

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE ARAGON
(CIBA) & UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**



**Universidad
Zaragoza**

Trabajo Fin de Grado

**Sensibilidad de células de carcinoma de
colon al tratamiento con células NK
alogénicas activadas**

Realizado por:
Gustavo Lou Ramírez

Director:
Dr. Julián Parado Jimeno



D. JULIAN PARDO JIMENO, Doctor en Ciencias Químicas e Investigador Aragón I+D en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular y Profesor Asociado del Departamento de Microbiología, Salud Pública y Medicina Preventiva de la Universidad de Zaragoza.

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Fin de Grado “Sensibilidad de células de carcinoma de colon al tratamiento con células NK alogénicas activadas”, ha sido realizado por el Estudiante de Biotecnología GUSTAVO LOU RAMIREZ en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón y en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza bajo su dirección y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al Título de Grado en Biotecnología.

Zaragoza, junio 2014

Fdo.: D. Julián Pardo Jimeno

ÍNDICE

0.- Resumen/abstract.....	1
1.- Introducción.....	2
1.1.- Células citotóxicas del sistema inmune.....	2
1.1.1.- Células NK.....	2
1.1.2.- Linfocitos T.....	4
1.2.- Mecanismos citotóxicos del sistema inmune.....	4
1.2.1.- Vía de exocitosis granular.....	4
1.2.2.- Vía de los receptores mortales.....	5
1.3.- Apoptosis.....	5
1.4.- Inmunoterapia y cáncer de colon.....	6
2.- Antecedentes y objetivos.....	7
3.- Materiales y métodos.....	8
3.1.- Materiales.....	8
3.1.1.- Productos para cultivos celulares.....	8
3.1.2.- Reactivos empleados en ensayos de citotoxicidad.....	8
3.1.3.- Anticuerpos.....	8
3.2.- Métodos.....	9
3.2.1.- Líneas celulares de origen humano.....	9
3.2.2.- Mantenimiento de los cultivos celulares.....	9
3.2.3.- Generación de células NK activadas.....	10
3.2.4.- Experimentos de citotoxicidad.....	11
3.2.5.- Análisis de proteínas.....	13
4.- Resultados.....	14
4.1.- Expresión de proteínas citotóxicas en células NK activadas con R69 o IL-2.....	14
4.2.- Expresión de receptores en células NK activadas con R69 o IL-2.....	15
4.3.- Experimentos de citotoxicidad.....	19
4.3.1.- Optimización de las condiciones de los experimentos de citotoxicidad.....	19
4.3.2.- Comparación de la capacidad citotóxica de células NK activadas con R69 ó IL-2.....	20
4.3.3.- Comparación de la capacidad citotóxica de células NK activadas con R69, IL-2, 721.221, 721.221 + IL-2 ó K562 + IL-2.....	22
5.- Discusión y conclusiones/Discussion and conclusions.....	23
6.- Bibliografía.....	27

0.- RESUMEN

El carcinoma de colon es la segunda causa de muerte más común dentro de los diferentes tipos de cáncer. El diagnóstico precoz resulta clave para un tratamiento temprano y efectivo que, en muchos de los casos, requiere cirugía para eliminar las células tumorales. Si el cáncer progresa y se detecta en estadios más avanzados, el tratamiento se basa en quimioterapia combinada con anticuerpos monoclonales como trastuzumab, cetuximab y panitumumab. En ambos casos, en un alto porcentaje de ocasiones, la efectividad es baja y los efectos secundarios abundantes, por lo que el cáncer reaparece.

El descubrimiento de que las células NK se activan frente a las células cancerosas en pacientes con cánceres hematológicos trasplantados de médula ósea, ha supuesto una revolución en el tratamiento de leucemias de mal pronóstico. Se ha observado que las células NK alogénicas son capaces de eliminar células de diferentes tipos de leucemia y mielomas resistentes a tratamientos de quimioterapia. Sin embargo, estos resultados no están tan claros en cánceres sólidos.

Por este motivo, en este trabajo nos hemos planteado estudiar la sensibilidad de diferentes líneas celulares de cáncer de colon humanas como HT29 y HCT116 frente células NK activadas *in vitro* mediante diferentes estímulos. Para ello, hemos analizado la muerte celular inducida por células NK y estudiado la expresión de las proteínas citotóxicas y receptores involucrados en tal proceso.

0.-ABSTRACT

Colon cancer is the second most common cause of death from cancer. Early diagnosis is essential for an effective and early treatment which, in many cases, requires surgery to eliminate tumor cells. Chemotherapy together with monoclonal antibodies such as trastuzumab, cetuximab and panitumumab is used if cancer spreads and it is detected in advanced stages. In many cases, both treatments exhibit low effectiveness and many side effects, so cancer recurrence is possible.

The discovery that NK cells are activated against bone marrow transplanted tumor cells in patients suffering from hematologic cancer represents a revolution in bad prognosis leukemia. Allogeneic NK cells have been shown to be capable of killing cells from different types of chemotherapy-resistant leukemia and myeloma. However, these results aren't that clear in solid carcinomas.

For this reason, the goal of this study is to evaluate the sensitivity of some human colon cancer cell lines such as HT29 and HC116 to *in vitro*-activated NK cells using different stimulus. Thus, we have analyzed NK cell-induced cell death and also studied cytotoxic proteins and surface receptors involved in such process.

1.- INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es el encargado de defendernos frente a patógenos y células transformadas (tumores). Las principales células efectoras de estos procesos son los linfocitos T CD8⁺ y las células NK (“Natural Killer”) [1]. Para ello emplean tres mecanismos diferentes: la vía de exocitosis granular, la vía de los receptores mortales (FasL, TRAIL) y la secreción de factores solubles como interferón- γ [2, 3].

1.1.- CÉLULAS CITOTÓXICAS DEL SISTEMA INMUNE

1.1.1.- CÉLULAS NK

Las células NK humanas comprenden entre un 5% y un 20% de los linfocitos de sangre periférica y proceden de las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ [4]. Son linfocitos granulares ligeramente más grandes que las células B y T. Fenotípicamente están caracterizadas por la expresión de CD56 y la ausencia del complejo TCR/CD3. Se pueden diferenciar dos subpoblaciones de células NK en función del nivel de expresión de CD56: CD56^{dim} y CD56^{bright} [5]. Las CD56^{dim} son más abundantes (90%), más citotóxicas y expresan un nivel mayor de receptores CD16, mientras que la subpoblación CD56^{bright}, a pesar de tener menor capacidad citotóxica, es capaz de producir gran cantidad de citoquinas (IFN- γ , TNF- β , etc) [6].

A diferencia de los linfocitos T CD8⁺, las células NK “naive” ya expresan moléculas citotóxicas como granzima B (gzmB) y perforina (perf), lo cual facilita una activación de la respuesta inmune innata en cuestión de minutos sin requerir transcripción, traducción o proliferación celular [7, 8]. Tal activación se encuentra estrictamente regulada tanto por el balance de señales estimuladoras e inhibitoras en la célula diana, como por interferones o algunas citoquinas (IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18) [9]. En general, los receptores de estimulación reclutan quinasas a través de dominios ITAM (“immunoreceptor tyrosine-based activating motif”) de proteínas adaptadoras, mientras que los de inhibición activan fosfatasa mediante dominios ITIM (“immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif”) localizados en sus colas citoplasmáticas [10].

Los receptores de inhibición reconocen distintos haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I/HLA-I) de las células “propias” y mantienen a las células NK inactivas. Representan el principal mecanismo de defensa para evitar que ataquen incontroladamente a las células autólogas HLA⁺ normales. Así, células que evadan el reconocimiento de los linfocitos T CD8⁺, ya sea por ausencia de MHC-I, evento frecuente en procesos de transformación tumoral o infección por ciertos virus, o porque presenten un MHC-I allogénico, serán potencialmente susceptibles al ataque de las células NK [8-11].

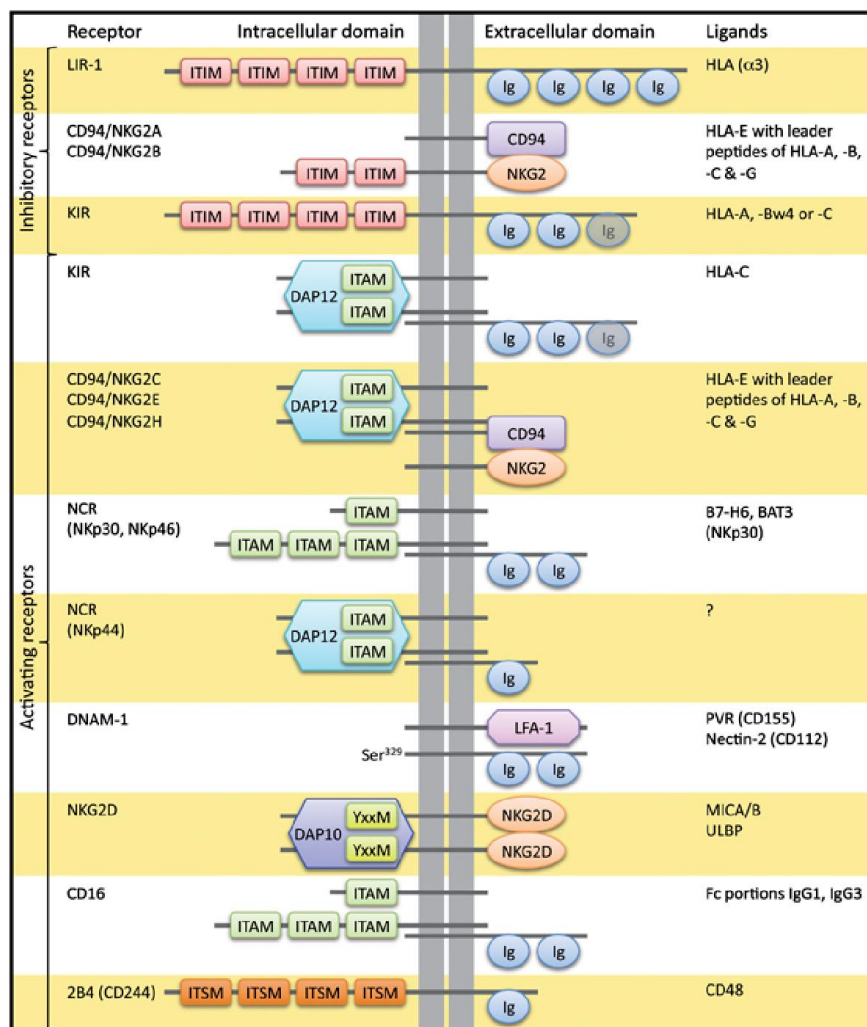


Tabla 1. Receptores de activación y de inhibición de las células NK y sus correspondientes ligandos [12].

Los receptores de inhibición más importantes son los KIR (“Killer Ig-like Receptor”), que reconocen los haplotipos HLA-A, HLA-B y HLA-C. Se designan en función del número de dominios inmunoglobulina que tengan (D0, D1, D2) y en función de la longitud del dominio citoplasmático, pudiendo ser L (“long”), si tienen dominios ITIM, o S (“short”), si carecen de ellos. NKG2A, perteneciente a la familia NKG2, reconoce el haplotipo HLA-E [11] y es presentado en la membrana plasmática en forma de heterodímero junto con CD94 [13]. A diferencia de los KIR, cuya expresión se mantiene constante, los receptores NKG2 son modulados por la acción de IL-2, IL-12 o IL-15 [14, 15]. También hay otros receptores de inhibición tipo LILR (“Leukocyte Ig-like Receptor”) como ILT-2 [16].

Los receptores de activación (“Killer Activation Receptor” o KAR), en cambio, reconocen ligandos que expresan las células diana cuando están dañadas o sometidas a estrés. Uno de los receptores de activación más importantes es NKG2D, que reconoce a los ligandos MICA, MICB y ULBPs. NKp46, NKp30 y NKp44 pertenecen al grupo de receptores NCR (“Natural Cytotoxicity Receptors”) y representan los receptores más importantes en la lisis de tumores mediada por células NK [17]. NKp46

casi solo se expresa en células NK y es utilizado como marcador. NKp44 únicamente se expresa en células NK activadas y en una minoría de células dendríticas. El nivel de expresión de estas tres proteínas se correlaciona con la capacidad de inducir muerte en células diana [18]. Por otro lado, DNAM-1 es una proteína que actúa como correceptor favoreciendo la adhesión a la célula diana [5, 9].

1.1.2.- LINFOCITOS T

Los linfocitos T tienen la capacidad de reconocer antígenos extraños de manera específica y reaccionar contra ellos. Su activación se lleva a cabo a través de su receptor, el TCR ("T Cell Receptor"), que reconoce el antígeno siempre y cuando éste se encuentre unido a MHC-I, presente en la mayoría de las células, o MHC-II, presente solo en las células presentadoras de antígeno (APC). Para la correcta activación del linfocito T, es necesario que el TCR se encuentre unido al complejo CD3, que es el que traduce las señales exteriores al interior celular [19, 20].

Existen dos tipos fundamentales de linfocitos que expresan TCR: $CD8^+$ y $CD4^+$. Los linfocitos T $CD8^+$, o linfocitos T citotóxicos (CTLs) una vez activados, son capaces de inducir muerte en células diana que reconozcan. Los linfocitos T $CD4^+$ o auxiliares, tienen como función regular la activación de otras células del sistema inmune como los linfocitos $CD8^+$ [21].

Los linfocitos T $CD8^+$ no se encuentran pre-activados como las células NK. Para transformarse en linfocitos T citotóxicos (activos), requieren un encuentro con las células presentadoras de antígeno (APC) y la formación del complejo trimolecular: MHC-I/antígeno/TCR/CD3. Además, necesitan señales de coestimulación que son aportadas por la unión de la molécula de superficie CD28 del linfocito con CD80 y CD86, expresados junto a MHC por las células presentadoras de antígeno [22, 23]. Por último, necesitan una tercera señal, proporcionada por IL-12 o interferón de tipo 1, crucial para que expresen granzima y perforina y puedan eliminar la célula diana [24].

1.2.- MECANISMOS CITOTÓXICOS DEL SISTEMA INMUNE

1.2.1.- VÍA DE EXOCITOSIS GRANULAR

Tanto en células NK como en linfocitos T citotóxicos, las proteínas citotóxicas se localizan en gránulos citoplasmáticos [25]. La perforina es la encargada de formar poros en la célula diana para que puedan penetrar otras proteínas de los gránulos como las granzimas [26]. La eliminación de la perforina en ratones (knock-out) no tiene consecuencias para el desarrollo de linfocitos T [27], pero afecta severamente a la función citolítica y a la respuesta inmune [28].

Las granzimas son serin-proteasas asociadas a los gránulos citotóxicos en una forma inactiva gracias a inhibidores como las serpinas o al pH ácido de los gránulos. Cuando

se produce el contacto entre la célula efectora y la célula diana, se produce una polarización de los gránulos, que migran hacia la zona de contacto (sinapsis inmunológica) a través de los microtúbulos y son exocitados. Al liberarse su contenido, las gzms se activan a pH neutro y penetran en la célula diana a través de la perf, que oligomeriza en la membrana de la célula diana en presencia de calcio extracelular [1].

Las gzms más importantes son la gzmA y la gzmB. La gzmB es principal inductora de apoptosis. Produce una activación directa de las caspasas, especialmente la caspasa ejecutora, la caspasa-3, aunque también es capaz de activar la muerte celular por procesamiento directo de Bid para activar la vía intrínseca de apoptosis (mitocondrial) [29]. Por otro lado, la gzmA no tiene un papel relevante en citotoxicidad, pero se ha visto que es capaz de estimular la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos [30-32].

1.2.2.- VÍA DE LOS RECEPTORES MORTALES

Los receptores mortales están localizados en la membrana celular. Pertenecen a la superfamilia del receptor de necrosis tumoral. Estos incluyen Fas (CD95/APO-1), receptor TNF tipo I y los receptores DR4 y DR5 cuyo ligando es TRAIL (“tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand”) [33]. Cada uno presenta un dominio citosólico mortal (DD), el cual interacciona con el dominio mortal complementario expresado por la proteína FADD, la cual activa la cascada intracelular de la vía extrínseca apoptótica [34].

1.3.- APOPTOSIS

El término apoptosis fue utilizado por primera vez en 1972 por Kerr, Wyllie y Currie para describir una nueva morfología cuando las células morían [35]. Se trata de un proceso ubicuo y estrictamente regulado en el que las células sufren una muerte celular programada [36]. La resistencia a la apoptosis, por ganancia de señales antiapoptóticas y pérdida de señales proapoptóticas, es la característica fundamental que define al cáncer [37].

Las dos vías principales de apoptosis son la vía extrínseca y la vía intrínseca. La vía extrínseca comienza con la interacción entre ligandos y sus receptores específicos, como Fas, receptor TNF tipo I y los receptores mortales (DR4, DR5) y termina con el reclutamiento de las caspasas iniciadoras 8 y 10 y la activación de las caspasas 3 y 7 ejecutoras de la apoptosis.

La vía intrínseca (o mitocondrial) es activada por diversos estímulos intracelulares como el daño del DNA, hipoxia, separación celular, estrés celular, y moléculas citotóxicas que convergen en la mitocondrial, donde las señales proapoptóticas (Bid, Bad, Bim) dejan de ser inhibidas por miembros de la familia Bcl-2 (Bcl-2 y Bcl-xL). Este exceso de las señales proapoptóticas sobre las antiapoptóticas produce una

permeabilización de la membrana externa mitocondrial, que conduce a la liberación de proteínas como citocromo c y Smac/Diablo desde el espacio intermembrana al citosol a través de poros formados por las proteínas proapoptóticas Bak y Bax. Una vez liberado el citocromo c, se une a Apaf-1 y a la pro-caspasa-9 para formar el apoptosoma, el cual activará a la caspasa-3 ejecutora [38, 39].

1.4.- INMUNOTERAPIA Y CÁNCER COLORECTAL

El cáncer de colon es una causa mayor de mortalidad en todo el mundo y representa uno de los tipos de cáncer más común [40]. Cirugía, quimio y radioterapia han sido las principales estrategias para eliminar tumores en pacientes, pero el desarrollo de resistencias a fármacos o a la radiación conduce a una reaparición muy significativa del cáncer. Las células del sistema inmune innato y adaptativo evitan la formación de neoplasias. Sin embargo, las células malignas pueden desarrollar mecanismos para evitar la “inmunovigilancia”, por ejemplo, produciendo citoquinas inmunosupresoras, como IL-10 y TFG- β , y alterando la expresión de proteínas de superficie como MHC-I [41].

Durante los últimos años se han investigado nuevos tratamientos, como el uso de anticuerpos monoclonales (mAbs) que permiten atacar de modo más específico a las células tumorales. Tienen como función favorecer la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (“Antibody-dependent celular cytotoxicity” o ADCC) a través de CD16, activar el Complemento o inactivar las señales de proliferación. Algunos mAbs utilizados en cáncer colorrectal son cetuximab y panitumumab, usados en casos de metástasis y cuya diana es el receptor del factor de crecimiento epidérmico [42], trastuzumab, que reconoce y bloquea el receptor HER-2, o bevacizumab, que inactiva el VEGF [43].

Otra línea de estudio es la inmunoterapia centrada en la capacidad de las células NK para eliminar diferentes tipos de tumores, pues una baja capacidad citotóxica de éstas se ha asociado a un mayor riesgo de padecer cáncer [44]. Las células NK alogénicas activadas son capaces de eliminar células de cánceres hematológicos independientemente de su expresión de MHC-I [45, 46], así como células de glioblastoma con propiedades de células madre (“Cancer-Stem Cells” o CSC) [47, 48].

En lo que atañe a tumores sólidos, son capaces de eliminar CSC sin haber sido activadas previamente, pero son ineficaces contra células tumorales diferenciadas [49]. Sin embargo, datos muy recientes sugieren que diferentes líneas celulares de cáncer de colon son sensibles a las células NK activadas *in vitro* [50].

2.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El estudio de los mecanismos efectores y de activación de los linfocitos T citotóxicos y de las células NK ha sido uno de los principales temas de investigación en el grupo de investigación donde se ha llevado a cabo este trabajo.

Como hemos dicho anteriormente, el uso de células NK alogénicas para tratar diferentes tipos de cánceres hematológicos muestra resultados prometedores. Multitud de evidencias muestran que éstas son capaces de eliminar tumores hematológicos, aunque los resultados no son tan claros en tumores sólidos, como es el caso del cáncer de colon.

Asimismo, resultados previos de nuestro grupo indican que las células NK activadas frente a diferentes estímulos presentan diferente capacidad citotóxica frente a neoplasias hematológicas [51].

Con objeto de profundizar más en la efectividad de las células NK para eliminar células tumorales de cáncer de colon, se han planteado los siguientes objetivos:

- 1.- Comparar la expresión de proteínas citotóxicas y receptores de las células NK activadas con IL-2 o R69.
- 2.- Optimizar las condiciones para el estudio de la citotoxicidad mediada por células NK sobre dos líneas celulares de cáncer de colon humano (HT29 y HCT116).
- 3.- Comparar la sensibilidad de las células HT29 y HCT116 de cáncer de colon a células NK activadas *in vitro* con R69 o IL-2.
- 4.- Comparar la sensibilidad de las células HT29 a células NK activadas *in vitro* con R69, IL-2, 721.221, 721.221 + IL-2 o K562 + IL-2.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- MATERIALES

3.1.1.- PRODUCTOS PARA CULTIVOS CELULARES

Para la realización de este trabajo se han utilizado los medios de cultivo RPMI 1640 e Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suministrados por Gibco (España). Los frascos de cultivo utilizados para el mantenimiento de las líneas celulares se obtuvieron de TPP (Suiza), así como el resto de material de plástico estéril como placas Petri, tubos Falcon de 15 y 50 ml, placas de 96 pocillos de fondo plano y cónico, etc. Los filtros de 0,22 μm y 0,44 μm de tamaño de poro utilizados para la esterilización de soluciones fueron de Gelman Science. Los tubos criogénicos para la congelación de células fueron suministrados por Nunc (Dinamarca).

Los diferentes productos utilizados en el desarrollo de los cultivos celulares se obtuvieron de Sigma (España): L-glutamina, penicilina, estreptomicina, azul Tripán, mitomicina C y dimetilsulfóxido (DMSO). El ficoll 70 (Histopaque) fue de GE Healthcare (España). El suero fetal bovino (SFB) fue de Gibco (España). La interleucina 2 (IL-2) la proporcionó Peprotech.

La saponina empleada para permeabilizar las células fue de Merck. El paraformaldehído (PFA) fue suministrado por Scharlau.

3.1.2.- REACTIVOS EMPLEADOS EN ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Tanto la proteína Anexina V-Dy634 como el 7-AAD fueron de Immunostep. La sonda fluorescente Cell Tracker Green CMFDA (5-clorometilfluoresceína diacetato) fue de Invitrogen.

3.1.3.- ANTICUERPOS

Todos anticuerpos utilizados durante la realización de este trabajo fueron monoclonales y de origen humano. Son los siguientes:

Anticuerpo	Marcaje	Proveedor	Clon	Aplicación
Granzima B	PE	Invitrogen	GB11	Citometría de flujo
Perforina	PE	BD	δ G9	Citometría de flujo
NKp30	PE	Beckman Coulter	Z25	Citometría de flujo
NKp44	PE	Beckman Coulter	Z231	Citometría de flujo
NKp46	PE	Beckman Coulter	BAB281	Citometría de flujo
NKB1	PE	BD	DX9	Citometría de flujo
ILT-2	PE	Beckman Coulter	HP-F1	Citometría de flujo
DNAM-1 (CD226)	PE	BD	DX11	Citometría de flujo
CD158f (KIR2DL5)	PE	Biolegend	UP-R1	Citometría de flujo

CD158a/h (KIR2DL1/DS1)	PE	Miltenyi Biotec	11PB6	Citometría de flujo
CD158b (KIR2DL2/DL3)	PE	BD	CH-L	Citometría de flujo
NKG2A	PE	Beckman Coulter	Z199	Citometría de flujo
NKG2D	PE	BD	1D11	Citometría de flujo
NKG2C	PE	R&D Systems	#134591	Citometría de flujo
IgG1 (isotipo control)	PE	Invitrogen	-	Citometría de flujo
IgG2b (isotipo control)	PE	Invitrogen	-	Citometría de flujo
CD56	APC	Miltenyi Biotec	AF12-7H3	Citometría de flujo
CD30	FITC	Miltenyi Biotec	BW264/56	Citometría de flujo
CD56	Esferas magnéticas	Miltenyi Biotec	-	Separación magnética

3.2.- MÉTODOS

3.2.1.- LINEAS CELULARES DE ORIGEN HUMANO

Las células K562 son originarias de un paciente de leucemia crónica mieloide [52] y no expresan HLA-I. Las líneas celulares R69 y 721.221 son líneas celulares linfoblastoides transformadas con el virus de Epstein-Barr (LCL EBV⁺). Mientras que las células R69 expresan HLA-I y todos los epítomos de los KIR, las células 721.221 no expresan HLA-I en su superficie, pero sí HLA-E [45, 51, 53].

Las líneas celulares HT29 (ATCC HTB-38) y HCT116 (ATCC CCL 247) tienen su origen en un adenocarcinoma de colon humano.

3.2.2.- MANTENIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES

3.2.2.1.- Materiales para los cultivos

Las líneas celulares se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm² ó 75 cm² según su finalidad, realizándose sucesivos subcultivos cada 2 ó 3 días.

Los frascos de cultivo, en ausencia de manipulación, se mantuvieron en un incubador termostatzado con regulación electrónica de flujo de CO₂ (Panasonic) a 37 °C, en aire saturado de humedad y con un 5% de CO₂.

Las manipulaciones de los cultivos celulares se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar vertical (Telstar Bio All) y en condiciones de esterilidad. Los materiales de vidrio y plástico usados se esterilizaron previo uso en un autoclave, mientras que las

disoluciones y buffers utilizados se esterilizaron usando filtros de 0,22 µm de tamaño de poro.

3.2.2.2.- Medios de cultivo

Las líneas celulares K562 se cultivaron en medio RPMI 1640 al 5% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), Glutamax 2 mM y antibióticos (penicilina, 100 U/ml; esptreptomicina, 100 µg/ml). Por otro lado, las células R69 se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB de complementado (calentado en un baño de agua a 56 °C durante 30 minutos y centrifugado 10 minutos a 4.000 rpm), Glutamax y antibióticos. Por último, las líneas celulares HT29 y HCT116 se cultivaron en medio DMEM al 10% de SFB, Glutamax y antibióticos.

3.2.2.3.- Congelación y descongelación de células

Para la congelación se contaron las células, se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm y se resuspendieron en medio completo con 10% de DMSO, previamente eliminado el sobrenadante. Posteriormente se añadió 1 ml de la suspensión a cada uno de los viales estériles de congelación dispuestos en una caja con hielo. Finalmente, se introdujeron en un congelador a -80 °C.

En cuanto a la descongelación de células, cada vial se fue calentando poco a poco con el calor de la mano, a la vez que se añadía gota a gota la suspensión, conforme se iba descongelando, a un tubo Falcon que contenía 10 ml de medio completo, el cual se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos y cuyo sobrenadante fue eliminado. Por último, se resuspendieron las células en cierto volumen de medio completo y se estableció el cultivo de cada uno de ellos de la forma rutinaria.

3.2.2.4.- Contaje y viabilidad celular

Para realizar el contaje y calcular la viabilidad celular se hizo uso de un hemocitómetro de Neubauer y del colorante azoico azul Tripán, capaz de penetrar en las células que han perdido la integridad de membrana, es decir, las muertas, dotándolas de un característico color azul; mientras que las vivas no internalizan el colorante de forma que permanecen incoloras.

Para su realización, se dispuso una alícuota con la suspensión de células y la disolución de azul Tripán (50% v/v), se resuspendió y se procedió haciendo uso de un microscopio óptico (Nikon).

3.2.3.- GENERACIÓN DE CÉLULAS NK ACTIVADAS

Se vierte el contenido del buffy-coat en un tubo Falcon de 50 ml. Se trasvasan 10ml del volumen a otro Falcon de 50ml y se diluye con 40 ml de PBS estéril. Se pasan 15ml de esta nueva disolución a otro tubo y se diluye de nuevo con 35 ml de PBS estéril. De

éste último, disponemos unos 20-25 ml suavemente sobre un nuevo Falcon de 50 ml que contenga 15 ml de Ficoll-Paque y centrifugamos 35 minutos a 1500 rpm con el freno de la centrífuga en 4 de 10 de potencia. Entre el Ficoll y el medio acuoso aparecerá un anillo blanco, donde se encuentran los linfocitos, que debemos extraer y disponer en un nuevo tubo, el cual lavaremos con PBS para eliminar los restos de Ficoll. Tras esto, se realizan dos o tres lavados más con PBS + EDTA 2mM para eliminar las plaquetas hasta que el sobrenadante esté transparente. Posteriormente se resuspenden las células en medio RPMI 1640 completo con 10% de SFB decomplementado.

Por otro lado, las células estimuladoras (K562, 721.221 y R69) se tratan con mitomicina C 25 µg/ml en 1 ml de medio RPMI 1640 durante 100 minutos y se lavan dos veces para eliminar los restos de la misma.

Para terminar, se coincubaban los linfocitos necesarios a una densidad de 10^6 células/ml en frascos independientes durante 5 días a 37 °C con cada una de las activaciones diferentes: R69, IL-2, 721.221, 721.221 + IL-2 y K562 + IL-2. Siendo 10:1 la relación linfocitos:células activadoras y 100 UI/mL la concentración de IL-2.

3.2.4.- EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDAD

3.2.4.1.- Separación de poblaciones celulares mediante MACS (separación celular basada en campos magnéticos)

Dado que durante el periodo de activación se establecieron diferentes cultivos con toda la población linfocitaria y que nuestro objetivo fue estudiar la capacidad citotóxica de las células NK, hubimos de separar las células de interés. Para ello hicimos uso de un anticuerpo que reconoce una proteína de membrana específica de estos, como es CD56, unido a microesferas magnéticas y procedimos a la separación mediante columnas colocadas en el interior de un campo magnético (Miltenyi Biotec).

Para ello, se resuspendieron las células en 80 µl de tampón MACS (PBS suplementado al 0,5% de SFB y EDTA 2mM) con 20 µl de anticuerpo por cada 10^7 células y se incubaron 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se lavó con tampón MACS y se procedió a la separación, unas veces en columnas manuales de tipo LS y LD (Miltenyi Biotec) y otras mediante un separador auto-MACS (Miltenyi Biotec).

En nuestro caso, hicimos uso de una separación positiva, es decir, obtuvimos las células unidas al anticuerpo utilizado, a diferencia de lo que ocurre en la separación negativa.

3.2.4.2.- Marcaje de células NK activadas con Cell Tracker Green.

Dado que durante nuestros experimentos nos basamos en el análisis de marcadores de apoptosis en las células diana mediante citometría de flujo, se realizó un marcaje de

las células efectoras mediante la sonda CTG, que emite a una longitud de onda correspondiente al color verde, con objeto de poder diferenciar ambas poblaciones.

Para ello, se resuspendieron las células recién separadas en 1 ml de PBS con Cell Tracker Green 1 μ M y se incubaron a 37 °C durante 14 minutos. A continuación, se lavó la sonda con medio RPMI al 10% de SFB de complementado, se incubó durante 30 minutos a 37 °C y se procedió al conteo de las células para poner a punto el ensayo de citotoxicidad.

3.2.4.3.- Citotoxicidad inducida por células NK activadas

Dado que las células adherentes necesitan del orden de 8 a 12 horas para pegarse a la superficie sobre la que se cultivan, se dispusieron 15.000 células diana adherentes por pocillo en un volumen de 100 μ L por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano 24 horas antes de realizar el ensayo de citotoxicidad.

Por otro lado, las células control (K562), que crecen en suspensión, se añadieron a una placa de 96 pocillos de fondo cónico en un volumen de 100 μ L por pocillo el mismo día del experimento.

A continuación y en ambos casos, se dispusieron 100 μ L de células NK activadas al ratio efector:diana (E:T) deseado y se incubaron las placas durante un tiempo de 3 a 4 horas en el incubador a 37°C con 5% CO₂.

3.4.2.4.- Analisis de apoptosis por citometría de flujo

Existen multitud de marcadores apoptóticos. En nuestro caso, uno de los que hicimos uso fue la anexina V unida al fluorocromo Dy634. Esta proteína es capaz de unirse selectivamente al fosfolípido fosfatidilserina (PS), que en condiciones normales se encuentra en la semicapa lipídica interna. Sin embargo, es traslocada a la semicapa externa en situaciones de apoptosis. Por lo tanto, haciendo uso de la anexina V podemos analizar la apoptosis mediante citometría de flujo.

El otro marcador empleado fue el 7-AAD, molécula que se une al DNA cuando las células tienen permeabilizada la membrana debido a la necrosis.

Para realizar el marcaje, se dispuso el contenido de los pocillos de la placa de 96 en tubos de citómetro. En el caso de las dianas adherentes hubo que retirar el sobrenadante (con las células muertas) y posteriormente tratar con tripsina para despegar las células (vivas), que se añadieron al tubo que contenía las células muertas. Tras esto, se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm, se retiró el sobrenadante y se añadió a cada uno de ellos el tampón de marcaje: 100 μ L de "Anexin V Binding Buffer" (ABB) 1x, 1,5 μ L de 7-AAD y 1 μ L anexina para las células diana en suspensión (K562) y con 2 μ L para el caso de las líneas celulares diana adherentes (HT29 y HCT116). A continuación se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de

luz y se procedió al análisis de los marcadores apoptóticos de cada muestra mediante un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences). Además, se utilizaron pocillos de cada línea celular diana, sin células efectoras, como control.

3.2.5.- ANALISIS DE PROTEÍNAS

3.2.5.1.- Análisis de la expresión de proteínas de membrana mediante citometría de flujo

Se realizó el marcaje de KAR y KIR mediante anticuerpos para comparar la expresión de estos antes y después de la activación.

Para ello, se centrifugaron las células y se resuspendieron en el volumen necesario de FACS buffer (PBS al 5% de SFB y 0,1% de NaN_3). Se dispusieron 10^5 células en 100 μl por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo cónico. A continuación se centrifugó a 3500 rpm durante 2 minutos y se incubó con el anticuerpo durante 20 minutos a 4 °C. Tras esto, se realizaron dos lavados con FACS buffer y se fijaron las células con PFA 1% para analizar cada muestra mediante citometría de flujo.

Debemos puntualizar que, para poder separar nuestra población de interés con el citómetro (CD56^+ , CD3^-), a cada uno de los pocillos se le añadió, además del anticuerpo frente al receptor correspondiente, un anticuerpo CD3-FITC y otro CD56-APC. Además, se hizo uso de los isotipos IgG1 e IgG2b como control.

3.2.5.2.- Análisis de la expresión de proteínas intracelulares mediante citometría de flujo

En primer lugar se realizó el marcaje extracelular. Se centrifugó el número necesario de células y se resuspendió en FACS buffer (PBS al 5% de SFB y 0,1% NaN_3). Se dispusieron 2×10^5 células en 100 μl por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo cónico. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 2 minutos y se incubó con los anticuerpos CD3-FITC y CD56-APC durante 20 minutos a una temperatura de 4°C.

En segundo lugar, se procedió al marcaje con los anticuerpos frente a gzmB y perf. Para ello se hizo uso de una solución de permeabilización (PBS al 5% de SFB y 0,1% de saponina) durante 40 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. A continuación, se realizaron dos lavados y se fijaron las células con PFA 1%.

Al igual que en el marcaje de proteínas de membrana, se usaron los isotipos IgG1 e IgG2b como control.

4.- RESULTADOS

4.1.- EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS CITOTÓXICAS EN CÉLULAS NK ACTIVADAS CON R69 Ó IL-2

Las proteínas citotóxicas de los gránulos citoplasmáticos son una de las vías a través de las cuales las células NK y los linfocitos T CD8⁺ inducen muerte en las células diana.

Para conocer y cuantificar la expresión de estas proteínas en células NK en respuesta a diferentes estímulos, se realizó un marcaje intracelular, marcando previamente las subpoblaciones linfocitarias con CD3 y CD56, a los 5 días, para cada una de las dos activaciones (IL-2 y R69). Como control, se realizó un marcaje de las células NK naive sin activar a día 0. El nivel de expresión se observó mediante citometría de flujo de fluorescencia.

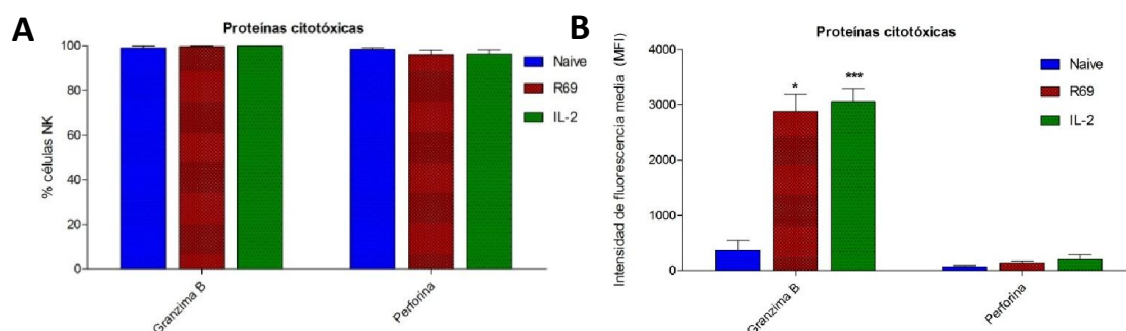


Figura 1. Porcentaje de células NK CD56⁺/CD3⁻ naive (azul) y activadas, con células R69 (rojo) o IL-2, (verde) que expresan gzmB y perf (A) y nivel de expresión de las mismas (B). Los resultados se representan como “media \pm sd” de 4 experimentos independientes analizados mediante el test de t-student comparando cada activación con el control: p<0,05 (*); p<0,01 (**); p<0,001 (***).

Prácticamente el 100% de las células NK sin activar (naive) expresan perf y gzmB, sin observarse cambios significativos con ningún tipo de activación (Fig. 1A).

Midiendo la intensidad de fluorescencia media (MFI) con el citómetro de flujo podemos saber cuánta perf y gzmB expresan las células (Fig. 1B). En este caso, los niveles de perf han aumentado ligeramente tras la activación, pero no significativamente. Sin embargo, la MFI de gzmB ha aumentado exponencialmente, pues de un valor de 370 pasamos a unos valores de 2.884 y de 3.055 para las activaciones con R69 e IL-2 respectivamente.

Teniendo en cuenta los resultados, podemos decir que ambos modelos son buenos a priori para llevar a cabo la activación *in vitro* de células NK. Además, es de suponer que las células que expresen un mayor nivel de perf y gzmB (IL-2) sean más citotóxicas que aquellos que expresen un menor nivel (R69), pese a que las diferencias no sean significativas.

4.2.- EXPRESIÓN DE RECEPTORES EN CÉLULAS NK ACTIVADAS CON R69 Ó CON IL-2

A diferencia de los linfocitos T CD8⁺, las células NK se activan gracias a un balance entre estímulos positivos y negativos, de tal forma que las que resultan más intensas son las que acaban imponiéndose.

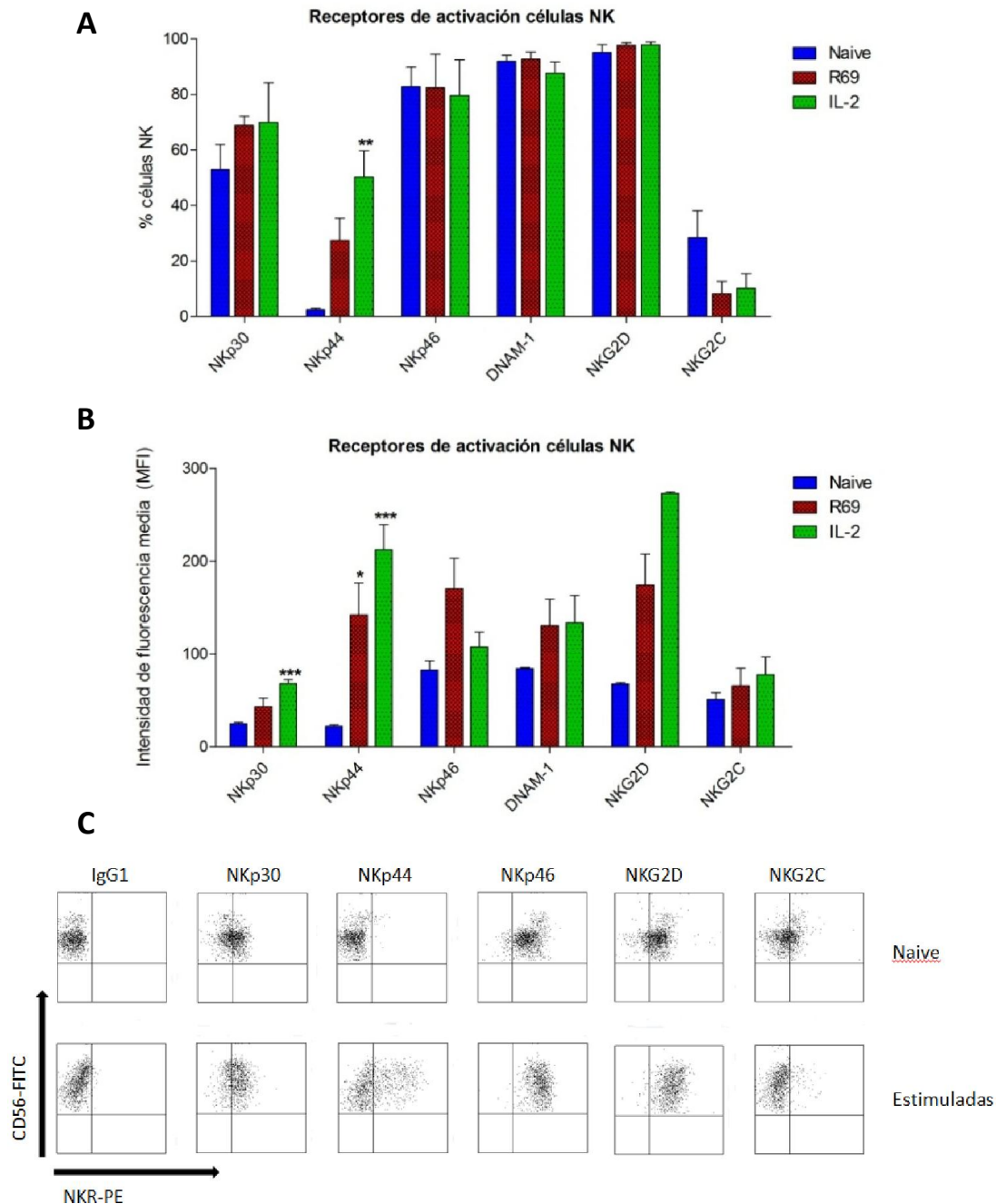


Figura 2. Porcentaje de células NK CD56⁺/CD3⁻ naive (azul) y activadas, con R69 (rojo) o IL-2 (verde), que expresan diferentes receptores de activación **(A)** y nivel de expresión de los mismos **(B)**. Los resultados se representan como “media ± sd” de 4 experimentos independientes analizados mediante el test de t-student comparando cada activación con el control (naive): p<0,05 (*); p<0,01 (**); p<0,001 (***). En **(C)** se muestran ejemplos representativos del análisis de la expresión de diferentes receptores de activación en células NK naive y estimuladas, usando el anticuerpo frente a IgG1 como control.

Para estudiar como varía la expresión de algunos de estos receptores de activación e inhibición, se realizó el marcaje de las subpoblaciones linfocitarias CD3 y CD56 y se procedió con el marcaje extracelular de los receptores tras 5 días de activación. Como control, se realizó el mismo estudio con linfocitos recién aislados de sangre de los mismos pacientes. El nivel de expresión se observó mediante citometría de flujo de fluorescencia.

Las células NK naive no expresan NKp44. Sin embargo, tras activarse, no solo aumenta el porcentaje de células que lo expresan, sino que además lo hacen fuertemente. Como podemos ver en la figura 2, NKp44 pasa de no ser expresado, a estar presente en un 27,5% de las células NK activadas con R69 con una MFI de 144. Del mismo modo, el 50% de las células NK activadas con IL-2 expresan NKp44 en su superficie con una MFI de 212.

A diferencia de NKp44, alrededor del 50% de las células NK sin activar expresan NKp46. Este valor se incrementa al 70% después de ambos tipos de estimulación. Aunque no es un cambio muy pronunciado, la MFI se duplica en los linfocitos activados con R69 y se triplica en los estimulados con IL-2.

El receptor NKp46 presenta una dinámica opuesta. Un 80% de las células NK naive expresan el receptor, y este valor se mantiene más o menos constante tras la activación con R69 e incluso desciende levemente tras la activación con IL-2. En cuanto a la MFI, no aumenta en las células tratados con IL-2, pero se duplica en las células estimuladas con la línea celular linfoblastoide.

DNAM-1 no es un receptor de activación como tal, sino que es una proteína que interviene en la adhesión celular de la célula efectora con la célula diana, pero dada su función se engloba en dicho grupo. Prácticamente el 100% de las células NK naive lo expresan. En la figura 2A se puede ver como el porcentaje de células NK activadas con IL-2 que expresan DNAM-1 desciende ligeramente aunque no significativamente, sin embargo esto puede deberse a que el marcaje con el anticuerpo frente a DNAM-1 se realizó dos veces, en lugar de cuatro como el resto. En cuanto al nivel de expresión, aumenta en el mismo grado en ambos tipos de activación.

Por último, los receptores NKG2D y NKG2C, pertenecientes a la familia de receptores NKG2, muestran un comportamiento diferente. Por un lado, casi todas las células NK expresan NKG2D, llegando a aumentar casi al 100% tras la estimulación con R69 o IL-2. A pesar de que en este aspecto no haya un cambio considerable, el nivel de expresión aumenta enormemente tras la estimulación, pasando de una MFI de 68 en células sin activar a 175 y 275 en las activadas con R69 e IL-2 respectivamente. Por otro lado, sólo el 30% de la población linfocitaria CD56⁺/CD3⁻ muestra NKG2C en su superficie. Aunque este valor disminuye al 10% tras la activación, el nivel de expresión aumenta.

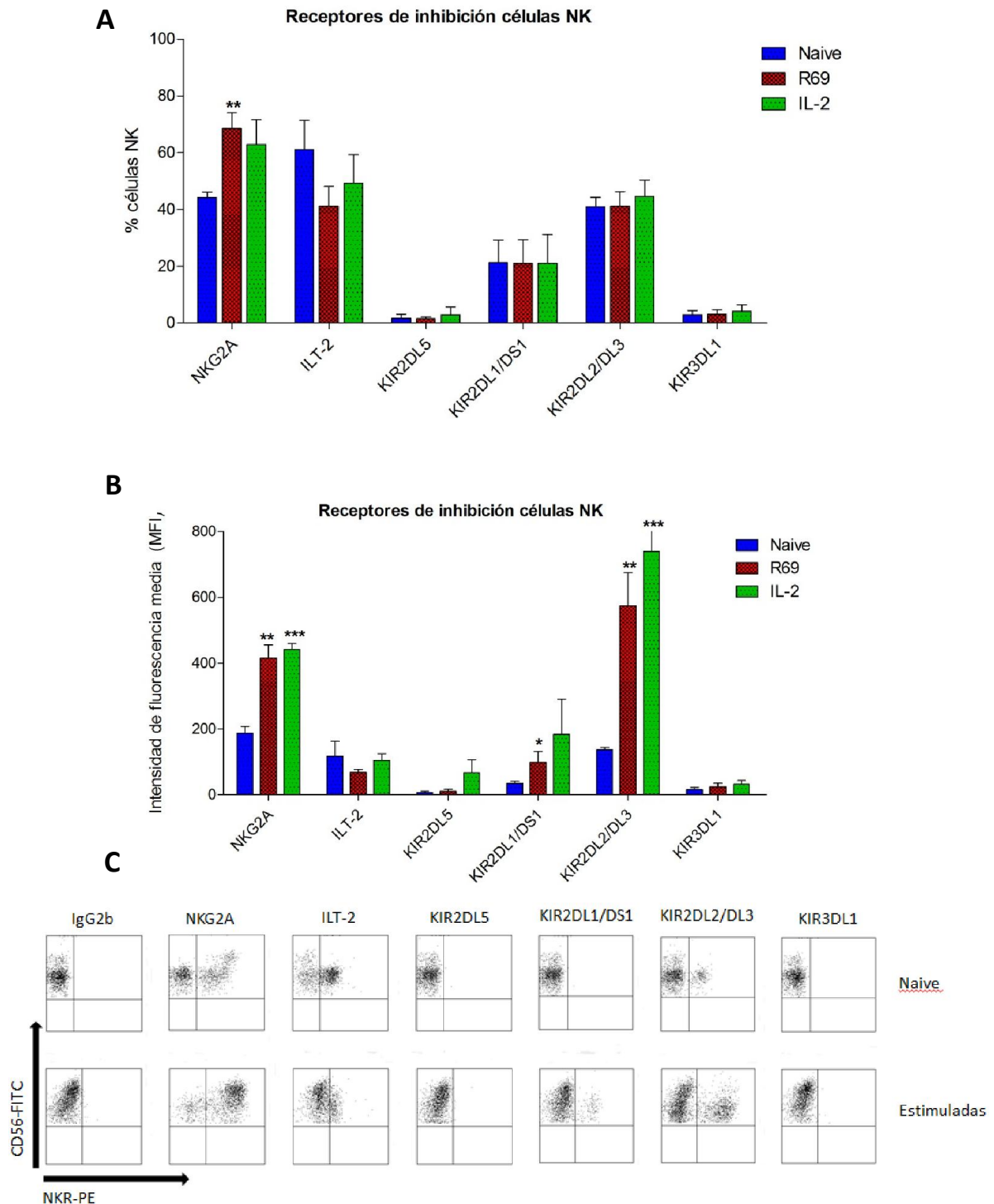


Figura 3. Porcentaje de células NK CD56⁺/CD3⁻ naive (azul) y activadas, con R69 (rojo) o IL-2, (verde) que expresan diferentes receptores de inhibición **(A)** y nivel de expresión de los mismos **(B)**. Los resultados se representan como “media \pm sd” de 4 experimentos independientes analizados mediante el test de t-student comparando cada activación con el control: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***). En **C** se muestran ejemplos representativos del análisis de la expresión de diferentes receptores de inhibición en células NK naive y estimuladas, utilizando el anticuerpo frente a IgG2b como control.

Como se observa en la figura 3, la expresión de los receptores de inhibición de las células NK es muy variable. Aproximadamente, un 40% de las células CD56⁺/CD3⁻ naive

expresa NKG2A, aumentando a un 70% tras la activación con R69 y a un 60% con IL-2. A pesar de que el número de células que presentan la proteína en su superficie es mayor tras activarse con R69 que con IL-2, la MFI es ligeramente superior en las células estimuladas con IL-2. En ambos casos, la MFI se duplica con respecto a las células sin activar.

El receptor de inhibición ILT-2 es expresado por más de la mitad las células NK sin activar. Al activarse con R69, muestran una disminución del porcentaje y del nivel de expresión de la proteína, con respecto al control, mayor que las células NK activadas con IL-2.

Las células NK sin activar no expresan KIR2DL5. Tras la estimulación con R69, no varió ni el porcentaje ni el nivel de expresión de la proteína en las células NK de ningún paciente. Sin embargo, en uno de los pacientes, tras la estimulación con IL-2, se observó una expresión del 11,3% y una MFI de 172.

En el caso de KIR2DL1/DS1, el porcentaje de expresión en las células NK es el mismo en las tres situaciones estudiadas: células NK naive, activadas con R69 o con IL-2. A pesar de esto, como se puede ver en la figura 3B, el nivel de expresión (MFI), se incrementa con respecto al control, siendo este incremento mayor en las células NK activadas con IL-2 que en las activadas con R69.

KIR2DL2/DL3 muestra un comportamiento similar. Alrededor del 25% de las células NK naive expresan la proteína y este porcentaje se mantiene constante tras ambos tipos de estimulación. Al igual que en el caso anterior, la MFI también aumenta exponencialmente, pasando de un valor de 136 en los cultivos sin activar, a 574 en los activados con R69, y a 740 en los activados con IL-2.

Por último, KIR3DL1 prácticamente no es expresado células NK sin activar. Tanto el porcentaje de células NK que lo expresan como su nivel de expresión aumentan muy ligeramente tras la estimulación, en mayor medida en los cultivos activados con IL-2 que en aquellos activados con R69.

En conjunto se observa que, tanto en los receptores de activación como en los de inhibición, la expresión es mayor en las células NK estimuladas con IL-2 que en las estimuladas con R69. De las doce proteínas estudiadas, solamente NKp46 y NKG2A muestran una dinámica diferente.

Teniendo en cuenta que la activación de las células NK está regulada por el balance de señales estimuladoras e inhibitoras, el método que las active más eficazmente será aquel que proporcione un mayor número de señales positivas en detrimento de las negativas.

4.3.- EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDAD

4.3.1.- OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LOS EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDAD

Los protocolos utilizados para realizar los experimentos de citotoxicidad se basaron en otros desarrollados por el personal del laboratorio [45]. Sin embargo, tales protocolos estaban descritos para estudiar la muerte en líneas celulares en suspensión (cánceres hematológicos) en lugar de células adherentes (tumores sólidos). Así, nos planteamos cambiar algunas de las condiciones en los ensayos.

En primer lugar y más importante, decidimos aumentar la cantidad de anexina V Dy634 usada como marcador apoptótico de las dianas HCT116 y HT29 ya que tienen un tamaño superior al de otras utilizadas anteriormente como K562, Jurkat o H929. Por ello, pasamos de utilizar 1 μ L por pocillo (punto de experimento) a 2 μ L.

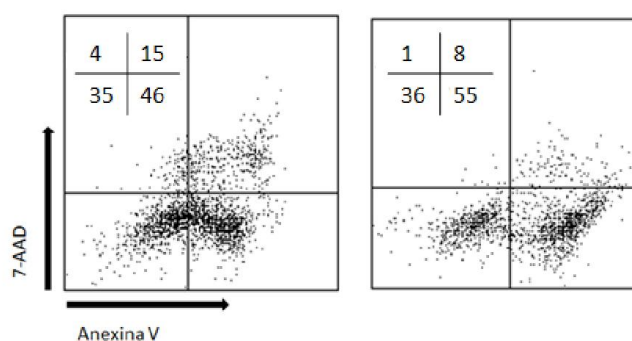


Figura 4. Comparativa de la expresión de marcadores apoptóticos con 7-AAD y con 1 μ L de anexina V (izquierda) o con 2 μ L de anexina V (derecha). Los números representan el porcentaje de células en cada cuadrante.

En este ejemplo se ilustran los marcadores apoptóticos de dos puntos de experimento idénticos, pertenecientes células NK activadas con IL-2 frente a células HCT116 con un ratio E:T de 9:1. A pesar de que la muerte de las células diana es prácticamente similar, el marcaje es mucho más limpio cuando se utilizan 2 μ L de anexina V en lugar de 1 μ L. Las poblaciones se separan mucho mejor, facilitando la selección de los “gates” a la hora de analizar los resultados.

Las células adherentes necesitan tiempo para pegarse a la placa donde se cultivan. Por ello, nos preguntamos cuánto tiempo sería necesario para que las células de adhirieran a la placa antes de añadir las células NK. Para ello, observamos en el microscopio invertido como evolucionaba el “pegado” de las líneas celulares HT29 y HCT116. Al cabo de 7 u 8 horas, todavía permanecían sin adherirse completamente. Por lo tanto, decidimos cultivar las células 24 horas antes de añadir las células NK.

Otro aspecto que se estudió fue el número de células diana que se disponían por pocillo: 10.000, 15.000 ó 20.000. Debido a que las 10.000 células apenas llenaban el

pocillo y que las 20.000 prácticamente alcanzaban la confluencia, acentuada todavía más por el crecimiento durante la incubación overnight, nos decantamos por disponer 15.000 células por pocillo.

Por último, comparamos la influencia de la adhesión celular sobre la capacidad citotóxica de las células NK activadas con R69 frente a las líneas celulares diana.

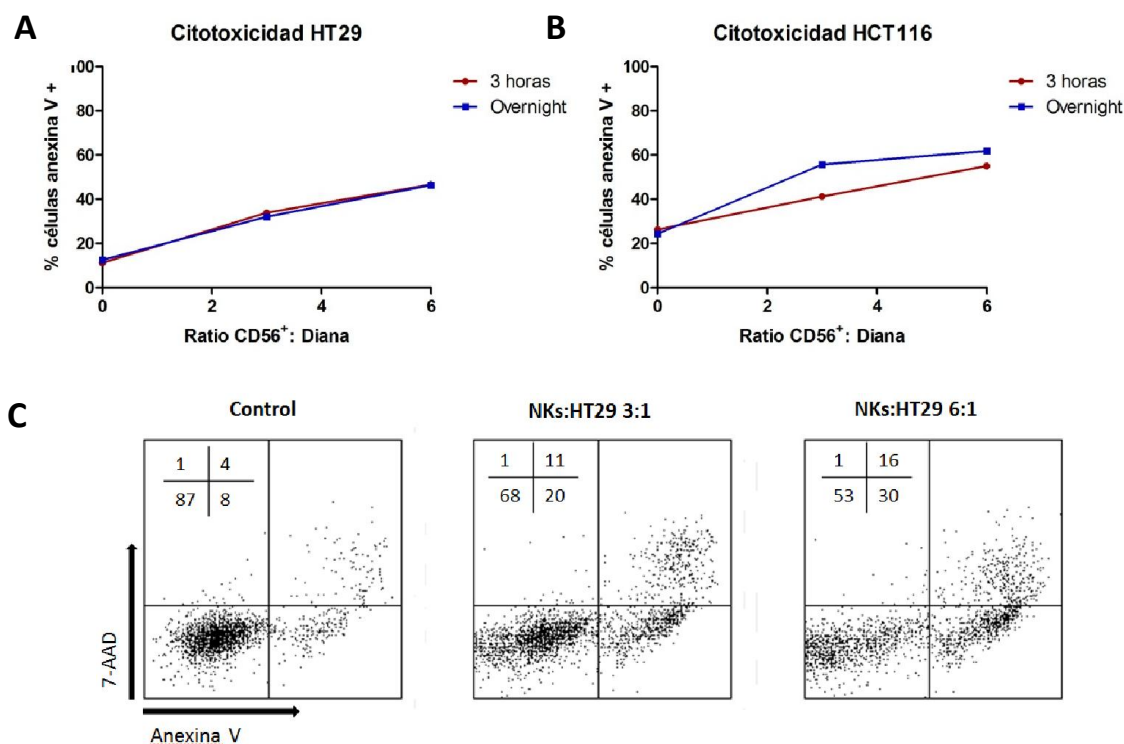


Figura 5. Comparativa de la sensibilidad de las líneas celulares HT29 **(A)** y HCT116 **(B)**, incubadas tres horas antes del ensayo (rojo) y overnight (azul), frente a células NK activadas con R69. En **C)** se muestran ejemplos representativos del análisis de la citotoxicidad de las células NK estimuladas con R69 sobre las células HT29 incubadas overnight. Los números representan el porcentaje de células en cada cuadrante.

Como se puede ver en la figura 5, la sensibilidad de las líneas celulares diana (HT29 y HCT116) frente células NK activadas con R69 fue la misma independientemente de si las células dianas se habían cultivado 3 horas antes o 24 horas antes de añadir las células NK.

Nos decantamos por la incubación overnight teniendo en cuenta que, no sólo es lógicamente más práctica sino que además es más fisiológica.

4.3.2.- COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA DE LAS CÉLULAS NK ACTIVADAS CON R69 Ó IL-2

Una vez optimizados los protocolos para los experimentos de citotoxicidad, se analizó la capacidad citotóxica de células NK activadas con R69 o IL-2 frente a diferentes líneas celulares de cáncer de colon (HT29 y HCT116). Para ello, se incubaron células NK purificadas con las células diana a diferentes ratios E:T como se describe en

la sección de metodología. Como control, se utilizó la línea celular K562, que no expresa HLA-I y es por tanto muy sensible a las células NK. Se analizó la citotoxicidad analizando la translocación de fosfatidilserina (anexina V) y la permeabilidad de la membrana plasmática (7-AAD).

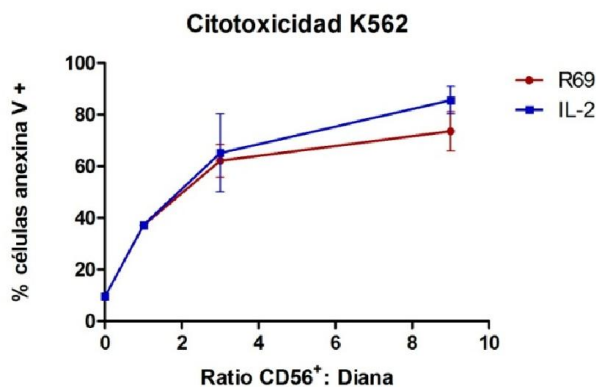


Figura 6. Comparativa del efecto citotóxico de las células CD56⁺ activadas con R69 (rojo) o IL-2 (azul) frente a las células diana K562.

Como ya sabíamos de antemano por resultados obtenidos por investigadores de nuestro laboratorio, las células NK activadas estimuladas con R69 son capaces de inducir muerte en las células K562. Sin embargo, en este experimento se muestra como las células NK son capaces de infligir más muerte en la línea celular K562 cuando son estimuladas con IL-2 durante el mismo periodo de tiempo, sin observarse cambios significativos.

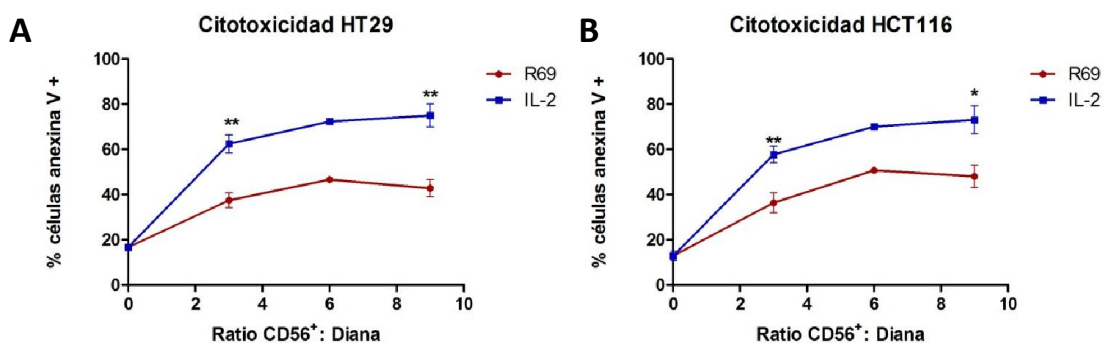


Figura 7. Comparativa del efecto citotóxico de las células NK CD56⁺ activadas con R69 (rojo) e IL-2 (azul) frente a las células diana HT29 (A) y HCT116 (B). Los resultados se representan como “media ± sd” de 4 experimentos independientes analizados mediante el test de t-student comparando ambos tipos de activación entre sí: p<0,05 (*); p<0, 01 (**).

En la figura 7 podemos ver a simple vista como las células NK activadas con IL-2 son más citotóxicas que las activadas con R69. Por ejemplo, las células activadas IL-2 inducen una muerte del 75% en las células HT29 al ratio E:T de 9:1, mientras que las activadas con R69 tan solo matan al 43%.

La sensibilidad de las células HT29 y HCT116 es prácticamente la misma frente a las células NK activadas con R69. Del mismo modo ocurre con las activadas con IL-2.

Cabe destacar que los puntos del experimento de las figuras 7A y 7B correspondientes al ratio 6:1 muestran un valor igual o superior a sus correspondientes ratios 9:1. Este hecho no lógico, se debe a que este ratio sólo se ensayó una vez debido a la falta de linfocitos obtenidos en la purificación con el MACS. Por lo tanto, los resultados seguramente sean superiores a la media, menos exactos y menos representativos.

4.3.3.- COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA DE LAS CÉLULAS NK ACTIVADAS CON R69, IL-2, 721.221, 721.221 + IL-2 Ó K562 + IL-2

Por último, decidimos añadir a nuestro estudio tres tipos de activación de células NK adicionales, dos de ellas haciendo uso de la línea celular linfoblastoide EBV⁺ 721.221, con y sin IL-2. El tercer tipo de activación incorporada fue la de las células K562, que no expresan HLA-I, con IL-2. En este caso, el protocolo fue el mismo que en ensayos previos [45]. La línea 721.221 tiene un origen similar a la R69 (células B transformadas con EBV), pero al contrario que R69, no expresa HLA-I.

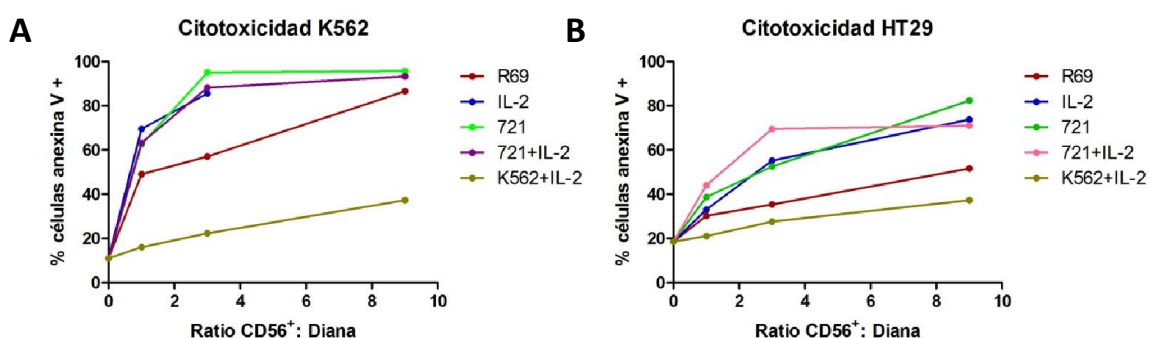


Figura 8. Comparativa del efecto citotóxico de las células CD56⁺ activadas con R69 (rojo), IL-2 (azul), 721.221 (verde), 721.221 + IL-2 (rosa) y K562 + IL-2 (caqui) frente a las células diana K562 (A) y HT29 (B).

Como se puede ver en la figura 8A, las células NK activadas con 721.221, 721.221 + IL-2, IL-2 y R69 son muy citotóxicas frente a la línea celular control K562, confirmándose que la activación ha sido satisfactoria.

Sin embargo, las células NK activadas con K562 + IL-2 prácticamente no han inducido muerte. Este hecho es extraño dado que la línea K562 no expresa MHC-I en su superficie, además de que son las células frente a las que se han activado las células NK.

En la figura 8B se observa una dinámica similar. Las células NK activadas con K562 + IL-2 inducen prácticamente el mismo nivel de muerte en las células control que en la línea HT29. Se puede ver a simple vista que las células NK estimuladas con R69 son

menos citotóxicas que aquellas estimuladas con IL-2, hecho que confirma los resultados anteriores.

Finalmente, se puede ver como las células activadas con la línea celular EBV⁺ 721.221 en presencia y ausencia de IL-2 son ligeramente más citotóxicas que las activadas únicamente con interleucina 2 frente a la línea celular HT29. No podemos afirmarlo con total certeza ya que este último experimento se realizó con un único donante, por lo que el resultado no es representativo, pero si se ve a simple vista que los tres métodos de estimulación proporcionan un mecanismo muy eficaz de activación de células NK *in vitro*.

5.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los mecanismos por los que los linfocitos T citotóxicos y las células NK son capaces de inducir muerte en células transformadas o infectadas por virus han sido ampliamente estudiados durante los últimos años. Dada su importancia para protegernos frente a patógenos y tumores, podrían usarse para tratar diferentes tipos enfermedades como el cáncer. Sin embargo, en primer lugar, es fundamental plantear modelos de experimentación *in vitro* e *in vivo*, como los cultivos celulares y los animales de experimentación como el ratón.

En este trabajo hemos visto como las células NK cambian la expresión de proteínas citotóxicas (gzmB) cuando las estimulamos con células R69 o con interleucina 2 y como dicho aumento se correlaciona con una mayor capacidad de inducir muerte en diferentes células diana [29, 54, 55].

Como se ha comentado en la introducción, las células NK expresan receptores que, cuando reconocen moléculas en la superficie de las células diana, proporcionan un balance de señales estimuladoras e inhibidoras que determinan su función citotóxica. En nuestro trabajo hemos analizado y comparado la expresión de dichos receptores en células estimuladas con R69 o IL-2.

Hemos visto que, en general, el nivel de expresión, tanto de los receptores de activación como de inhibición, aumenta cuando las células NK son estimuladas, observándose un incremento mayor en las células activadas con IL-2 que en las activadas con R69.

En cambio, el porcentaje de expresión de los receptores en las células NK es diferente. Por una parte, los resultados muestran que el porcentaje de células que expresa KIR es constante independientemente de la activación utilizada. Este dato

confirma resultados previos en los que se ha observado que la expresión de los KIR únicamente depende del donante ya que está restringido por el HLA expresado y no varía durante la activación [8].

Por otra parte, el resto de receptores de inhibición, así como los receptores de activación, excepto NKp46, son expresados por un porcentaje mayor de células NK cuando son estimuladas con IL-2 que cuando son estimuladas con R69. Cabe destacar que el receptor de activación NKp44, el cual se expresa sólo en células NK activadas [56], aumenta en la activación con R69 e IL-2, lo que confirma que ambos estímulos generan células NK activadas. Asimismo, también se ha descrito que el receptor de inhibición NKG2A aumenta durante la activación [57] tal y como muestran nuestros resultados.

La base de este trabajo ha sido comparar la sensibilidad de diferentes líneas celulares de cáncer de colon (HT29 y HCT116) frente a células NK activadas utilizando diferentes estímulos. Hemos llegado a la conclusión de que la estimulación con interleucina 2 proporciona una activación más potente que la estimulación con R69.

En este aspecto, se ve una clara correlación entre el nivel de expresión de proteínas citotóxicas tras la estimulación y el poder citotóxico de las células NK frente a las células diana. Sin embargo, esto no está tan claro con respecto a los receptores de activación e inhibición ya que, aunque, las células NK activadas con IL-2 expresan más receptores de activación, también expresan más receptores de inhibición. Sin embargo, dado que no se ha analizado la expresión de los receptores de modo simultáneo en las mismas células, no podemos concluir que las señales de activación predominen sobre las de inhibición en cada célula NK. Pese a ello, prácticamente la totalidad de las células NK activadas expresan receptores de activación como NKG2D, DNAM-1, NKp30 y NKp46, mientras que el porcentaje de células que expresan los receptores de inhibición es más bajo, especialmente en los KIR e ILT-2. Considerando que la activación de las células NK se basa en un equilibrio de señales positivas y negativas, estos datos sugieren que el conjunto de señales positivas predomina en las células activadas con R69 e IL-2 aunque de modo más acentuado en estas últimas.

Otros resultados muestran que las células NK activadas con K562 + IL-2 son menos citotóxicas que las activadas con R69, tal y como se había descrito previamente en nuestro grupo con tumores hematológicos [51], mientras que aquellas activadas con 721.221 o 721.221 + IL-2 son incluso más citotóxicas frente a la línea celular de cáncer de colon HT29. Este resultado también indica que la suplementación con IL-2 no aumenta el potencial estimulador de la línea LCL 721.221.

Para confirmar esto, habría realizar más experimentos de citotoxicidad utilizando células NK estimuladas con 721.221 con o sin IL-2, así como analizar la expresión de proteínas citotóxicas y de receptores de activación e inhibición.

Nuestros resultados indican que es posible activar células NK alogénicas para eliminar líneas de carcinoma colorrectal humano, si bien será muy importante utilizar un estímulo adecuado para poder utilizarlas en inmunoterapia. El siguiente paso será analizar si las células primarias de pacientes con cáncer de colon también responden a este tipo de terapia.

5.- DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The mechanism by which cytotoxic T lymphocytes and NK cells are able to induce cell death in transformed or virus-infected cells has been widely studied over the last years. Considering their importance to protect us against pathogens and tumors, they might be used to treat different type of diseases like cancer. However, before using them in the clinical practice, it is essential to analyze its performance in experimental *in vivo* and *in vitro* models such as cell cultures and animals such as mouse.

In this work, we have found out that NK cells increase cytotoxic protein expression (gzmB) when stimulated by R69 cells or interleukin 2 and how this increase correlates with a major ability to induce cell death in different target cells.

As indicated in introduction, NK cells express receptors that once they recognize surface molecules on target cells, provide a balance of positive and negative signals that shape their cytotoxic function. In our work, we have analyzed and compared receptor expression in cells activated by R69 or IL-2 [29, 54, 55].

We have seen that, in general, the level of expression of both activation and inhibitory receptors is enhanced after NK cell stimulation with either R69 cells or IL2, although at a greater extent when the last one is used.

Instead, the changes in the percentage of cells expressing the respective NK cell receptors are different. On the one hand our results show that the percentage of cells expressing KIR is constant independently of the activation used. This fact confirms previous results in which it has been observed KIR expression only depends on the donor since it is restricted for expressed HLA and it doesn't vary during activation [8].

On the other hand, the remaining inhibitory receptors, as well as the activation ones, except for NKp46, are expressed by a greater percentage of IL-2-stimulated NK cells than R69-stimulated ones. It is worth to point out that NKp44 activation receptor, which is only expressed by activated NK cells [56], increases after R69 and IL-2 activation, which confirms both stimuli generate activated NK cells. The same way, it has been described that NKG2A inhibitory receptor increases during activation [57] as shown in our results.

The main point of this work has been to compare the sensitivity of different colon cancer cell lines (HT29 and HCT116) to NK cells activated under different stimuli. We have concluded that IL-2-activation is more powerful than R69-activation.

In this regard, a clear correlation is seen between cytotoxic protein expression after stimulation and cytotoxic potential of NK cells against target cells. Nevertheless, this point is not that clear with respect to activation and inhibitory receptors since, although IL-2-activated NK cells express more activation receptors, they also express more inhibitory receptors. However, considering that receptor expression hasn't been analyzed simultaneously in single cells, we can't infer positive signals predominate over inhibitory ones in individual NK cells. However, most activated NK cells express activation receptors such as NKG2D, DNAM-1, NKp30 and NKp46, while percentage of NK cells expressing KIR is lower, specially KIR and ILT-2. Considering NK cell activation is based on a balance between positive and negative signals, this data suggest that the set of positive signals predominate over inhibitory ones in activated NK cells, being this difference bigger in IL2-stimulated cells than in R69 stimulated cells.

Other results show that K562 + IL-2-activated NK cells are less cytotoxic than those activated by R69, as previously described in our group in hematological cancers [51], while those activated by 721.221 or 721.221 + IL-2 are even more cytotoxic against HT29 colon cancer cell line. This result also indicates IL-2 supplementation doesn't enhance the stimulatory potential of 721.221 LCL cell line.

To confirm it, more experiments using NK cells stimulated by 721.221 with or without IL-2 will be required, as well as to analyze the expression of cytotoxic proteins and activation and inhibitory receptors.

Our results indicate it is possible to activate allogeneic NK cells to eliminate human colorectal carcinoma cell lines, although they suggest that selecting the proper stimulus will be very important in order to use them in immunotherapy. Next step will be to analyze if primary cells of patients suffering from colorectal carcinoma will respond to this therapy.

6.- BIBLIOGRAFÍA

1. Mouchacca, P., A.M. Schmitt-Verhulst, and C. Boyer, *Visualization of cytolytic T cell differentiation and granule exocytosis with T cells from mice expressing active fluorescent granzyme B*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67239.
2. Fan, Z. and Q. Zhang, *Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity*. Cell Mol Immunol, 2005. **2**(4): p. 259-64.
3. Reiter, Z., *Interferon--a major regulator of natural killer cell-mediated cytotoxicity*. J Interferon Res, 1993. **13**(4): p. 247-57.
4. Galy, A., et al., *Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset*. Immunity, 1995. **3**(4): p. 459-73.
5. C.A. Garcia¹, J. Robinson¹, J. Alejandro Madrigal^{1,2}, S.G.E. Marsh^{1,2} *Natural Killer Cell Receptors: Functional Roles*. Inmunología, 2003. **22**: p. 190-202.
6. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
7. Fehniger, T.A., et al., *Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs*. Immunity, 2007. **26**(6): p. 798-811.
8. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 225-74.
9. Marras, F., F. Bozzano, and A. De Maria, *Involvement of activating NK cell receptors and their modulation in pathogen immunity*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 152430.
10. Seidel, E., A. Glasner, and O. Mandelboim, *Virus-mediated inhibition of natural cytotoxicity receptor recognition*. Cell Mol Life Sci, 2012.
11. Moretta, L., et al., *Surface NK receptors and their ligands on tumor cells*. Semin Immunol, 2006. **18**(3): p. 151-8.
12. Lion, E., et al., *Natural killer cell immune escape in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2012. **26**(9): p. 2019-26.
13. Vance, R.E., A.M. Jamieson, and D.H. Raulet, *Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells*. J Exp Med, 1999. **190**(12): p. 1801-12.
14. Derre, L., et al., *Expression of CD94/NKG2-A on human T lymphocytes is induced by IL-12: implications for adoptive immunotherapy*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 4864-70.
15. Mingari, M.C., et al., *HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1172-7.
16. Heidenreich, S., et al., *Impact of the NK cell receptor LIR-1 (ILT-2/CD85j/LILRB1) on cytotoxicity against multiple myeloma*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 652130.
17. Biassoni, R., *Human natural killer receptors, co-receptors, and their ligands*. Curr Protoc Immunol, 2009. **Chapter 14**: p. Unit 14 10.
18. Sivori, S., et al., *2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation*. Eur J Immunol, 2000. **30**(3): p. 787-93.
19. Yague, J., et al., *The T cell receptor: the alpha and beta chains define idiotypic, and antigen and MHC specificity*. Cell, 1985. **42**(1): p. 81-7.
20. V. Pérez-Flores*, A.C.G., N.E. Rossi*, M.J. Recio, J. Reiné, J.R. Regueiro, *El complejo TCR/CD3: especificidad con flexibilidad*. Inmunología, 2006. **25**: p. 50-56.
21. Inaba, K., et al., *Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells*. J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 2163-73.
22. Chen, L. and D.B. Flies, *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(4): p. 227-42.

23. Dilek, N., et al., *Targeting CD28, CTLA-4 and PD-L1 costimulation differentially controls immune synapses and function of human regulatory and conventional T-cells*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83139.
24. Mescher, M.F., et al., *Molecular basis for checkpoints in the CD8 T cell response: tolerance versus activation*. Semin Immunol, 2007. **19**(3): p. 153-61.
25. Chowdhury, D. and J. Lieberman, *Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 389-420.
26. Voskoboinik, I., M.J. Smyth, and J.A. Trapani, *Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(12): p. 940-52.
27. Walsh, C.M., et al., *Immune function in mice lacking the perforin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 10854-8.
28. Kagi, D., et al., *Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice*. Nature, 1994. **369**(6475): p. 31-7.
29. Pardo, J., et al., *Granzyme B-induced cell death exerted by ex vivo CTL: discriminating requirements for cell death and some of its signs*. Cell Death Differ, 2008. **15**(3): p. 567-79.
30. Pardo, J., et al., *The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation*. Microbes Infect, 2009. **11**(4): p. 452-9.
31. Metkar, S.S., et al., *Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response*. Immunity, 2008. **29**(5): p. 720-33.
32. Pardo, J., et al., *Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis*. J Cell Biol, 2004. **167**(3): p. 457-68.
33. Sola, S., A.L. Morgado, and C.M. Rodrigues, *Death receptors and mitochondria: two prime triggers of neural apoptosis and differentiation*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(1): p. 2160-6.
34. Pardo, J., Alberto; Regner, Matthias; and, Froelich, *Immunological Cytotoxic Factors*. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Chicester, 2008.
35. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
36. Degterev, A., M. Boyce, and J. Yuan, *A decade of caspases*. Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8543-67.
37. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
38. Reuter, S., et al., *Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(11): p. 1340-51.
39. Karch, J., et al., *Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice*. Elife, 2013. **2**: p. e00772.
40. Haggard, F.A. and R.P. Boushey, *Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors*. Clin Colon Rectal Surg, 2009. **22**(4): p. 191-7.
41. Cheng, M., et al., *NK cell-based immunotherapy for malignant diseases*. Cell Mol Immunol, 2013. **10**(3): p. 230-52.
42. Van Emburgh, B.O., et al., *Acquired resistance to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer*. Mol Oncol, 2014.
43. Kavanagh, D.O., et al., *Is overexpression of HER-2 a predictor of prognosis in colorectal cancer?* BMC Cancer, 2009. **9**: p. 1.
44. Imai, K., et al., *Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population*. Lancet, 2000. **356**(9244): p. 1795-9.

45. Sanchez-Martinez et al., *Human NK cells activated by EBV+ lymphoblastoid cells overcome anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in haematological cancer cells*. 2014 (sent, not published yet).
46. Ruggeri, L., et al., *Natural killer cell recognition of missing self and haploidentical hematopoietic transplantation*. *Semin Cancer Biol*, 2006. **16**(5): p. 404-11.
47. Castriconi, R., et al., *NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties*. *J Immunol*, 2009. **182**(6): p. 3530-9.
48. Avril, T., et al., *Human glioblastoma stem-like cells are more sensitive to allogeneic NK and T cell-mediated killing compared with serum-cultured glioblastoma cells*. *Brain Pathol*, 2012. **22**(2): p. 159-74.
49. Tallarico, R., et al., *Human NK cells selective targeting of colon cancer-initiating cells: a role for natural cytotoxicity receptors and MHC class I molecules*. *J Immunol*, 2013. **190**(5): p. 2381-90.
50. Bhat, R. and J. Rommelaere, *NK-cell-dependent killing of colon carcinoma cells is mediated by natural cytotoxicity receptors (NCRs) and stimulated by parvovirus infection of target cells*. *BMC Cancer*, 2013. **13**: p. 367.
51. Sanchez-Martinez, D., et al., *All-trans retinoic acid (ATRA) induces miR-23a expression, decreases CTSC expression and granzyme B activity leading to impaired NK cell cytotoxicity*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014. **49**: p. 42-52.
52. Klein, E., et al., *Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia*. *Int J Cancer*, 1976. **18**(4): p. 421-31.
53. Saez-Borderias, A., et al., *IL-12-dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor regulates CD94/NKG2C+ NK cell function*. *J Immunol*, 2009. **182**(2): p. 829-36.
54. Kaiserman, D., et al., *The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent*. *J Cell Biol*, 2006. **175**(4): p. 619-30.
55. Harari, A., et al., *Distinct profiles of cytotoxic granules in memory CD8 T cells correlate with function, differentiation stage, and antigen exposure*. *J Virol*, 2009. **83**(7): p. 2862-71.
56. Vitale, M., et al., *NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis*. *J Exp Med*, 1998. **187**(12): p. 2065-72.
57. Lopez-Botet, M., et al., *Structure and function of the CD94 C-type lectin receptor complex involved in recognition of HLA class I molecules*. *Immunol Rev*, 1997. **155**: p. 165-74.