Myeloma. *Frontiers in Immunology*, 9(JUN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01228>
- Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A., & June, C. H. (2011). Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 365(8), 725–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103849>
- Pule, M., Finney, H., & Lawson, A. (2003). Artificial T-cell receptors. *Cytotherapy*, 5(3), 211–226. <https://doi.org/10.1080/14653240310001488>
- Qu, P., Wang, L., & Lin, P. C. (2016). Expansion and functions of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Cancer Letters*, 380(1), 253–256. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.022>
- Quarona, V., Ferri, V., Chillemi, A., Bolzoni, M., Mancini, C., Zaccarello, G., Roato, I., Morandi, F., Marimpietri, D., Faccani, G., Martella, E., Pistoia, V., Giuliani, N., Horenstein, A. L., & Malavasi, F. (2015). Unraveling the contribution of ectoenzymes to myeloma life and survival in the bone marrow niche. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1335(1), 10–22.

<https://doi.org/10.1111/nyas.12485>

Rajagopalan, S., & Long, E. O. (2012). KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. *Frontiers in Immunology*, 3(AUG), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00258>

Raje, N., Berdeja, J., Lin, Y., Siegel, D., Jagannath, S., Madduri, D., Liedtke, M., Rosenblatt, J., Maus, M. V., Turka, A., Lam, L.-P., Morgan, R. A., Friedman, K., Massaro, M., Wang, J., Russotti, G., Yang, Z., Campbell, T., Hege, K., ... Kochenderfer, J. N. (2019). Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 380(18), 1726–1737. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1817226>

Rajkumar, S. V., Mesa, R. A., Fonseca, R., Schroeder, G., Plevak, M. F., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Lust, J. A., Witzig, T. E., Gertz, M. A., Kyle, R. A., Russell, S. J., & Greipp, P. R. (2002). Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 8(7), 2210–2216. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12114422>

Rallis, K. S., Hillyar, C. R. T., Sideris, M., & Davies, J. K. (2021). T-cell-based immunotherapies for haematological cancers, Part B: A SWOT analysis of adoptive cell therapies. *Anticancer Research*, 41(3), 1143–1156. <https://doi.org/10.21873/anticanres.14871>

Ramírez-Labrada, A., Pesini, C., Santiago, L., Hidalgo, S., Calvo-Pérez, A., Oñate, C., Andrés-Tovar, A., Garzón-Tituaña, M., Uranga-Murillo, I., Arias, M. A., Galvez, E. M., & Pardo, J. (2022). All About (NK Cell-Mediated) Death in Two Acts and an Unexpected Encore: Initiation, Execution and Activation of Adaptive Immunity. *Frontiers in Immunology*, 13(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.896228>

Ray, A., Das, D. S., Song, Y., Richardson, P., Munshi, N. C., Chauhan, D., & Anderson, K. C. (2015). Targeting PD1–PDL1 immune checkpoint in plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells, natural killer cells and multiple myeloma cells. *Leukemia*, 29(6), 1441–1444. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.11>

Reina-Ortiz, C., Constantinides, M., Fayd-Herbe-de-Maudave, A., Présumey, J., Hernandez, J., Cartron, G., GiralDOS, D., Díez, R., Izquierdo, I., Azaceta, G., Palomera, L., Marzo, I., Naval, J., Anel, A., & Villalba, M. (2020). Expanded NK cells from umbilical cord blood and adult peripheral blood combined with daratumumab are effective against tumor cells from multiple myeloma patients. *Oncot Immunology*, 10(1), 1853314. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1853314>

Reina-Ortiz, C., GiralDOS, D., Azaceta, G., Palomera, L., Marzo, I., Naval, J., Villalba, M., & Anel, A. (2022). Harnessing the Potential of NK Cell-Based Immunotherapies against Multiple Myeloma. *Cells*, 11(3), 392. <https://doi.org/10.3390/cells11030392>

Rezvani, K., Rouce, R., Liu, E., & Shpall, E. (2017). Engineering Natural Killer Cells for Cancer

- Immunotherapy. *Molecular Therapy*, 25(8), 1769–1781. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.06.012>
- Richardson, P. G., Sonneveld, P., Schuster, M. W., Irwin, D., Stadtmauer, E. A., Facon, T., Harousseau, J.-L., Ben-Yehuda, D., Lonial, S., Goldschmidt, H., Reece, D., San-Miguel, J. F., Bladé, J., Boccadoro, M., Cavenagh, J., Dalton, W. S., Boral, A. L., Esseltine, D. L., Porter, J. B., ... Anderson, K. C. (2005). Bortezomib or High-Dose Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 352(24), 2487–2498. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043445>
- Roberts, A. W., Davids, M. S., Pagel, J. M., Kahl, B. S., Puvvada, S. D., Gerecitano, J. F., Kipps, T. J., Anderson, M. A., Brown, J. R., Gressick, L., Wong, S., Dunbar, M., Zhu, M., Desai, M. B., Cerri, E., Heitner Enschede, S., Humerickhouse, R. A., Wierda, W. G., & Seymour, J. F. (2016). Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 374(4), 311–322. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1513257>
- Rodríguez-Otero, P., Prósper, F., Alfonso, A., Paiva, B., & San Miguel, J. F. S. (2020). CAR T-Cells in Multiple Myeloma Are Ready for Prime Time. *Journal of Clinical Medicine*, 9(11), 3577. <https://doi.org/10.3390/jcm9113577>
- Roeven, M. W. H., Hobo, W., Schaap, N., & Dolstra, H. (2014). Immunotherapeutic approaches to treat multiple myeloma. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(4), 896–910. <https://doi.org/10.4161/hv.27380>
- Rohn, T. T. (2010). The role of caspases in Alzheimer's disease; potential novel therapeutic opportunities. *Apoptosis*, 15(11), 1403–1409. <https://doi.org/10.1007/s10495-010-0463-2>
- Roodman, G. D. (1997). Mechanisms of Bone Lesions in Multiple Myeloma and Lymphoma. *Cancer*, 80(8 Suppl), 1557–1563. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9362422>
- Rosenberg, S. A., Spiess, P., & Lafreniere, R. (1986). A New Approach to the Adoptive Immunotherapy of Cancer with Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Science*, 233(4770), 1318–1321. <https://doi.org/10.1126/science.3489291>
- Rosinol Dachs, L., Oriol, A., Teruel, A. I., López de la Guía, A., Blanchard, M. J., Jarque, I., Granell, M., Sampol, A., Palomera, L., Gonzalez-Montes, Y., Bengoechea, E., Martínez-Martínez, R., Hernández, M. T., De Arriba, F., Martin-Ramos, M. L., Gutierrez, N. C., Cibeira, M. T., Mateos, M.-V., Martinez-Lopez, J., ... Blade, J. (2018). VTD (Bortezomib/Thalidomide/Dexamethasone) As Pretransplant Induction Therapy for Multiple Myeloma: Definitive Results of a Randomized Phase 3 Pethema/GEM Study. *Blood*, 132(Supplement 1), 126–126. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-111924>
- Sadelain, M., Brentjens, R., & Rivière, I. (2013). The basic principles of chimeric antigen receptor (CAR) design. *Cancer Discovery*, 3(4), 388–398. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0548>

- Sáez-Borderías, A., Romo, N., Magri, G., Gumá, M., Angulo, A., & López-Botet, M. (2009). IL-12-Dependent Inducible Expression of the CD94/NKG2A Inhibitory Receptor Regulates CD94/NKG2C + NK Cell Function. *The Journal of Immunology*, 182(2), 829–836. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.2.829>
- Sánchez-Martínez, D., Allende-Vega, N., Orecchioni, S., Talarico, G., Cornillon, A., Vo, D.-N., Rene, C., Lu, Z.-Y., Krzywinska, E., Anel, A., Galvez, E. M., Pardo, J., Robert, B., Martineau, P., Hicheri, Y., Bertolini, F., Cartron, G., & Villalba, M. (2018). Expansion of allogeneic NK cells with efficient antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors. *Theranostics*, 8(14), 3856–3869. <https://doi.org/10.7150/thno.25149>
- Sánchez-Martínez, D., Lanuza, P. M., Gómez, N., Muntasell, A., Cisneros, E., Moraru, M., Azaceta, G., Anel, A., Martínez-Lostao, L., Villalba, M., Palomera, L., Vilches, C., García Marco, J. A., & Pardo, J. (2016). Activated Allogeneic NK Cells Preferentially Kill Poor Prognosis B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Frontiers in Immunology*, 7(OCT), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00454>
- Sancho, P., Barneda, D., & Heeschen, C. (2016). Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *British Journal of Cancer*, 114(12), 1305–1312. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.152>
- Schinke, C., Qu, P., Mehdi, S. J., Hoering, A., Epstein, J., Johnson, S. K., van Rhee, F., Zangari, M., Thanendrarajan, S., Barlogie, B., Davies, F. E., Yaccoby, S., & Morgan, G. J. (2018). The Pattern of Mesenchymal Stem Cell Expression Is an Independent Marker of Outcome in Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 24(12), 2913–2919. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2627>
- Schmiedel, D., & Mandelboim, O. (2018). NKG2D Ligands—Critical Targets for Cancer Immune Escape and Therapy. *Frontiers in Immunology*, 9(SEP), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02040>
- Scoville, S. D., Freud, A. G., & Caligiuri, M. A. (2019). Cellular pathways in the development of human and murine innate lymphoid cells. *Current Opinion in Immunology*, 56(1), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.11.003>
- Screpanti, V., Wallin, R. P. A., Ljunggren, H.-G., & Grandien, A. (2001). A Central Role for Death Receptor-Mediated Apoptosis in the Rejection of Tumors by NK Cells. *The Journal of Immunology*, 167(4), 2068–2073. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.2068>
- Serrano Del Valle, A., Beltrán-Visiedo, M., de Poo-Rodríguez, V., Jiménez-Alduán, N., Azaceta, G., Díez, R., Martínez-Lázaro, B., Izquierdo, I., Palomera, L., Naval, J., Anel, A., & Marzo, I. (2022). Ecto-calreticulin expression in multiple myeloma correlates with a failed anti-tumoral immune response and bad prognosis. *Oncolimmunology*, 11(1), 1-10. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2022.2141973>
- Shimasaki, N., Jain, A., & Campana, D. (2020). NK cells for cancer immunotherapy. *Nature*

- Reviews Drug Discovery*, 19(3), 200–218. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0052-1>
- Shultz, L. D., Schweitzer, P. A., Christianson, S. W., Gott, B., Schweitzer, I. B., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T. V., & Greiner, D. L. (1995). Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *Journal of Immunology*, 154(1), 180–191. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7995938>
- Shultz, L. D., Ishikawa, F., & Greiner, D. L. (2007). Humanized mice in translational biomedical research. *Nature Reviews Immunology*, 7(2), 118–130. <https://doi.org/10.1038/nri2017>
- Siegel, D. S., Dimopoulos, M. A., Ludwig, H., Facon, T., Goldschmidt, H., Jakubowiak, A., San-Miguel, J., Obreja, M., Blaedel, J., & Stewart, A. K. (2018). Improvement in Overall Survival With Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 36(8), 728–734. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.5032>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer Statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21332>
- Simon, S., & Riddell, S. R. (2020). Dual Targeting with CAR T Cells to Limit Antigen Escape in Multiple Myeloma. *Blood Cancer Discovery*, 1(2), 130–133. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-20-0122>
- Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 175–193. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
- Slaney, C. Y., Rautela, J., & Parker, B. S. (2013). The Emerging Role of Immunosurveillance in Dictating Metastatic Spread in Breast Cancer. *Cancer Research*, 73(19), 5852–5857. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1642>
- Smith, E. L., Staehr, M., Masakayan, R., Tatake, I. J., Purdon, T. J., Wang, X., Wang, P., Liu, H., Xu, Y., Garrett-Thomson, S. C., Almo, S. C., Riviere, I., Liu, C., & Brentjens, R. J. (2018). Development and Evaluation of an Optimal Human Single-Chain Variable Fragment-Derived BCMA-Targeted CAR T Cell Vector. *Molecular Therapy*, 26(6), 1447–1456. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.03.016>
- Smyth, M. J., Kelly, J. M., Baxter, A. G., Körner, H., & Sedgwick, J. D. (1998). An Essential Role for Tumor Necrosis Factor in Natural Killer Cell-mediated Tumor Rejection in the Peritoneum. *Journal of Experimental Medicine*, 188(9), 1611–1619. <https://doi.org/10.1084/jem.188.9.1611>
- Song, X., Hong, S.-H., Kwon, W. T., Bailey, L. M., Basse, P., Bartlett, D. L., Kwon, Y. T., & Lee, Y. J. (2016). Secretory TRAIL-Armed Natural Killer Cell-Based Therapy: In Vitro and In Vivo Colorectal Peritoneal Carcinomatosis Xenograft. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(7), 1591–1601. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0937>

- Sportoletti, P., De Falco, F., Del Papa, B., Baldoni, S., Guarente, V., Marra, A., Dorillo, E., Rompietti, C., Adamo, F. M., Ruggeri, L., Di Ianni, M., & Rosati, E. (2021). NK Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia and Their Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6665. <https://doi.org/10.3390/ijms22136665>
- Stabile, H., Fionda, C., Gismondi, A., & Santoni, A. (2017). Role of distinct natural killer cell subsets in anticancer response. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00293>
- Steeg, P. S. (2016). Targeting metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 16(4), 201–218. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.25>
- Stewart, C. A., Laugier-Anfossi, F., Vély, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., Gauthier, L., Romagné, F., Ferracci, G., Arosa, F. A., Moretta, A., Sun, P. D., Ugolini, S., & Vivier, E. (2005). Recognition of peptide–MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(37), 13224–13229. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503594102>
- Suck, G., Odendahl, M., Nowakowska, P., Seidl, C., Wels, W. S., Klingemann, H. G., & Tonn, T. (2016). NK-92: an ‘off-the-shelf therapeutic’ for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 65(4), 485–492. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1761-x>
- Swift, B. E., Williams, B. A., Kosaka, Y., Wang, X. H., Medin, J. A., Viswanathan, S., Martinez-Lopez, J., & Keating, A. (2012). Natural killer cell lines preferentially kill clonogenic multiple myeloma cells and decrease myeloma engraftment in a bioluminescent xenograft mouse model. *Haematologica*, 97(7), 1020–1028. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.054254>
- Tacchetti, P., Dozza, L., Di Raimondo, F., Crippa, C., Zamagni, E., Bringhen, S., Pantani, L., Offidani, M., Montefusco, V., Narni, F., Mancuso, K., Cellini, C., Spadano, A., Pescosta, N., Baldini, L., Terragna, C., Nozzoli, C., Zambello, R., Derudas, D., ... Cavo, M. (2018). Bortezomib-Thalidomide-Dexamethasone Versus Thalidomide-Dexamethasone before and after Double Autologous Stem Cell Transplantation for Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Final Analysis of Phase 3 Gimema-MMY-3006 Study and Prognostic Score for Survival Outc. *Blood*, 132(Supplement 1), 125–125. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-116716>
- Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 621–632. <https://doi.org/10.1038/nrm2952>
- Tam, Y. K., Miyagawa, B., Ho, V. C., & Klingemann, H.-G. (1999). Immunotherapy of Malignant Melanoma in a SCID Mouse Model Using the Highly Cytotoxic Natural Killer Cell Line NK-92. *Journal of Hematotherapy*, 8(3), 281–290. <https://doi.org/10.1089/106161299320316>
- Tanaka, M., Suda, T., Takahashi, T., & Nagata, S. (1995). Expression of the functional soluble

- form of human fas ligand in activated lymphocytes. *The EMBO Journal*, 14(6), 1129–1135. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07096.x>
- Tang, D., Kang, R., Berghe, T. Vanden, Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*, 29(5), 347–364. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>
- Tang, X., Yang, L., Li, Z., Nalin, A. P., Dai, H., Xu, T., Yin, J., You, F., Zhu, M., Shen, W., Chen, G., Zhu, X., Wu, D., & Yu, J. (2018). First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *American Journal of Cancer Research*, 8(6), 1083–1089. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30323981> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6176185>
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 231–241. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>
- Taylor, R. P., & Lindorfer, M. A. (2015). Fcγ-receptor-mediated trogocytosis impacts mAb-based therapies: Historical precedence and recent developments. *Blood*, 125(5), 762–766. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-569244>
- Terpos, E., Ntanasis-Stathopoulos, I., Gavriatopoulou, M., & Dimopoulos, M. A. (2018). Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer Journal*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41408-017-0037-4>
- Touzeau, C., Moreau, P., & Dumontet, C. (2017). Monoclonal antibody therapy in multiple myeloma. *Leukemia*, 31(5), 1039–1047. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.60>
- Trigos, A. S., Pearson, R. B., Papenfuss, A. T., & Goode, D. L. (2018). How the evolution of multicellularity set the stage for cancer. *British Journal of Cancer*, 118(2), 145–152. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.398>
- Turtle, C. J., Hanafi, L.-A., Berger, C., Gooley, T. A., Cherian, S., Hudecek, M., Sommermeyer, D., Melville, K., Pender, B., Budiarto, T. M., Robinson, E., Steevens, N. N., Chaney, C., Soma, L., Chen, X., Yeung, C., Wood, B., Li, D., Cao, J., ... Maloney, D. G. (2016). CD19 CAR–T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *Journal of Clinical Investigation*, 126(6), 2123–2138. <https://doi.org/10.1172/JCI85309>
- Usmani, S. Z., Weiss, B. M., Plesner, T., Bahlis, N. J., Belch, A., Lonial, S., Lokhorst, H. M., Voorhees, P. M., Richardson, P. G., Chari, A., Sasser, A. K., Axel, A., Feng, H., Uhlar, C. M., Wang, J., Khan, I., Ahmadi, T., & Nahi, H. (2016). Clinical efficacy of daratumumab monotherapy in patients with heavily pretreated relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*, 128(1), 34–44. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-705210>
- van de Donk, N. W. C. J., & Lokhorst, H. M. (2013). New developments in the management and

- treatment of newly diagnosed and relapsed/refractory multiple myeloma patients. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 14(12), 1569–1573. <https://doi.org/10.1517/14656566.2013.805746>
- van de Donk, N. W. C. J., Kamps, S., Mutis, T., & Lokhorst, H. M. (2012). Monoclonal antibody-based therapy as a new treatment strategy in multiple myeloma. *Leukemia*, 26(2), 199–213. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.214>
- van de Donk, N. W. C. J., Janmaat, M. L., Mutis, T., Lammerts van Bueren, J. J., Ahmadi, T., Sasser, A. K., Lokhorst, H. M., & Parren, P. W. H. I. (2016). Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunological Reviews*, 270(1), 95–112. <https://doi.org/10.1111/imr.12389>
- van de Donk, N. W. C. J., Moreau, P., Plesner, T., Palumbo, A., Gay, F., Laubach, J. P., Malavasi, F., Avet-Loiseau, H., Mateos, M. V., Sonneveld, P., Lokhorst, H. M., & Richardson, P. G. (2016). Clinical efficacy and management of monoclonal antibodies targeting CD38 and SLAMF7 in multiple myeloma. *Blood*, 127(6), 681–695. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-646810>
- van de Donk, N. W. C. J., Pawlyn, C., & Yong, K. L. (2021). Multiple myeloma. *The Lancet*, 397(10272), 410–427. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00135-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00135-5)
- van de Donk, N. W. C. J., & Usmani, S. Z. (2018). CD38 Antibodies in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Modes of Resistance. *Frontiers in Immunology*, 9(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02134>
- van den Broek, M. F., Kägi, D., Zinkernagel, R. M., & Hengartner, H. (1995). Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo. *European Journal of Immunology*, 25(12), 3514–3516. <https://doi.org/10.1002/eji.1830251246>
- Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annual Review of Immunology*, 29(1), 235–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>
- Viola, D., Dona, A., Caserta, E., Troadec, E., Besi, F., McDonald, T., Ghoda, L., Gunes, E. G., Sánchez, J. F., Khalife, J., Martella, M., Karanes, C., Htut, M., Wang, X., Rosenzweig, M., Chowdhury, A., Sborov, D., Miles, R. R., Yazaki, P. J., ... Pichiorri, F. (2021). Daratumumab induces mechanisms of immune activation through CD38+ NK cell targeting. *Leukemia*, 35(1), 189–200. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0810-4>
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9(5), 503–510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>
- Voskoboinik, I., Smyth, M. J., & Trapani, J. A. (2006). Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 6(12), 940–952. <https://doi.org/10.1038/nri1983>

- Waldmann, T. A. (2018). Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(12), a028472. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028472>
- Wang, W. (2015). NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 6(JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00368>
- Wang, Y., Zhang, Y., Hughes, T., Zhang, J., Caligiuri, M. A., Benson, D. M., & Yu, J. (2018). Fratricide of NK Cells in daratumumab Therapy for Multiple Myeloma Overcome by Ex Vivo –Expanded Autologous NK Cells. *Clinical Cancer Research*, 24(16), 4006–4017. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3117>
- Watson, N. F. S., Ramage, J. M., Madjd, Z., Spendlove, I., Ellis, I. O., Scholefield, J. H., & Durrant, L. G. (2006). Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *International Journal of Cancer*, 118(1), 6–10. <https://doi.org/10.1002/ijc.21303>
- Webb, E. S., Liu, P., Baleeiro, R., Lemoine, N. R., Yuan, M., & Wang, Y. (2019). Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer. *Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer*, 32(5), 317–326. <https://doi.org/10.1016/c2016-0-05251-8>
- Weber, D. M., Chen, C., Niesvizky, R., Wang, M., Belch, A., Stadtmauer, E. A., Siegel, D., Borrello, I., Rajkumar, S. V., Chanan-Khan, A. A., Lonial, S., Yu, Z., Patin, J., Olesnyckyj, M., Zeldis, J. B., & Knight, R. D. (2007). Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma in North America. *New England Journal of Medicine*, 357(21), 2133–2142. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa070596>
- Weber, J. S., & Rosenberg, S. A. (1988). Modulation of murine tumor major histocompatibility antigens by cytokines in vivo and in vitro. *Cancer Research*, 48(20), 5818–5824.
- Williams, B. A., Law, A. D., Routy, B., DenHollander, N., Gupta, V., Wang, X.-H., Chaboureaux, A., Viswanathan, S., & Keating, A. (2017). A phase I trial of NK-92 cells for refractory hematological malignancies relapsing after autologous hematopoietic cell transplantation shows safety and evidence of efficacy. *Oncotarget*, 8(51), 89256–89268. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19204>
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., & Currie, A. R. (1980). Cell Death: The Significance of Apoptosis. In *International Review of Cytology* (Vol. 68, Issue C, pp. 251–306). [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62312-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62312-8)
- Yan, B., Ai, Y., Sun, Q., Ma, Y., Cao, Y., Wang, J., Zhang, Z., & Wang, X. (2021). Membrane Damage during Ferroptosis Is Caused by Oxidation of Phospholipids Catalyzed by the Oxidoreductases POR and CYB5R1. *Molecular Cell*, 81(2), 355–369.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.11.024>
- Yan, Y., Steinherz, P., Klingemann, H. G., Dennig, D., Childs, B. H., McGuirk, J., & O'Reilly, R. J.

- (1998). Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 4(11), 2859–2868. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9829753>
- Yatim, K. M., & Lakkis, F. G. (2015). A Brief Journey through the Immune System. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(7), 1274–1281. <https://doi.org/10.2215/CJN.10031014>
- Yu, M., Shi, W., Zhang, J., Niu, L., Chen, Q., Yan, D., Liu, T., Jing, W., Jiang, X., Wei, F., Yin, B., Zhang, W., Li, Q., & Li, Z. (2009). Influence of reverse signaling via membrane TNF- α on cytotoxicity of NK92 cells. *European Journal of Cell Biology*, 88(3), 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2008.09.001>
- Zahavi, D., & Weiner, L. (2020). Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies*, 9(3), 34. <https://doi.org/10.3390/antib9030034>
- Zarek, P. E., Huang, C. T., Lutz, E. R., Kowalski, J., Horton, M. R., Linden, J., Drake, C. G., & Powell, J. D. (2008). A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*, 111(1), 251–259. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-081646>
- Zhang, C., Oberoi, P., Oelsner, S., Waldmann, A., Lindner, A., Tonn, T., & Wels, W. S. (2017). Chimeric Antigen Receptor-Engineered NK-92 Cells: An Off-the-Shelf Cellular Therapeutic for Targeted Elimination of Cancer Cells and Induction of Protective Antitumor Immunity. *Frontiers in Immunology*, 8(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00533>
- Zhang, G., Liu, R., Zhu, X., Wang, L., Ma, J., Han, H., Wang, X., Zhang, G., He, W., Wang, W., Liu, C., Li, S., Sun, M., & Gao, B. (2013). Retargeting NK-92 for anti-melanoma activity by a TCR-like single-domain antibody. *Immunology & Cell Biology*, 91(10), 615–624. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.45>
- Zhang, H., & Chen, J. (2018). Current status and future directions of cancer immunotherapy. *Journal of Cancer*, 9(10), 1773–1781. <https://doi.org/10.7150/jca.24577>
- Zhu, D., Wang, Z., Zhao, J., Calimeri, T., Meng, J., Hideshima, T., Fulciniti, M., Kang, Y., Ficarro, S. B., Tai, Y., Hunter, Z., McMilin, D., Tong, H., Mitsiades, C. S., Wu, C. J., Treon, S. P., Dorfman, D. M., Pinkus, G., Munshi, N. C., ... Carrasco, R. D. (2015). The Cyclophilin A–CD147 complex promotes the proliferation and homing of multiple myeloma cells: implications for therapy. *Nature Medicine*, 21(6), 572–580. <https://doi.org/10.1038/nm.3867>
- Zhu, Y., Huang, B., & Shi, J. (2016). Fas ligand and lytic granule differentially control cytotoxic dynamics of natural killer cell against cancer target. *Oncotarget*, 7(30), 47163–47172. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9980>
- Zilka, O., Shah, R., Li, B., Friedmann Angeli, J. P., Griesser, M., Conrad, M., & Pratt, D. A. (2017). On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin-1 and Lipoxstatin-1 and the Role of

Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death. *ACS Central Science*, 3(3), 232–243.
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00028>

