



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

# PROTOCOLOS DE EXPANSIÓN Y ACTIVACIÓN DE CÉLULAS NK HUMANAS

María Gascón Resano

Director: Alberto Anel Bernal

Facultad de Ciencias

2016

# ÍNDICE

<b>RESUMEN/ ABSTRACT</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1.1 CÉLULAS NK.....	2
1.1.1 MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD.....	2
1.2 LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA DE CÉLULAS B (LLC-B).....	4
1.3 UTILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS NK EN TERAPIA ANTITUMORAL.....	5
<b>2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b> .....	6
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	7
3.1 CULTIVOS CELULARES.....	7
3.1.1 LÍNEAS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO.....	7
3.1.2 CONDICIONES DE ESTERILIDAD.....	7
3.1.3 MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR.....	7
3.1.4 CONTAJE Y VIABILIDAD CELULAR.....	7
3.1.5 CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS.....	8
3.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS NK ACTIVADAS Y EXPANDIDAS.....	8
3.2.1 CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD EN FICOLL-PAQUE.....	8
3.2.2 ELIMINACIÓN PARCIAL DE LINFOCITOS T MEDIANTE LA TÉCNICA DE MACS.....	9
3.2.3 ACTIVACIÓN Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS NK.....	9
3.2.4 ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN Y DE LA EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	10
3.2.5 AISLAMIENTO DE CÉLULAS NK Y MARCAJE CON "CELL TRACKER GREEN" .....	10
3.3 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.....	10
3.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 EN CÉLULAS DE PACIENTES DE LLC-B.....	11
<b>4. RESULTADOS</b> .....	12
4.1 EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS NK.....	12
4.1.1 EXPERIMENTO 1.....	12
4.1.2 EXPERIMENTO 2.....	14
4.2 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD SOBRE CÉLULAS DE LLC-B.....	17
4.3 LEUCEMIAS RESISTENTES.....	18
4.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1.....	18
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	20
<b>6. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS</b> .....	22
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	23

## RESUMEN/ ABSTRACT

La leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B) es causada por la acumulación de linfocitos B maduros en sangre periférica, médula ósea y órganos linfoides secundarios. Para su tratamiento, se han utilizado fármacos alquilantes, corticoesteroides o análogos de purinas, los cuales se ha visto que pueden tener efectos secundarios inmunosupresores. Por esta razón, la inmunoterapia antitumoral podría ser una estrategia prometedora. Las células NK, pertenecientes al sistema inmunitario innato, se caracterizan por su capacidad citotóxica frente a células diana sin sensibilización previa y se ha visto que su infiltración en un tejido tumoral está relacionada con un mejor pronóstico. Sin embargo, las células tumorales pueden crear un entorno que inhiba el ataque de las células NK, las cuales presentan una actividad citotóxica disminuida. Por tanto, una importante estrategia sería potenciar la citotoxicidad de las células NK para intentar eliminar el tumor. La finalidad de este trabajo es expandir y activar las células NK aumentando así sus capacidades citotóxicas. Para ello, se han optimizado protocolos de activación y expansión en presencia de células estimuladoras 721.221 y de interleucinas IL-2 y IL-15 en presencia o ausencia de IFN- $\alpha$ . Además, tras ser activadas, se han llevado a cabo ensayos de citotoxicidad de las células NK frente a células de pacientes de LLC-B. Se ha conseguido la expansión de las células NK y se ha demostrado su citotoxicidad frente a las células de los pacientes. Estos resultados apoyan la posible utilización clínica de las células NK expandidas en la terapia de la LLC-B.

B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is caused by the accumulation of mature B cells in peripheral blood, bone marrow and secondary lymphoid organs. Alkylating drugs, corticosteroids or purine analogs have been used for its treatment, but they can have immunosuppressor secondary effects. Therefore, the antitumor immunotherapy could be a promising strategy. NK cells, belonging to the innate immune system, are characterized by their cytotoxic ability against target cells without prior sensitization and their infiltration in a tumor tissue is related to a better prognosis. However, tumor cells may produce an environment that inhibits the attack by NK cells, which have a decreased cytotoxic activity. Thus, an important strategy could be to increase the cytotoxicity of NK cells to fight against tumors. The purpose of this study was to expand and activate NK cells to increase their cytotoxic activity. For this, activation and expansion protocols have been optimized with stimulator cells 721.221 and interleukins IL-2 and IL-15 in the presence or absence of IFN- $\alpha$ . Furthermore, after being activated, cytotoxicity assays of NK cells have been developed against cells of B-CLL patients. The cell expansion has been achieved and it has been demonstrated their cytotoxicity against cells of patients. These results support the potential clinic use of expanded NK cells in B-CLL therapy.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 CÉLULAS NK

Las células NK o asesinas naturales, del inglés “natural killer” son consideradas como una línea linfocítica perteneciente al sistema inmunitario innato que presentan citotoxicidad natural contra células infectadas por virus o tumorales [1, 2]. Proceden de precursores hematopoyéticos generados en la médula ósea y representan entre el 5% y el 20% de los linfocitos de la sangre periférica humana [3]. Tienen una morfología similar a los linfocitos granulados y están caracterizadas fenotípicamente por la expresión de CD16 y CD56, así como por la ausencia de CD3 y del receptor de células T en la superficie celular [4]. Estas células pueden ser subdivididas en dos poblaciones: CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup>. Las células pertenecientes a la población CD56<sup>bright</sup> representan el 10% de las NK circulantes y se caracterizan por tener poca capacidad citotóxica y tener función regulatoria a través de la secreción de citoquinas. Por otra parte, la población CD56<sup>dim</sup> es la mayoritaria y es responsable de ejercer las funciones citolíticas [5].

La característica funcional que define a las células NK es su capacidad citotóxica intrínseca sobre células diana sin sensibilización previa. El efecto antitumoral que presentan estas células ha sido observado en tumores de orígenes hematopoyéticos y no hematopoyéticos, y ensayado en distintos modelos *in vivo*. La infiltración de células NK en el tejido tumoral se asocia con un mejor pronóstico y se ha vinculado la baja citotoxicidad de las NK en sangre periférica con un mayor riesgo de cáncer. Así pues, la inmunoterapia con células NK ha sido establecida como una estrategia prometedora [6].

La citotoxicidad de estas células parece estar directamente relacionada con la ausencia o alteración de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) en las células diana. De hecho, la citotoxicidad de las células NK es inversamente proporcional a la expresión de MHC-I (o HLA-I en humanos) en la célula diana. Las líneas de células mutantes con la expresión de MHC disminuida en su superficie son más sensibles a las células NK que las líneas parentales [7]. Por otra parte, la función fisiológica más importante de las células NK consiste en la eliminación de infecciones virales que producen la disminución en la expresión de MHC-I en las células infectadas, como los virus de la familia del Herpes [8, 9].

### 1.1.1 MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD

La activación de las células NK depende de un proceso de señalización mediada por receptores de activación e inhibición. Los niveles de expresión del MHC-I o los diferentes ligandos de los receptores de activación en la célula diana son de gran importancia en la respuesta [1].

Las células NK son morfológicamente caracterizadas como linfocitos granulares. Estos gránulos contienen perforinas (proteína de membrana que perfora la membrana de la célula diana) y granzimas (familia de enzimas proteolíticas), responsables de la muerte mediada por células NK. Cuando las células NK interaccionan con las células diana, se produce una sinapsis inmunológica y exocitosis de los gránulos, produciendo la muerte de las células diana, normalmente por apoptosis.

Además, las células NK también son capaces de matar células tumorales empleando moléculas de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), como FasL o TRAIL que interaccionarán con sus respectivos receptores en las células tumorales. De tal manera, se activará la cascada enzimática de las caspasas, produciendo la apoptosis de la célula [2, 10, 11].

### Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC)

La ADCC se describe como un mecanismo selectivo de citotoxicidad dependiente de anticuerpos. El receptor de la fracción Fc de las IgG de tipo IIIa expresado en la superficie de las células NK, también llamado CD16, se une a la fracción Fc de un anticuerpo que reconozca a una célula infectada y activa los mecanismos citotóxicos indicados anteriormente. Este mecanismo también es de gran importancia en la inmunoterapia del cáncer con anticuerpos de isotipo IgG1 antitumorales [2, 5].

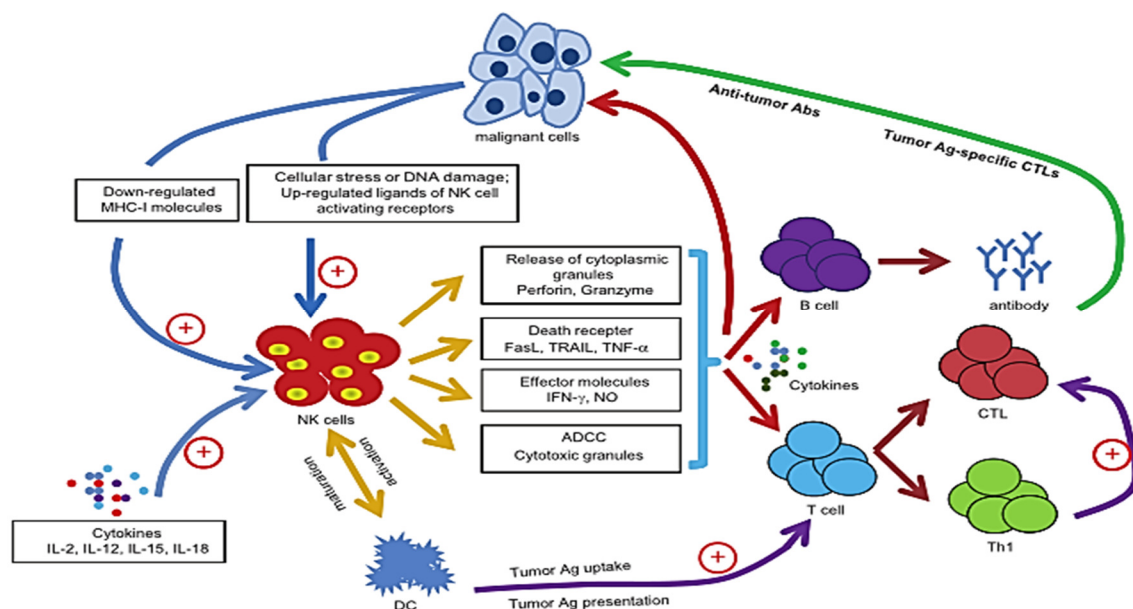


Figura 1: Actividad de las células NK frente a células tumorales [11]

## **Citotoxicidad natural**

La transición de las células NK quiescentes a la activación y adquisición de la citotoxicidad está mediada por diferentes señales de activación e inhibición así como distintos receptores [6].

Los receptores de activación son un elemento crucial en la regulación de la función de las células NK. Algunos de estos receptores son NKG2D y los NCRs: NKp30, NKp44 y NKp46. Trabajos recientes sugieren que no hay un receptor dominante sino que se necesitan señales de activación sinérgicas.

Todas las células NK suelen expresar NKp30 y NKp46, mientras que NKp44 solo es expresado en las células NK activadas. La adquisición de los NCRs durante la maduración de las NK correlaciona con la adquisición de la actividad citotóxica contra células diana tumorales. Inversamente, la disminución de NKp30, NKp44 y NKp46 correlaciona con bajos niveles en la actividad citotóxica [12].

El receptor homodimérico NKG2D es miembro de la superfamilia de las lectinas de tipo C y se expresa en las células NK y en subpoblaciones de células T. Es un importante receptor en la detección y eliminación de células infectadas y transformadas. Los ligandos de este receptor raramente aparecen expresados en tejido sanos pero sí que son inducidos por el “estrés” celular debido a transformación o infección viral, por lo que, frecuentemente, las células tumorales expresan ligandos de NKG2D [2, 12].

Por otra parte, la familia de receptores KIR es el grupo dominante de los reguladores negativos o receptores de inhibición de las células NK.

Los diferentes tipos de receptores KIR interaccionan con diversos haplotipos HLA-A, -B ó -C. La expresión del HLA-I en las células sanas proporciona la señal inhibitoria que evita la inducción de respuesta autoinmune por parte de las células NK. Sin embargo, puede aparecer la ausencia de la interacción KIR-HLA I, resultando en un aumento de la capacidad citotóxica de las células NK. [6]

### **1.2 LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA DE CÉLULAS B (LLC-B)**

La leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B) es la leucemia más común en adultos en el mundo occidental y es debida a la acumulación de linfocitos B maduros en la sangre periférica, médula ósea y órganos linfoides secundarios. Las células de leucemia muestran un fenotipo diferente, lo cual es esencial a la hora de realizar el diagnóstico, siendo células pequeñas y homogéneas, caracterizadas por la fragilidad de su membrana plasmática. A pesar de la homogeneidad del fenotipo, la clínica puede ser significativamente diferente: algunos pacientes presentan una leucemia indolente, con buen pronóstico mientras que otros presentan una enfermedad agresiva con necesidad de tratamiento [13].

Las terapias basadas en fármacos alquilantes han sido empleadas como la primera línea de tratamiento de LLC durante décadas, solos o en asociación con corticoesteroides, así como análogos de las purinas que promueven la apoptosis [13, 14]. Estos tratamientos pueden comprometer las respuestas inmunes antitumorales debido a sus efectos secundarios inmunosupresores.

### **1.3 UTILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS NK EN TERAPIA ANTITUMORAL**

Por ello, se buscan terapias basadas en el aprovechamiento del sistema inmunológico, conocido como inmunoterapia antitumoral. Los avances en la biología de las células NK y en sus funciones, hacen que se hayan convertido en una potente herramienta de la inmunoterapia, buscando mejorar su activación y proliferación, donde una de las mejores estrategias sería la administración de citoquinas [2].

En pacientes con leucemia linfocítica crónica, el número total de células NK en sangre periférica está aumentado, pero presentan una actividad citotóxica defectiva. Esta actividad citotóxica puede ser estimulada mediante el cultivo con citoquinas entre las que se encuentran la IL-2, citoquina que produce la activación y expansión de las células NK, y la IL-15, también relacionada con la activación de las células NK [5]. El IFN- $\alpha$  también es una citoquina estimuladora de las células NK y nuestro grupo ha caracterizado recientemente la vía de transducción de señal que utiliza para estudiar la función de las células NK [15].

A pesar de las diversas estrategias que pueden llevar a cabo las células NK, las células tumorales con frecuencia evitan el ataque de éstas mediante mecanismos directos e indirectos. Estos mecanismos inmunosupresores crean un entorno donde las funciones citotóxicas de las células NK son inhibidas. De tal forma, el tumor es capaz de escapar de la vigilancia inmunológica, creciendo y desarrollándose. Así pues, el aumento de las funciones citotóxicas de las células NK es un paso importante en la eliminación del tumor [3, 6].

## 2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Previamente, en nuestro grupo de investigación se han llevado a cabo trabajos con el objetivo de emplear las células NK como inmunoterapia en la LLC-B.

Se realizaron experimentos basados en la activación de las células NK durante 5 días empleando IL-2, IL-15 y células linfoblastoides EBV<sup>+</sup> R69. Se observó que las células NK se activaban y eran capaces de ejercer citotoxicidad sobre células de pacientes de LLC-B. Sin embargo, no se conseguía una expansión celular necesaria para poder tratar pacientes con células NK procedentes de un único donante [16].

Por otra parte, el Dr. Martín Villalba del INSERM en Montpellier ha puesto a punto un protocolo de expansión de células NK a partir de células de cordón umbilical en el que nos hemos basado.

Así pues, continuando con estas investigaciones y con el objeto de mejorar la activación y proliferación de las células NK y emplearlas en el tratamiento de la LLC-B, se han establecido los siguientes objetivos:

1. Establecer un protocolo de expansión de células NK humanas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de donantes sanos.
2. Comparar los resultados obtenidos al emplear las células estimuladoras 721.221 en combinación con IL-2+IL-15 en presencia o ausencia de IFN- $\alpha$ .
3. Estudiar la expansión y analizar el fenotipo de las células NK obtenidas.
4. Ensayo de la citotoxicidad de las células NK expandidas sobre células de pacientes de LLC-B

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 CULTIVOS CELULARES

#### 3.1.1 LÍNEAS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO

La línea celular 721.221 es una línea linfoblastoide humana transformada por el virus de Epstein-Bar y deficiente en la expresión de moléculas HLA-I. Esta línea celular se emplea como célula estimuladora en co-cultivos con las células NK. Se cultiva en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) decomplementado al 10% (v/v), Glutamax y antibióticos (penicilina y estreptomycin), con dos cambios de medio y diluciones a la semana.

#### 3.1.2 CONDICIONES DE ESTERILIDAD

En el aire, existen numerosos microorganismos diferentes tales como bacterias, levaduras y hongos, que podrían contaminar los cultivos celulares. Por ello, toda manipulación realizada con células eucariotas en cultivo, debe llevarse a cabo en condiciones de esterilidad.

Por tanto, la manipulación de los cultivos celulares ha sido realizada en una campana de flujo laminar vertical empleando material previamente esterilizado.

#### 3.1.3 MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR

Los cultivos de las células 721.221 se llevaron a cabo en frascos de cultivo de 25 o 75 cm<sup>2</sup> con un tapón hermético con un filtro de 0.2µm de diámetro para permitir el intercambio de gases pero no el paso de microorganismos, manteniéndose en un incubador termostatzado a 37°C y con un aporte fijo del 5% de CO<sub>2</sub>.

Los subcultivos se realizaron en una campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad cada 2 ó 3 días, para mantener la concentración adecuada de células.

#### 3.1.4 CONTAJE Y VIABILIDAD CELULAR

Para determinar el número de células y su viabilidad, se empleó la cámara de Neubauer y la tinción con azul Trypan. Este colorante proporciona un color azul a aquellas células que han perdido la integridad de la membrana celular, lo que permitirá distinguir las células vivas de las muertas. Para ello, se mezclaron, en un tubo eppendorf, 50 µl de suspensión celular con 50 µl de azul Trypan. Tras resuspenderlo de manera adecuada, se depositó en la cámara de Neubauer y las células se contaron en un microscopio óptico a 200 ó 400 aumentos.

### **3.1.5 CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS**

Para la congelación celular, se llevó a cabo una centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos para eliminar el medio de cultivo. Las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 con un 10% de SFB enriquecido en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% y se trasvasaron a viales de congelación, introducidos posteriormente en un congelador a -80°C. Finalmente, se trasvasaron a contenedores de N<sub>2</sub> líquido.

Para descongelar las células, el contenido de cada vial fue trasvasado a un Falcon con 10 ml de medio RPMI con 10% de SFB y centrifugado durante 5 minutos a 1500 rpm, permitiendo la eliminación del sobrenadante con DMSO. Después, las células se resuspendieron en medio de cultivo completo y se cultivaron en placas de 6 pocillos en un volumen de 2 ml.

Además, en el caso de la descongelación de células de pacientes de LLC-B, fue necesario añadir IL-4 (100 UI/ml) al medio de cultivo para mejorar su supervivencia. Por otra parte, para la descongelación de células NK activadas, se incorporaron al medio IL-2 (100 UI/ml) e IL-15 (25 UI/ml).

## **3.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS NK ACTIVADAS Y EXPANDIDAS**

### **3.2.1 CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD EN FICOLL-PAQUE**

Para aislar las células mononucleares de la sangre periférica, se llevó a cabo una centrifugación en gradiente de densidad empleando Ficoll-Paque (polisacárido al que se ha añadido diatrizoato de sodio y que presenta una densidad de 1,078 g/ml), que permite separar las distintas poblaciones de células sanguíneas por centrifugación en gradiente de densidad. Todos los reactivos y materiales empleados fueron esterilizados previamente.

Se parte de “buffy-coats” obtenidos a través de los correspondientes permisos del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón, que son capas leucoplaquetarias que contienen la mayoría de leucocitos y plaquetas de la unidad de sangre de la que proceden. El contenido del “buffy-coat” fue diluido en un tubo Falcon con 10 ml de PBS estéril. Esta mezcla se depositó cuidadosamente sobre 20 ml de Ficoll-Paque contenidos en otro tubo Falcon y se centrifugó durante 20 minutos a 1500 rpm y sin freno, para evitar el daño celular. Tras la centrifugación, las células de interés aparecen en la interfase entre la fase acuosa y el Ficoll formando un anillo blanquecino, el cual fue extraído y depositado en un tubo con PBS, permitiendo la eliminación de los restos de Ficoll, proceso que se repite dos veces. Después, las células fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 al 10% en SFB (v/v) de complementado. Se obtuvo así una población celular leucocitaria, que llamaremos PBL (linfocitos de sangre periférica).

### **3.2.2 ELIMINACIÓN PARCIAL DE LINFOCITOS T MEDIANTE LA TÉCNICA DE MACS**

Antes de iniciar los cultivos para activar a las células NK es conveniente eliminar, al menos parcialmente, a los linfocitos T, población mayoritaria en los PBL. Para ello, se llevó a cabo una separación celular mediante columnas basadas en campos magnéticos, empleando microsferas MACS, partículas paramagnéticas unidas a anticuerpos específicos que reconocen la proteína de membrana CD3, característica de los linfocitos T y ausente en las células NK.

Las células se resuspendieron en 90 µl de tampón MACS. Se añadieron 10 µl de microsferas conjugadas con anti-CD3 por cada  $10^7$  células totales y se incubaron 15 minutos a 4°C. Tras centrifugar, se pasó la muestra celular a través de una columna MACS.

De esta forma, las células que expresan CD3 en su superficie quedan retenidas en la columna mientras que las que carecen de ella son eluidas, obteniéndose una población celular enriquecida en células NK.

### **3.2.3 ACTIVACIÓN Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS NK**

Antes de empezar el cultivo, las células estimuladoras 721.221 se trataron con 1 ml de mitomicina C por cada  $10^7$  células 721.221 en 20 ml de RPMI 1640 durante 120 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se lavaron para eliminar la mitomicina C. Este tratamiento impide que las células estimuladoras proliferen, aunque conservan la expresión de sus receptores de membrana.

Con el objeto de permitir la proliferación e incrementar la capacidad citotóxica de las células NK, se llevó a cabo el establecimiento de cultivos celulares a una densidad celular de  $2 \cdot 10^6$  células/ml en frascos inicialmente con 10 ml de medio RPMI 1640 al 10% en SFB, en presencia de IL-2 (100 UI/ml), IL-15 (25 UI/ml), con o sin IFN- $\alpha$  (50 UI/ml) en presencia de células 721.221 pre-tratadas con mitomicina C en relación 10:1 (PBL: células 721.221).

Se establecieron tres cultivos diferentes: el primero de ellos serviría de control, incorporando únicamente las células sanguíneas; en el segundo, se añadirían células 721.221, IL-2 e IL-15; y en el tercero, se incorporaría también IFN- $\alpha$ .

Los cultivos celulares se mantuvieron durante 15 o 20 días, realizando un análisis de la viabilidad celular mediante azul Trypan y un estudio de la proliferación y evolución de las poblaciones mediante citometría de flujo a día 5, 10, 15 y 20 del experimento, en los cuales se incorporaron células 721.221, IL-2, IL-15 e IFN- $\alpha$  en las concentraciones indicadas anteriormente y se ajustaron las células a la concentración de  $2 \cdot 10^6$  células/ml.

### **3.2.4 ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN Y DE LA EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

La proliferación celular se estimó en cada punto temporal por conteo de células viables, negativas para el marcaje con Azul Trypan.

Para poder estudiar la evolución de las poblaciones celulares en función del tiempo, se llevó a cabo un análisis por citometría de flujo a día 0, 5, 10, 15 y 20. Se realizó marcaje con un anticuerpo anti-CD3 conjugado con FITC y un anticuerpo anti-CD56 conjugado con APC, ambos de la casa Miltenyi, que permite la diferenciación entre las distintas poblaciones linfocitarias. En concreto, las células NK son negativas para la expresión de CD3 y positivas para la expresión de CD56.

El marcaje se realizó en una placa de 96 pocillos, empleando una densidad de 100000 células/pocillo. Tras añadir el volumen necesario de células, centrifugar y lavar con PBS con un 5% de SFB, se añadieron 96 µl de PBS con un 5% de SFB, 2 µl del anticuerpo anti-CD3 y 2 µl del anticuerpo anti-CD56 en cada pocillo y se incubó a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente, se analizaron las distintas poblaciones en el citómetro de flujo, empleando el programa informático CellQuest Pro.

### **3.2.5 AISLAMIENTO DE CÉLULAS NK Y MARCAJE CON “CELL TRACKER GREEN”**

Una vez cumplido el día 20 del establecimiento del cultivo de los PBLs, se llevó a cabo un nuevo aislamiento de las células NK empleando microsferas MACS conjugadas con anticuerpo anti-CD56. En este caso, se procede a una separación positiva, puesto que las células NK quedan unidas a las microsferas con el anticuerpo. Tras eluir las células de la columna y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos, se resuspendieron en 10 ml de medio y se realizó el conteo mediante tinción con azul Trypan (*apartado 4.1.4*) y microscopía óptica.

Posteriormente, se llevó a cabo una nueva centrifugación, eliminando el medio y añadiendo 1 ml de PBS y 1 µl de Cell Tracker Green, molécula fluorescente que atraviesa libremente las membranas celulares y queda atrapada en el interior de las células vivas. Esta incubación se realizó durante 15 minutos a 37°C y seguidamente las células se lavaron con medio RPMI 1640 al 10% de SFB y se dejó incubando a 37°C durante 30 minutos más.

## **3.3 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD**

Las muestras de LLC-B fueron suministradas por la Dra. Gemma Azaceta, del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, tras el consentimiento informado por parte de los pacientes. En todos los casos, las células leucémicas son más del 85% de los PBMC. Las muestras consisten en tubos de 5 ml de sangre heparinizada.

Las células se obtienen mediante separación en gradiente de densidad empleando Ficoll-Paque, seleccionando la población leucocitaria (*apartado 4.2.1*). Tras los correspondientes lavados, las células se resuspenden en medio RPMI 1640 al 10% en SFB para realizar el conteo mediante tinción con azul Trypan y microscopía óptica.

Para realizar el ensayo de citotoxicidad, se empleó una placa de 96 pocillos. Se depositaron 250.000 células NK activadas y 50.000 células leucémicas en cada pocillo, es decir, a un ratio de 5:1 (células NK: células diana) y se añadió IL-4 (100 UI/ml). Se incubaron durante 4 horas a 37°C. Además, se establecieron pocillos de cada tipo celular por separado como control, tanto de células NK activadas como de las células leucémicas.

Cumplido el tiempo de incubación, se realizó una centrifugación a 3500 rpm durante 2 minutos con posterior eliminación del sobrenadante y se realizó el marcaje con 1,5 µl de 7-AAD (7-Aminoactinomicina D), compuesto químico fluorescente que se une al DNA de células con la membrana dañada, disuelto en PBS al 5% en SFB. Se incubó durante 15 minutos a 4°C y, transcurrido este tiempo, se analizaron las muestras mediante citometría de flujo. En cada caso, se seleccionó la población negativa para el marcaje con “cell tracker Green” (las células leucémicas) y se analizó la incorporación de 7-AAD en esa población celular, expresando el resultado como porcentaje de células positivas para 7-AAD.

### **3.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 EN CÉLULAS DE PACIENTES DE LLC-B**

Se ha analizado, además, la expresión del ligando de PD1 (PD-L1) en cuatro muestras de leucemia de pacientes. Estas muestras estaban congeladas en nitrógeno líquido y habían sido empleadas en experimentos anteriores por lo que, en primer lugar, fue necesario descongelarlas (*apartado 4.1.5*).

Posteriormente, se realizó el marcaje en una placa de 96 pocillos. Para ello, se realizó el conteo celular empleando azul Trypan y se distribuyeron 100.000 células/pocillo diluidas en 1 ml de PBS. Tras realizar una centrifugación y posterior eliminación del sobrenadante, se procedió a realizar el marcaje, añadiendo 2 µl de anticuerpo anti-PDL1 conjugado con PE, de la casa comercial BioLegend, en 98 µl de medio.

Tras 30 minutos de marcaje, se realizó una nueva centrifugación y resuspensión en PBS, con posterior análisis por citometría de flujo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS NK

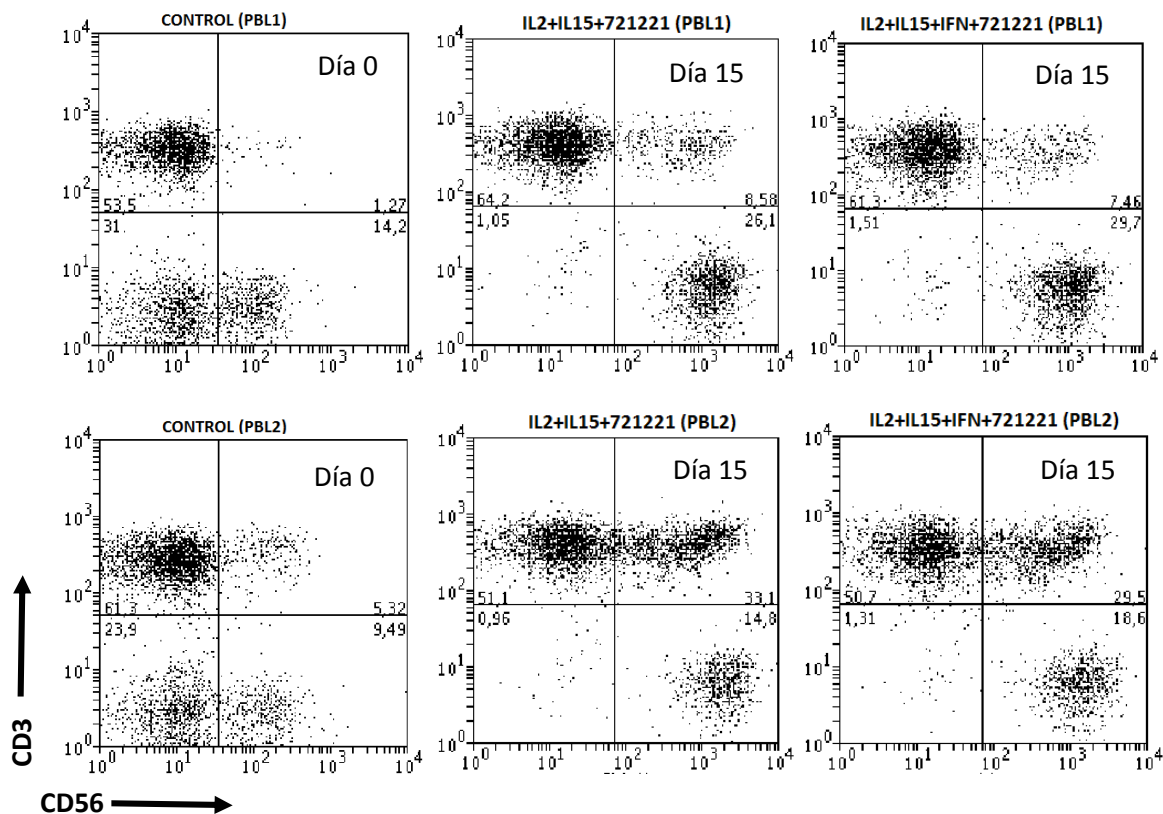
Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, las cuales intervienen en la regulación y comunicación del sistema inmune. En estos experimentos, se han empleado tres tipos de citoquinas: IL-2, IL-15 e IFN- $\alpha$ , con el fin de promover la activación y proliferación de las células NK. También se ha utilizado la línea celular linfoblastoide 721.221 transformada con el virus Epstein-Barr (EBV<sup>+</sup>) y que no expresa HLA-I en su superficie, que permite potenciar la actividad citotóxica y la proliferación de las células NK [17].

Mediante los procesos descritos anteriormente, se establecieron los tres cultivos de células procedentes de los PBL, obtenidos tras realizar la centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque. Empleando la citometría de flujo, se analizó la proliferación y activación de las células NK de cada uno de ellos a día 0, día 5, día 10, día 15 y día 20, pudiendo realizar la comparación de la expansión de las células NK en las distintas condiciones.

#### 4.1.1 EXPERIMENTO 1

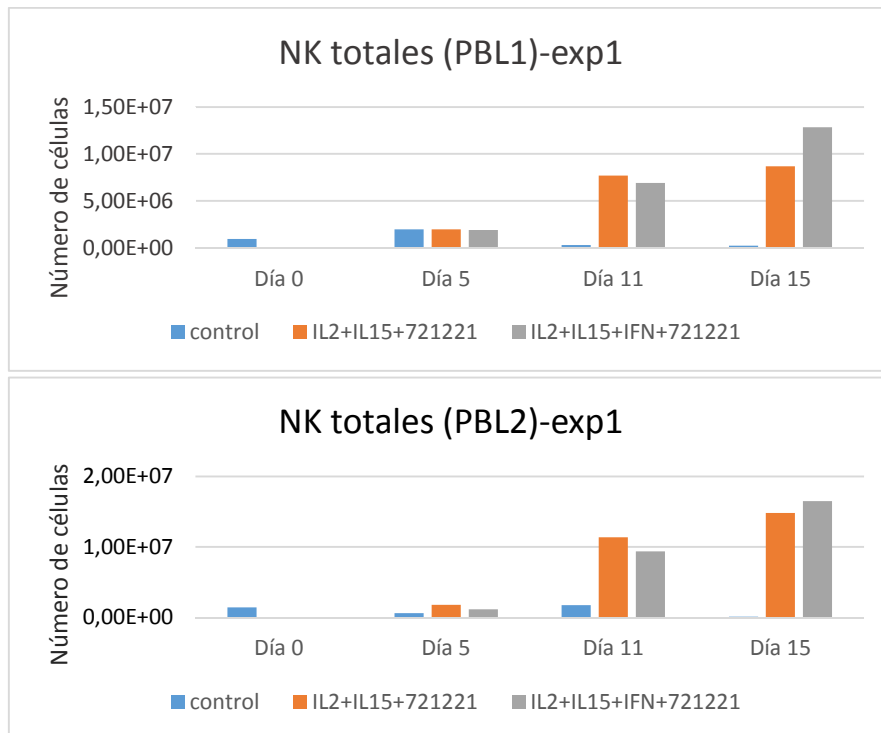
En el primer experimento realizado, se establecieron cultivos celulares procedentes de los PBL de dos donantes diferentes (PBL1 y PBL2). En ambos, se llevó a cabo la expansión hasta día 15 como se observa en la *figura 2*.

En el caso del PBL1, las células NK representaban un 14.2% a día 0 del experimento mientras que, tras días en cultivo en las condiciones indicadas en *Materiales y Métodos*, representan un 26.1% y un 29.7% sin interferón  $\alpha$  y con adición de interferón  $\alpha$ , respectivamente. En el caso del PBL2, el porcentaje inicial de células NK fue de 9.49%, obteniendo a día 15 los valores de 14.8% (sin interferón  $\alpha$ ) y 18.6% (con interferón  $\alpha$ ). En este caso, se observó además una expansión significativa de las células NKT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), de un 5.32% a día 0 a un 33.1% o un 29.5% a día 15 en ausencia o presencia de IFN- $\alpha$ , respectivamente.



**Figura 2:** Gráficas de citometría de flujo, mostrando los porcentajes de las diferentes poblaciones celulares en función de la expresión de CD3 y CD56: linfocitos T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>), células NKT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) y células NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>). Las células se marcaron con un anticuerpo anti-CD3 conjugado con FITC y un anticuerpo anti-CD56 conjugado con APC y se analizaron por citometría de flujo.

En la *figura 3* se muestra el número total de células NK obtenidas en cada caso, obteniéndose una expansión de alrededor de 12 veces. Estos resultados indican que estas condiciones de cultivo son adecuadas para la expansión de las células NK, pero la expansión todavía no sería suficiente para tratar un paciente con células de un solo donante. Por ello, en el siguiente experimento se extendió el tiempo de cultivo hasta 20 días.

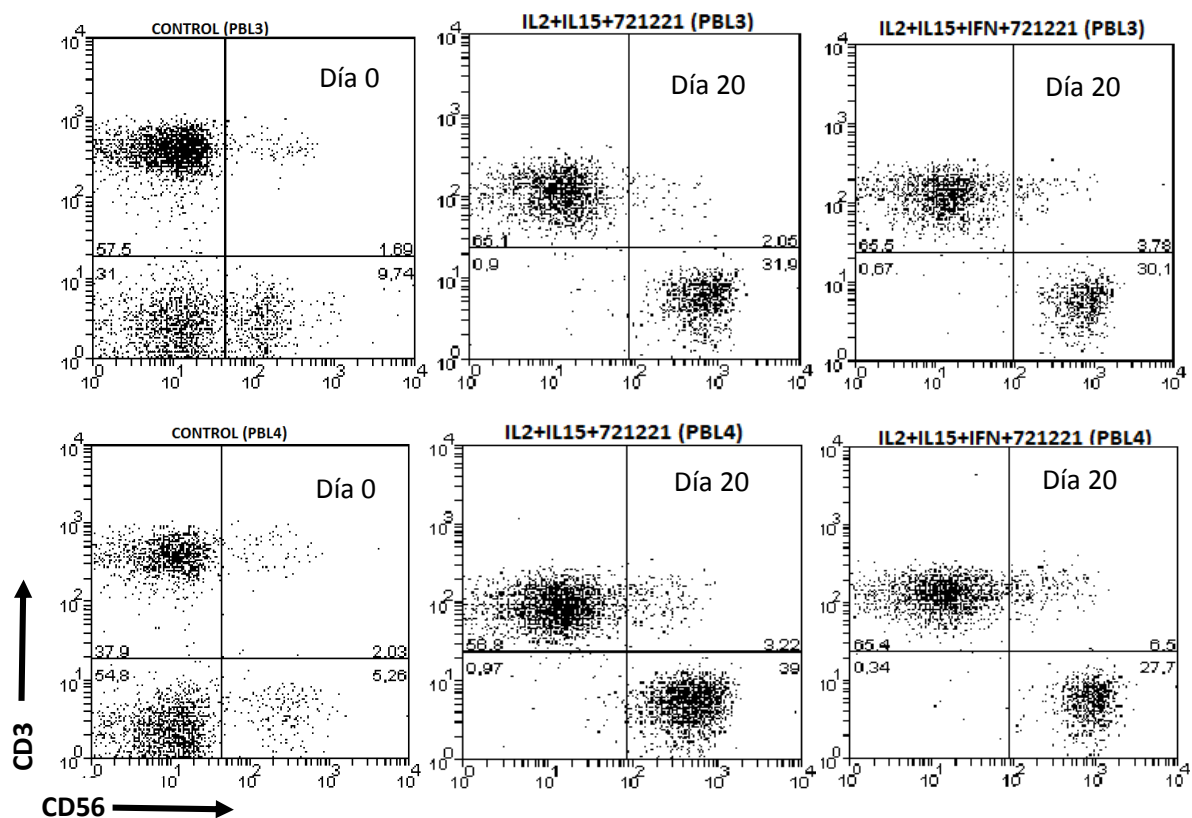


**Figura 3:** Número total de células NK obtenidas a partir de los PBL de dos donantes sanos en función del tiempo en las tres condiciones experimentales utilizadas. Control: cultivo en medio RPMI+10%SFB; IL-2+IL-15+721.221: cultivo en medio RPMI+10%SFB en presencia de células 721.221, 100UI/ml de IL-2 y 25UI/ml de IL-15; IL-2+IL-15+IFN- $\alpha$ +721.221: ídem anterior con la adición de 100 UI/ml de IFN- $\alpha$ .

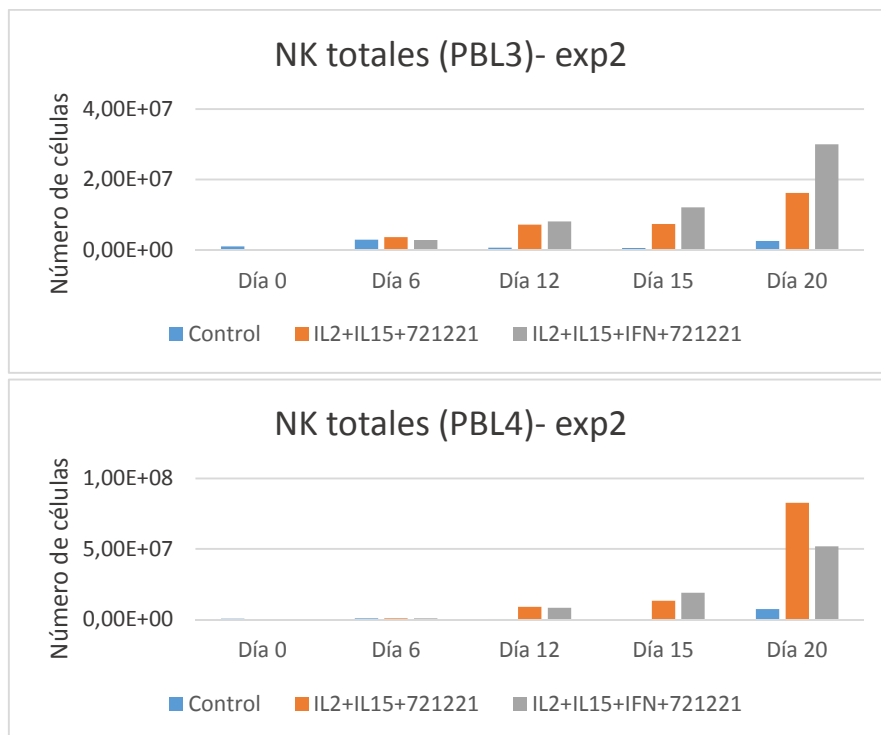
#### 4.1.2 EXPERIMENTO 2

Se realizó un segundo experimento usando PBL procedentes de otros dos donantes sanos (PBL3 y PBL4) y, como se ha indicado, se mantuvieron los cultivos durante 20 días.

Como se observa en la *figura 4*, el porcentaje inicial de células NK en el PBL3 era de 9.74%, obteniendo a día 20 los valores de 31.9% (sin interferón  $\alpha$ ) y 30.1% (con interferón  $\alpha$ ). En el caso del PBL4, el porcentaje de células NK a día 0 fue de 5.26%, mientras que, a día 20, los valores fueron de 39% para el cultivo en ausencia de interferón  $\alpha$  y de 27.7% para las células NK cultivadas en presencia de interferón  $\alpha$ . En ningún caso se observó una expansión significativa de las células NKT, restringiéndose ésta solamente a las células NK.



**Figura 4:** Gráficas de citometría de flujo, mostrando los porcentajes de las diferentes poblaciones celulares en función de la expresión de CD3 y de CD56: linfocitos T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>), células NKT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) y células NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>). Las células se marcaron con un anticuerpo anti-CD3 conjugado con FITC y un anticuerpo anti-CD56 conjugado con APC y se analizaron por citometría de flujo.



**Figura 5:** Número total de células NK obtenidas a partir de los PBL de dos donantes sanos en función del tiempo en las tres condiciones experimentales utilizadas. Control: cultivo en medio RPMI+10%SFB; IL-2+IL-15+721.221: cultivo en medio RPMI+10%SFN en presencia de células 721.221, 100UI/ml de IL-2 y 25UI/ml de IL-15; IL-2+IL-15+IFN- $\alpha$ +721.221: ídem anterior con la adición de 100 UI/ml de IFN- $\alpha$ .

Como se puede ver en la Figura 5, la expansión fue mucho mayor que en el experimento anterior, observándose la mayor tasa de proliferación entre el día 15 y el día 20 de los cultivos,

Con estos datos obtenidos, se analizó el número de veces que las células NK se habían expandido relacionando el valor de células NK totales obtenido a día 20 en las distintas condiciones con las células NK totales a día 0, obteniendo los valores recogidos en la *Tabla 1*.

	PBL3	PBL4
IL2+IL15+721221	16.2	144.2
IL2+IL15+IFN+721221	30	90.6

**Tabla 1:** Número de veces que las células NK se han expandido tras los 20 días en cultivo con respecto a día 0.

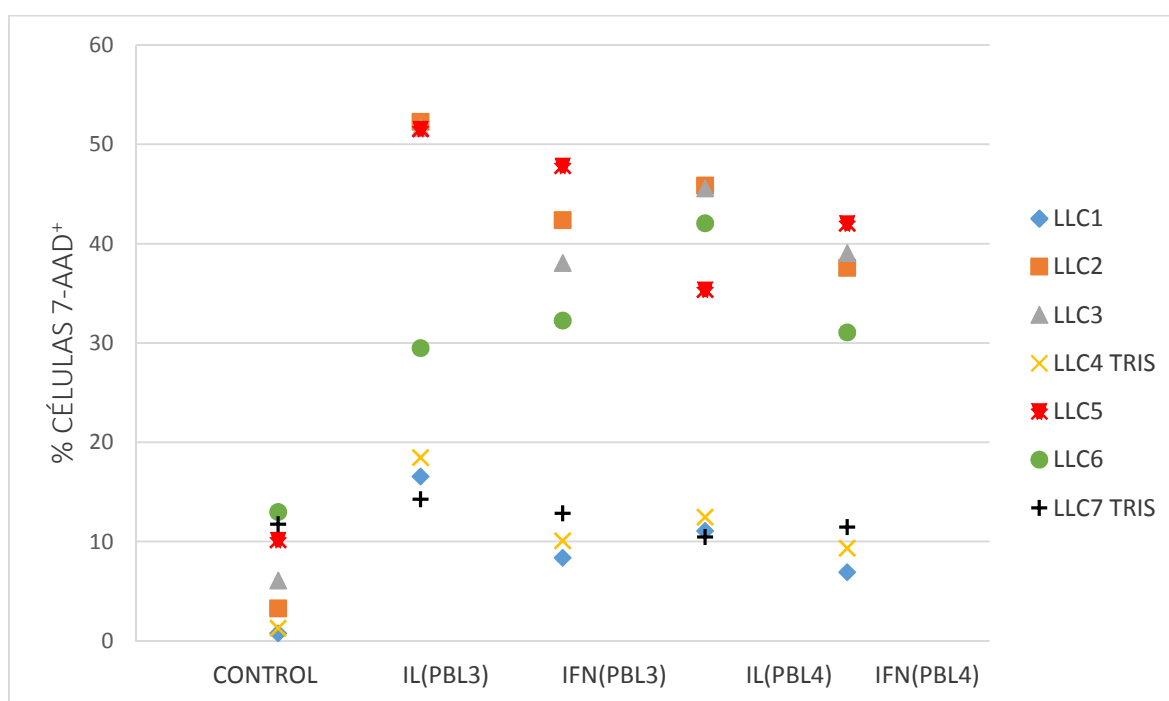
Tras este experimento y teniendo en cuenta también los resultados del experimento anterior, parece que la adición de interferón  $\alpha$  no es determinante en la tasa de expansión obtenida, aunque serían necesarios más experimentos para asegurarlo.

## 4.2 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD SOBRE CÉLULAS DE LLC-B

En este experimento, se aislaron células NK de los cultivos de día 20 por selección positiva con anticuerpos anti-CD56 y se ensayaron sobre 7 muestras frescas de células de pacientes de LLC-B proporcionadas por el Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

Como se observa en la *figura 6*, las leucemias LLC2, LLC3, LLC5 y LLC6 fueron sensibles a la citotoxicidad ejercida por las células NK, obteniéndose unos porcentajes de muerte celular superiores al 30%. Sin embargo, las leucemias LLC1, LLC4 TRIS y LLC7 TRIS fueron resistentes a esta citotoxicidad, mostrando un porcentaje de muerte celular inferior al 20%. El porcentaje de viabilidad de las leucemias en cultivo, sin tratar con las células NK, fue elevado, no pasando del 15% las células 7-AAD<sup>+</sup> (control).

Como puede observarse en la *figura 6*, no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos con las células NK cultivadas en ausencia o en presencia de interferón  $\alpha$ .

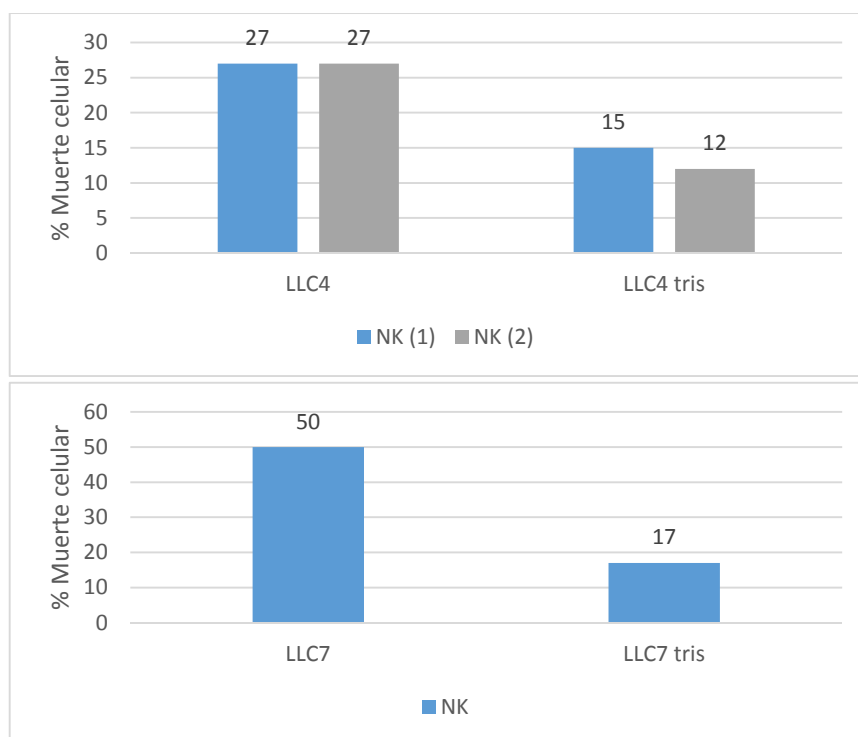


**Figura 6:** representación del porcentaje de muerte celular de 7 muestras de LLC-B al ser ensayadas frente a las células NK. Se aislaron células NK de los cultivos de día 20 como se indica en *Materiales y Métodos* y, seguidamente, se marcaron con “Cell Tracker Green” (CTG). Después, se mezclaron a una proporción 5:1 con células de pacientes de LLC-B y se incubaron durante 4h a 37°C. Seguidamente, las células se marcaron con 7-AAD y se analizaron por citometría de flujo, analizándose el porcentaje de las células 7-AAD<sup>+</sup> en la población de células negativa para el marcaje con CTG (leucemias). IL: células NK expandidas en presencia de 721.221, IL-2 e IL-15; IFN: células NK expandidas en presencia de 721.221, IL-2, IL-15 e IFN- $\alpha$ .

### 4.3 LEUCEMIAS RESISTENTES

En un estudio previo, se habían analizado muestras de LLC-B de los mismos pacientes 4 y 7. En el estudio de citotoxicidad que se realizó en su día, estas LLC-B fueron sensibles a las células NK empleadas en ese ensayo, las cuales eran capaces de inducir su muerte. Sin embargo, en el experimento que acabamos de describir, las células de estos mismos pacientes (LLC4 tris y LLC7 tris) fueron resistentes a las células NK de los nuevos donantes.

Para intentar entender la causa de la adquisición de esta resistencia, se descongelaron las distintas muestras de estas leucemias (LLC4, LLC4 tris, LLC7, LLC7 tris) y las células NK empleadas en el primer estudio, en el cual las leucemias habían sido sensibles. Se ensayaron las cuatro muestras de leucemias en un experimento de citotoxicidad con las células NK descongeladas, observándose que el porcentaje de muerte inducida sobre las muestras resistentes también era menor.



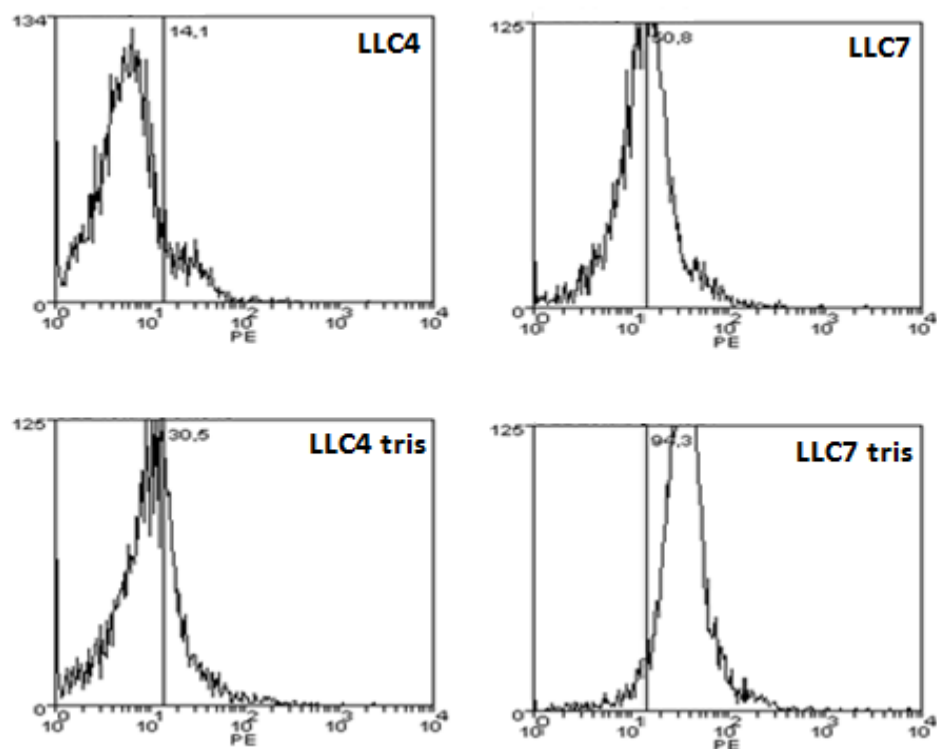
**Figura 7:** Porcentajes de muerte celular de las células de LLC-B inducida por las células NK descongeladas que se usaron inicialmente contra la LLC4 (panel superior, dos donantes: NK1 y NK2) o contra la LLC7 (panel inferior, un donante: NK). El ensayo de citotoxicidad y los resultados se realizaron como se indica en el pie de la figura 6.

### 4.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1

PD-1 es un receptor miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas presente en células T activadas y en células NK. Junto con sus ligandos (PD-L1 y PD-L2), tiene una función importante en la regulación de las respuestas inmunitarias. Estos ligandos

inhiben la función de los linfocitos que presentan PD-1 en su superficie. Muchos tumores expresan estos ligandos, constituyendo un mecanismo de escape de la vigilancia inmunitaria [18]. De hecho, los anticuerpos bloqueantes anti-PD-1 se han convertido recientemente en tratamientos de primera línea en tumores de mal pronóstico, como el melanoma avanzado o el cáncer de pulmón [19].

En consecuencia, se analizó la expresión de PD-L1 en las muestras de leucemias, para comprobar si había cambios entre las muestras de leucemias iniciales y sensibles y las muestras posteriores y resistentes. Para ello, se llevó a cabo el marcaje con anticuerpo anti-PD-L1 y se analizó mediante citometría de flujo.



**Figura 8:** Análisis de la expresión de PD-L1 en las muestras de leucemia LLC4, LLC4 tris, LLC7 y LLC7 tris. Las células se marcaron con un anticuerpo anti-PDL1 conjugado con PE y se analizaron por citometría de flujo. La línea vertical indica, en cada caso, el marcaje con un anticuerpo irrelevante, indicando el límite entre marcaje inespecífico y específico. Los números indican el porcentaje de células positivas en cada caso.

Como se muestra en la *figura 8*, se comprobó que la resistencia de las leucemias correlaciona con un aumento en la expresión de PD-L1 llegando a ser del 94% en el caso de la leucemia resistente LLC7 tris. Por lo tanto, ésta podría ser una de las causas por la cual las leucemias se han hecho resistentes a la citotoxicidad de las células NK.

## 5. DISCUSIÓN

Los estudios sobre la biología y funciones de las células NK han permitido que sean consideradas como una importante herramienta de la inmunoterapia antitumoral [2]. En concreto, la utilización de células NK alogénicas con las del paciente está emergiendo como una alternativa prometedora [20]. Nuestros estudios anteriores demostraron que la activación de las células NK con células linfoblastoides EBV<sup>+</sup>, como las R69 o las 721.221 utilizadas en este trabajo, aumentaba la citotoxicidad de estas células tanto sobre líneas células leucémicas [21] como sobre células de pacientes de LLC-B [16]. Sin embargo, en esos estudios no se abordó la expansión de las células NK, necesaria para poder tratar pacientes en la clínica y éste ha sido el objetivo del trabajo.

En primer lugar, se ha optimizado un protocolo de expansión en presencia de IL-2+IL-15 y de células estimuladoras 721.221, células linfoblastoides EBV<sup>+</sup> y negativas para la expresión de HLA-I. Además, se ha comprobado que la adición de interferón  $\alpha$  no aumenta la tasa de proliferación ni la citotoxicidad de las células NK sobre la obtenida con IL-2+IL-15. Por otra parte, en este trabajo se ha comprobado que, en 20 días, se consigue una potente expansión de las células NK, llegando a obtener valores de 144,24 veces de expansión en relación a las existentes a día 0 y una media de expansión de 70 veces. Se calcula que para tratar a un paciente de una neoplasia hematológica se necesitarían  $50 \cdot 10^6$  células NK/kg y, hasta el momento, estos tratamientos se hacían con un pool de diferentes donantes. Con la tasa de expansión media obtenida, bastaría con partir de  $50 \cdot 10^6$  células NK procedentes de un solo paciente (que se pueden obtener de medio litro de sangre) para poder tratar a un paciente de 70 kg con células NK expandidas procedentes de un solo donante.

Las células NK pueden dividirse en dos poblaciones: CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup>, tal y como se ha descrito en la introducción. Como se observa en las *figuras 4 y 6*, se han producido cambios en el fenotipo de las células NK. A día 0, las células son NK CD56<sup>dim</sup> mientras que a día 15 o día 20, las células NK obtenidas son mayoritariamente CD56<sup>bright</sup>. Sin embargo, estas células han aumentado su potencial citotóxico en aparente contraposición con el paradigma de que las células CD56<sup>bright</sup> son reguladoras y no tienen gran capacidad citotóxica [5]. En realidad, lo que parece ocurrir es que durante la expansión y activación de las células NK, el nivel de expresión de CD56 aumenta, así como su capacidad citotóxica, de forma que estas células NK expandidas no se corresponden con el fenotipo clásico de las células CD56<sup>bright</sup> que, por otra parte, se generan in vivo durante las respuestas inmunitarias.

Tras llevar a cabo la expansión y activación de las células NK, se procedió al ensayo de éstas sobre células de pacientes de LLC-B. Como puede observarse en la *figura 6*, cuatro de las siete muestras analizadas (LLC2, LLC3, LLC5 y LLC6) resultaron sensibles al tratamiento de las células NK *in vitro*, obteniendo porcentajes de muerte celular

superiores al 30% en todos los casos. Cabe destacar que esta citotoxicidad es elevada, ya que los ensayos se realizaron a tiempos cortos, de solo 4 horas. Estos resultados apoyan la posible utilización de estas células NK alogénicas y expandidas en el tratamiento de la LLC-B. Esto es especialmente interesante dado que las células de las LLC-B no son sensibles a las células NK del propio paciente [5].

Por otra parte, tres de las muestras de LLC-B analizadas (LLC1, LLC4 tris y LLC7 tris) resultaron resistentes a la acción citotóxica de las células NK activadas. Esto llevaría a pensar que han podido adquirir determinadas mutaciones, las cuales les proporcionan nuevas características, impidiendo ser detectadas por las células NK o inhibiendo su actividad. Por ello, sería necesario realizar estudios posteriores analizando las mutaciones más frecuentes en LLC-B de mal pronóstico.

En estudios previos, habían sido analizadas muestras de LLC-B de dos de estos pacientes: LLC4 y LLC7, y ambas resultaron sensibles a células NK expandidas de otros donantes. Tratando de encontrar una explicación a esta resistencia, se descongelaron las células NK, que se habían ensayado sobre las muestras iniciales de LLC4 y LLC7 y se ensayaron sobre las nuevas muestras de estos pacientes (LLC4 tris y LLC7 tris), observándose que el porcentaje de muerte también era inferior. Estos resultados indican que la causa de la resistencia no era la expresión de KIR compatibles con el HLA-I de las leucemias en las células NK del experimento 2 descrito en este trabajo, sino más bien una propiedad intrínseca que las leucemias LLC4 tris y LLC7 tris habían adquirido con el tiempo.

Tras estos resultados, se analizó la expresión de PD-L1, molécula de superficie que, tras ligación a PD-1 en la superficie de los linfocitos T o las células NK, es capaz de inhibir su actividad antitumoral [22]. Se comprobó como la expresión de PD-L1 había aumentado notablemente en las muestras resistentes, determinando que la resistencia adquirida se correlaciona con un aumento en la expresión de PD-L1 en la superficie de las células de LLC-B. Por tanto, esta podría ser una de las causas de desarrollo de resistencias frente a las células NK. Si se confirman estos resultados en muestras de más pacientes, la combinación de células NK expandidas con los anticuerpos bloqueantes anti-PD-1 que ya se están utilizando en la inmunoterapia del melanoma y el cáncer de pulmón, sería eficaz incluso sobre leucemias refractarias.

## 6. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

- 6.1** Se ha optimizado un protocolo de expansión y activación de células NK humanas en presencia de citoquinas (IL-2+IL-15 o IL-2+IL-15+IFN- $\alpha$ ) y de células estimuladoras 721.221, que consigue expansiones que serían compatibles con el tratamiento de un paciente con células NK de un solo donante.
- 6.2** La presencia adicional de interferón  $\alpha$  en el medio de cultivo no presenta un efecto significativo sobre la proliferación y activación de las células NK sobre los obtenido con IL-2+IL-15 en solitario.
- 6.3** De las 7 muestras de LLC-B ensayadas frente a las células NK, 4 de ellas resultaron sensibles a su citotoxicidad garantizando, por tanto, la eficacia de este tratamiento *in vitro* y la posibilidad de su traslación a la clínica.
- 6.4** En dos de las leucemias resistentes, se determinó la expresión de PD-L1 así como en muestras previas de estos mismos pacientes que habían resultado sensibles a las células NK, observándose que la resistencia de las leucemias correlacionaba, en los dos casos, con un aumento en la expresión de PD-L1.
- 
- 6.1** An expansion and activation protocol of human NK cells has been optimized in the presence of cytokines (IL-2+IL-15 or IL-2+IL-15+IFN- $\alpha$ ) and of stimulator cells 721.221, getting expansions which would be compatible with patient treatment with NK cells from a single donor.
- 6.2** The additional presence of  $\alpha$ -interferon in the culture medium does not present a significant effect on the proliferation and activation of NK cells in relation to the results with only IL-2 and IL-15.
- 6.3** Of the 7 B-CLL samples tested against NK cells, 4 of them were susceptible assuring the effectiveness of this *in vitro* treatment and the possibility of its clinical translation.
- 6.4** In two of the resistant leukemias, expression of PD-L1 was analyzed and also in previous samples from the same patients which had been susceptible to NK cells, observing that the leukemia resistance correlated, in both cases, with increased expression of PD-L1.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Anel, A. et al. *Protein kinase C- $\theta$  (PKC- $\theta$ ) in natural killer cell function and anti-tumor immunity*. *Frontiers in immunology*, 2012, 3(187), 1-12.
2. Morvan, M.G. and Lanier, L.L. *NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks*. *Nature Reviews Cancer*, 2016, 16, 7-19.
3. Cho, D. and Campana, D. *Expansion and activation of natural killer cells for cancer immunotherapy*. *The Korean journal of laboratory medicine*, 2009, 29(2), 89-96.
4. Cerwenka, A. and Lanier, L.L. *Natural killer cells, viruses and cancer*. *Nature Reviews Immunology*, 2001, 1(1), 41-49.
5. Sánchez, C.J. et al. *Natural killer cells and malignant haemopathies: a model for interaction of cancer with innate immunity*. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60, 1-13.
6. Chester, C. et al. *Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Co-stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy*. *Frontiers in Immunology*, 2015, 6(601), 1-9.
7. Robertson, M. J. and Ritz, J. *Biology and Clinical Relevance of Human Natural Killer Cells*. *The Journal of The American Society of Hematology*, 1990, 76, 2421-2438.
8. López-Botet, M. et al. *Natural killer cell receptors for major histocompatibility complex class I and related molecules in cytomegalovirus infection*. *Tissue Antigens*, 2004, 63(3), 195-203.
9. Fujimiya, Y. et al. *Direct lymphocytotoxicity against herpes simplex virus infected cells*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1978, 24(9), 1076-1081.
10. Yagita, H. et al. *TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy*. *Cancer science*, 2004, 95(10), 777-783.
11. Cheng, M. et al. *NK cell-based immunotherapy for malignant diseases*. *Cellular & Molecular Immunology*, 2013, 10 (3), 230-252.
12. Long, E. O. et al. *Controlling NK Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition*. *Annual Review of Immunology*, 2013, 31, 227-258.
13. Ghia, P. et al. *Chronic lymphocytic leukemia*. *Oncology Hematology*, 2007, 64(3), 234-246.
14. Byrd, J. C. et al. *Chronic Lymphocytic Leukemia*. *American Society of Hematology*, 2004, 1, 163-183.
15. Comet, N.R. et al. *IFN $\alpha$  signaling through PKC- $\theta$  is essential for antitumor NK cell function*. *Oncoimmunology*, 2014, 3(8), e948705.

16. Sánchez-Martínez, D. et al. *Human NK cells activated by EBV+ lymphoblastoid cells overcome anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in haematological cancer cells*. *Oncoimmunology*, 2015, 4(3), e991613.
17. Saez-Borderias, A. et al. *IL-12-dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor regulates CD94/NKG2C+ NK cell function*. *The Journal of Immunology*, 2009, 182(2), 829-836.
18. Pardoll, D.M. *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. *Nature Reviews Cancer*, 2012, 12(4), 252-264.
19. Ribas, A. *Adaptive immune resistance: how cancer protects from immune attack*. *Cancer discovery*, 2015, 5(9), 915-919.
20. Velardi, A. *Natural killer cell alloreactivity 10 years later*. *Current opinion in hematology*, 2012, 19(6), 421-426.
21. Sánchez Martínez, 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*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2014, 49, 42-52.
22. Sehgal, A. et al. *PD-1 Checkpoint Blockade in Acute Myeloid Leukemia*. *Expert Opinion on biological Therapy*. 2015, 15(8), 1191-1203.