

Trabajo Fin de Máster

Estudio genético de células NK expandidas para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica de células B



Universidad Zaragoza

Daniel Woods

14/09/2017

Director: Alberto Anel

1.	Introducción	7
1.1.	Leucemia linfocítica crónica	7
1.1.1.	Factores de riesgo	7
1.1.2.	Patofisiología	8
1.1.2.1.	Alteraciones cromosómicas	8
1.1.2.2.	Mutaciones puntuales.....	8
1.1.2.3.	Alteraciones de miRNA.....	9
1.1.2.4.	Cambios epigenéticos.....	10
1.1.3.	Señalización del BCR y la célula B.....	10
1.1.3.1.	BCR y leucemia linfocítica crónica.....	11
1.1.4.	Microambiente tumoral.....	12
1.1.5.	Diagnóstico.....	13
1.1.6.	Tratamiento.....	14
1.1.6.1.	Tratamientos sistémicos	14
1.1.6.2.	Nuevos avances.....	16
1.1.7.	Resistencia de LLC	17
1.2.	Terapia con células NK	17
1.2.1.	Células NK.....	18
1.2.2.	Activación de las células NK	19
1.2.3.	Mecanismos de citotoxicidad.....	21
2.	Antecedentes	22
2.1.	Objetivos	22
3.	Materiales y métodos	24
3.1.	Cultivos celulares.....	24
3.1.1.	Células y medios de cultivo.	24
3.1.2.	Condiciones de esterilidad	24
3.1.3.	Mantenimiento del cultivo celular	24
3.1.4.	Contaje y viabilidad celular	25
3.1.5.	Centrifugación celular	25
3.1.6.	Congelación y descongelación	25
3.2.	Obtención de linfocitos de sangre periférica	25
3.3.	Purificación de células NK	26
3.4.	Análisis del haplotipo de HLA-I de células NK y células leucémicas.....	27
3.4.1.	Extracción de DNA genómico	27
3.4.2.	Secuenciación de los genes de HLA-I	28

3.5.	Extracción y análisis de miRNA de células NK	28
3.5.1.	Condiciones de trabajo.....	28
3.5.2.	Extracción de miRNA	29
3.5.3.	Análisis de miRNA.....	29
3.6.	Cuantificación de la concentración y determinación de la pureza del material genético.....	29
4.	Resultados	31
4.1.	Extracción de DNA.....	31
4.2.	Análisis de haplotipos de HLA-I en células de LLC-B y en células NK de donantes sanos	32
4.3.	Análisis de la compatibilidad entre HLA-I de células LLC-B y receptores KIR de células NK.	34
4.4.	Extracción de miRNA	38
4.5.	Análisis de miRNA.....	39
5.	Discusión	40
6.	Conclusiones/ Conclusions.....	42
7.	Bibliografía	44

Resumen / Abstract

La leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B) es un tumor hematológico causado por la acumulación de linfocitos B maduros y tumorales en sangre periférica, médula ósea y órganos linfoides secundarios. Durante muchas décadas para su tratamiento se han utilizado diferentes aproximaciones quimioterapia como agentes alquilantes, análogos de purinas o corticoesteroides. La desventaja de estos fármacos es que presentan una gran cantidad de efectos secundarios, es por ello que se ha intentado investigar la inmunoterapia como un tratamiento más selectivo y efectivo para combatir este tipo de tumores, utilizando por ejemplo anticuerpos contra ciertos antígenos tumorales. Sin embargo se ha generado múltiples resistencias contra estos anticuerpos, es por ello que más recientemente se han propuesto nuevas posibilidades como la utilización de células NK de donantes alogénicos sometidas a un proceso de activación y expansión. Nuestro grupo ha puesto a punto un protocolo de expansión de células NK humanas y estas células activadas y expandidas se han ensayado frente a células de 38 pacientes de LLC-B.

En algunos pacientes se ha observado el desarrollo de resistencias a la citotoxicidad de las células NK expandidas, una causa para explicar esta resistencia podría deberse a la compatibilidad del HLA-I del paciente con los receptores de inhibición KIR de las células NK del donante empleado en cada caso.

El objetivo de este trabajo es determinar si la resistencia generada se debe a este hecho, y así mismo estudiar los cambios producidos en el transcriptoma tras el procedimiento de activación y expansión.

Chronic Lymphocytic Leukaemia of B Cells (CLL-B) is a haematological tumour caused by the accumulation of mature and tumorous B lymphocytes in peripheral blood, bone marrow and secondary lymphoid organs. During several decades, different kinds of chemotherapy were used in its treatment, such as alkylating agents, purine analogues or corticosteroids. The main disadvantage of pharmaceuticals is that they present a large amount of side effects; due to this, immunotherapy has been researched as a more selective and effective treatment to face these types of tumours, for example using monoclonal antibodies against certain tumoural antigens. Nonetheless, multiple resistances have been generated against the mentioned antibodies. Therefore, new types of treatments such as the use of NK cells from allogenic donators, which undergo a process of activation and expansion. This same group of investigation has developed a protocol of activation and expansion of human NK cells, which have been tested against 38 cells of human patients with LLC-B.

In some cases a development of resistances to the cytotoxicity of the expanded NK cells has been observed. An explanation to this phenomenon could be the compatibility of HLA-I of patient cells with the KIR inhibitory receptors of the donor NK cells used in each scenario.

The objective of this essay is to determine whether the resistance is due to this fact or another one, as well as to study the changes produced in the transcriptome after the protocol of activation and expansion.

1. Introducción

1.1. Leucemia linfocítica crónica

La leucemia linfocítica crónica, se califica por la organización mundial de la salud como un trastorno linfoproliferativo en el que se produce la acumulación de células monoclonales neoplásicas de apariencia madura y pequeñas, en sangre, médula ósea y órganos linfoides secundarios, que expresan en su superficie CD5, CD19, CD 23 y con una baja densidad de CD20, resultando en una linfocitosis, infiltración celular en la médula ósea, linfadenopatía y esplenomegalia. [1,2]

Es la leucemia más prevalente en adultos en occidente. El ratio de incidencia es similar en EEUU y Europa, siendo de unos 4-6 casos por cada 100.000 personas al año. Éste se incrementa conforme aumenta la edad, poseyendo el 70% más de 65 años. La edad media de diagnóstico de esta enfermedad se encuentra en torno a los 72 años en análisis de sangre rutinarias. Así mismo, en las últimas décadas se ha diagnosticado un 15% de los casos en pacientes con 55 años o menos, por un mayor número de análisis sanguíneos en pacientes más jóvenes. Destaca también existencia una predisposición sexual, viéndose los varones más afectados que las hembras (hasta dos veces más). [1,2]

1.1.1. Factores de riesgo

En cuanto a los factores hereditarios, un 9% de los pacientes con LLC posee un familiar con esta misma. Los familiares de primer grado poseen hasta 8,5 veces la posibilidad de desarrollar esta enfermedad. Existen SNP identificados en 30 loci que se asocian a LLC familiar. [1]

Así mismo existen numerosas sustancias que pueden aumentar la probabilidad de contraer cáncer por las mutaciones que puedan producir en el genoma. En particular la exposición al agente naranja se ha visto que es un factor de riesgo de padecer LLC, en veteranos del ejército de los estados unidos [2]. Así mismo se cree que pueden existir otros como insecticidas que aumenten igualmente el riesgo de padecer esta enfermedad. Sin embargo no existen evidencias que sugieran que factores dietéticos.

1.1.2. Patofisiología

Existen una serie de las alteraciones genéticas de células LLC, tales como diferentes alteraciones cromosómicas, mutaciones puntuales y alteraciones en el RNA no codificante como el microRNA que genera la transformación tumoral de células B. A continuación se detallan algunas de estos cambios genéticos [2].

1.1.2.1. Alteraciones cromosómicas

Existen cuatro alteraciones cromosómicas comunes, aproximadamente un 80% de los pacientes poseen al menos una de ellas [1,2]. Tres deleciones en el cromosoma 13q14.3 y una trisomía del cromosoma 12. Las tres deleciones son las siguientes:

- Deleción del brazo largo del cromosoma 13 (Del 13q14), es la más común se encuentra en al menos el 50% de los pacientes. Afecta al clúster génico DLEU2–mir-15-16, que regula la expresión de proteínas que regulan la inhibición de la apoptosis o que están involucradas en la progresión del ciclo celular.
- Deleción del brazo corto del cromosoma 17 (del17p13) se encuentra en el 7% de los pacientes, se asocia con la pérdida del gen supresor de tumores TP53.
- Deleción del brazo largo del cromosoma 11 (del11q22-q23) se encuentra en un 18% de los pacientes, se asocia con alteraciones en el gen ATM, que codifica proteínas relacionadas con la reparación del DNA.
- Por último la trisomía 12 se encuentra en 16% de los pacientes, afecta a diferentes genes como pueden ser MDM2, MYF6, etc.

Exceptuando la primera alteración, la más común, son marcadores de una prognosis muy desfavorable, con una alta tasa de mortalidad.

1.1.2.2. Mutaciones puntuales

Existen múltiples mutaciones puntuales, sobre todo en genes que tienen un rol en la reparación del DNA (TP53 y ATM), en el procesamiento de mRNA (por ejemplo SF3B1 y XPO1), modificación de la cromatina (por ejemplo HIST1H1E, CHD2 y ZMYM3), señalización celular (WNT, NOTCH1), vías inflamatorias (MYD88), y genes implicados en la transcripción (ERG2 y BRAF2). La tasa de aparición de estas mutaciones es muy

variable, pudiendo ser hasta un 21% de los pacientes como el caso de una mutación en SF3B1 [2]. En múltiples casos pueden aparecer varias mutaciones en el mismo paciente, empeorando el pronóstico de la enfermedad. En la figura 1 se pueden ver las diferentes vías metabólicas afectadas y las proteínas causantes.

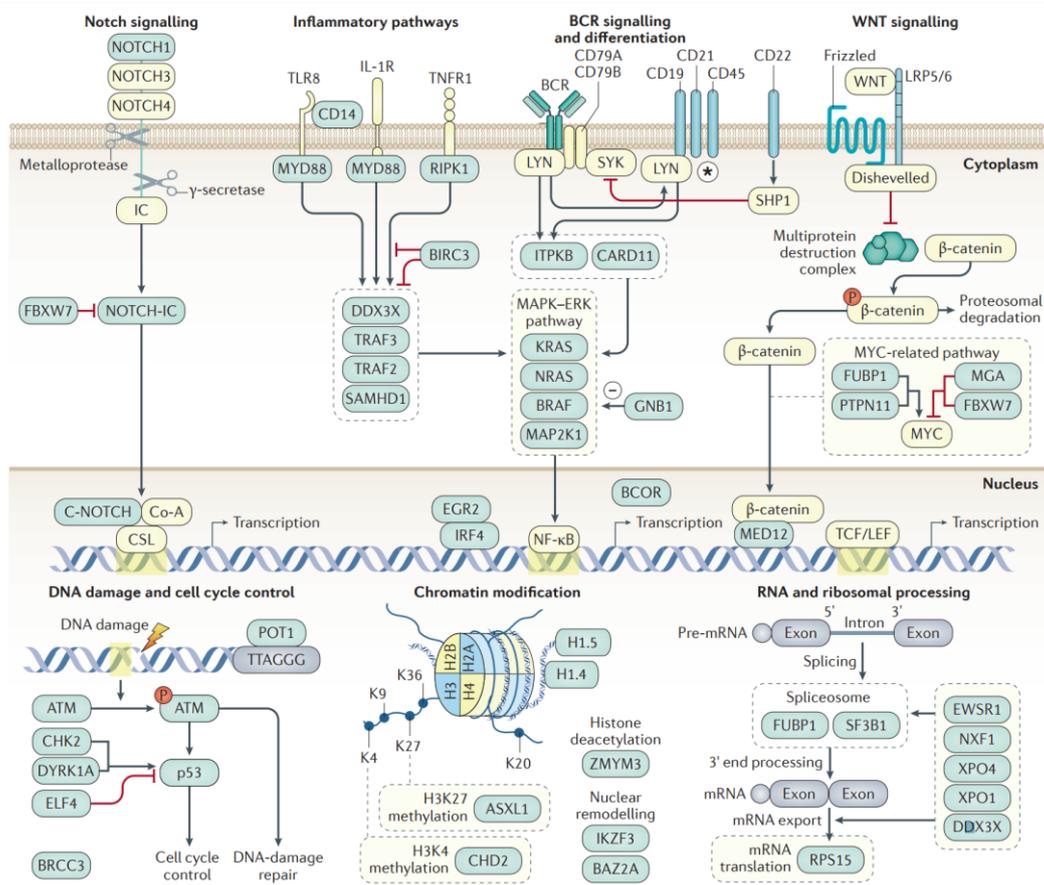


Figura 1: En la imagen se muestran las diferentes vías metabólicas y de regulación génica, junto a los genes efectores. Estos pueden verse afectados por alguna mutación, y por lo tanto la célula se puede tornar tumoral [2].

1.1.2.3. Alteraciones de miRNA

Este tipo de leucemia fue la primera enfermedad humana asociada a una alteración del microRNA (miRNA). Alrededor de 60% de los pacientes posee una alteración, deleción o regulación alterada en varios miRNA, siendo los mir-15a, mir-16-1 especialmente relevantes por su alta tasa de incidencia. Tienen como diana la proteína BCL2, que posee función antiapoptótica. En menor medida existen otros miRNA que pueden encontrarse afectados, sin embargo, su estudio es muy escueto por el momento [2].

1.1.2.4. Cambios epigenéticos

Los pacientes que poseen LLC normalmente presentan una hipometilación combinada con una hipermetilación local, observado igualmente en otros tipos de cáncer. Se cree que está asociado a la capacidad adaptativa evolutiva de este tipo celular, pudiendo aumentar la tasa de mutaciones de los diferentes genes. [1]

1.1.3. Señalización del BCR y la célula B

Las células leucémicas expresan en su superficie el receptor de células B (*B cell receptor*, BCR por sus siglas en inglés), igual que cualquier célula B. Este receptor al unirse con sus diferentes ligandos genera una cascada de señalización que culmina con la activación de varios factores de transcripción como NF- κ B que activan genes necesarios para la supervivencia y funcionamiento de la célula.

El BCR se compone de una molécula de inmunoglobulina transmembrana que permite unir un ligando y un heterodímero de Ig α/β (También llamados CD79A/B). En células leucémicas se coexpresan IgD y IgM, a niveles menores comparando con células B sanas. El mecanismo por el cual ocurre este fenómeno aun es desconocido.

Las moléculas de CD79A y B contienen motivos de activación de tirosina, que pueden ser activadas por fosforilación cruzada, permitiendo entonces la cascada de señalización del BCR. En la mayoría de casos de LLC esta señalización se mantiene constitutivamente permitiendo así a las células B malignificadas sobrevivir, se cree que el ligando es un autoantígeno. Es por ello una diana terapéutica muy importante.

La vía de señalización se esquematiza en la figura 2. En la misma podemos ver diferentes fármacos utilizados para intentar reducir la señalización de este receptor de membrana, provocando que la célula entre en un estado de anergia que culmina con la muerte celular, entre los que destacan el Ibrutinib (inhibidor del BTK) y el Idelalisib (inhibidor del PI3K) [3, 4]], introducidos recientemente en la práctica clínica de la enfermedad.

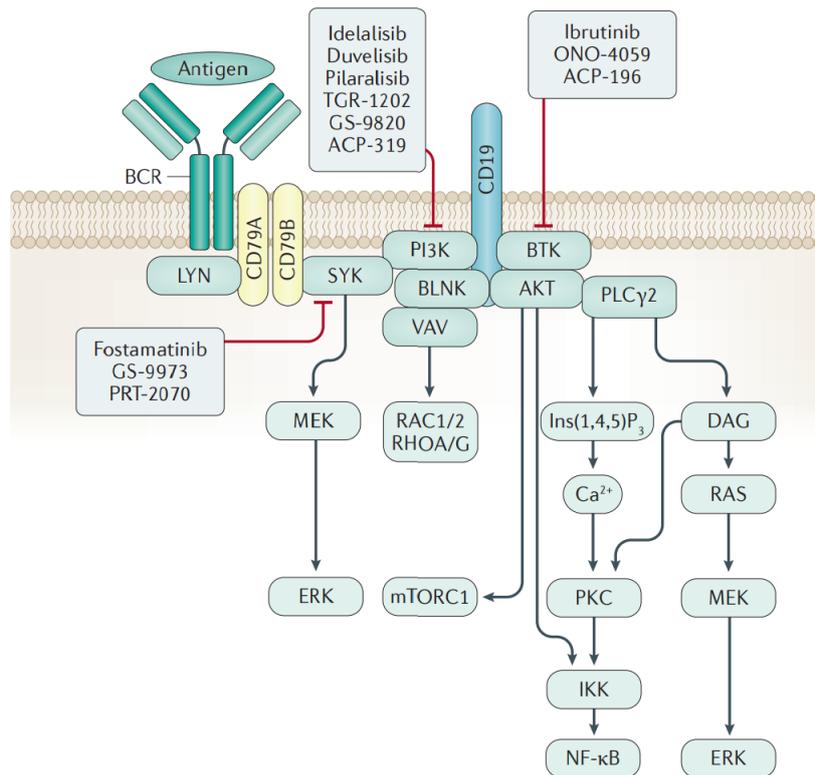


Figura 2 Se muestra la vía de señalización del BCR (B cell receptor), y la cascada de señalización que culmina con la activación de los factores de transcripción NF-κB y ERK, que permiten a la célula sobrevivir [2]

1.1.3.1. BCR y leucemia linfocítica crónica

Existen dos subtipos de LLC que difieren en su comportamiento y cuadro clínico. Se diferencian por la mutación o no de una región variable de la inmunoglobulina, que además refleja el estadio de diferenciación de la célula B sana del que se originan las células tumorales.

Normalmente una LLC con una región variable sin mutación posee una activación de mayor, dado que su funcionalidad no se encuentra comprometida. En el caso de células B con una mutación en la región variable se observa que la actividad del BCR es menor e incluso se puede inducir a que la célula pueda entrar en un estado anérgico, por lo que este tipo de células prolifera en menor medida por una menor señalización del BCR, lo que explica porque los pacientes con una mutación poseen cuadro clínico menos severo [1,2,4,7]

Las células que no poseen una mutación en las regiones variables provienen de una célula B que no se ha sometido al proceso de diferenciación en los centros germinales

de los nódulos linfáticos donde las células B sufren una hipermutación somática en la región de los genes de las inmunoglobulinas variables y selección durante una respuesta inmune.

Por otro lado, los pacientes que poseen células con una mutación en el receptor provienen de una línea de células B post germinales que han sufrido una hipermutación somática, e incluso un cambio de isotipo de inmunoglobulina, en algunos casos tal y como ocurre en las células B sanas durante una respuesta inmune.

También cabe destacar que el repertorio de inmunoglobulinas producidas por las células LLC-B son mucho más limitadas que las producidas por células sanas, reflejando el sesgo usado en ciertos genes de IGHV que poseen una restricción en la mutación somática y en la yuxtaposición de las cadenas pesadas y ligeras (su diversidad). Es por ello que hasta un tercio de los pacientes presentan “estereotipos” de inmunoglobulina, que son identificables en células LLC-B de otros pacientes.

De esto se puede deducir que las células LLC-B son seleccionadas en cuanto a su actividad de unión de su inmunoglobulina de superficie expresada, sugiriendo que el receptor de células B (BCR) tiene un papel fundamental en la patogénesis [2]

1.1.4. Microambiente tumoral

Las células neoplásicas de LLC-B dependen de las señales que reciben de otras células no neoplásicas en el entorno llamado microambiente tumoral. Las células malignas siguen un gradiente de quemoquinas hasta los nódulos linfáticos donde forman centros proliferativos, distintos a los centros germinales normales. En estos centros las células B malignificadas entran en contacto con células estomáticas, nurse like cells, células T y células mesenquimales derivadas de células estomáticas. La unión con el autoantígeno puede ocurrir en este microambiente tumoral, junto a la unión de citoquinas, factores de supervivencia tumorales (por ejemplo TNF), etc., que activan al factor de NF-KB para la supervivencia celular y proliferación antes de entrar al torrente sanguíneo [2]. La activación de este factor además puede aumentar la señalización del BCR, por lo tanto aumentando más aun la proliferación celular. En la figura 3 se puede ver la diferente interacción entre las células neoplásicas y las LLC-B, junto a todas las moléculas que intervienen en este proceso.

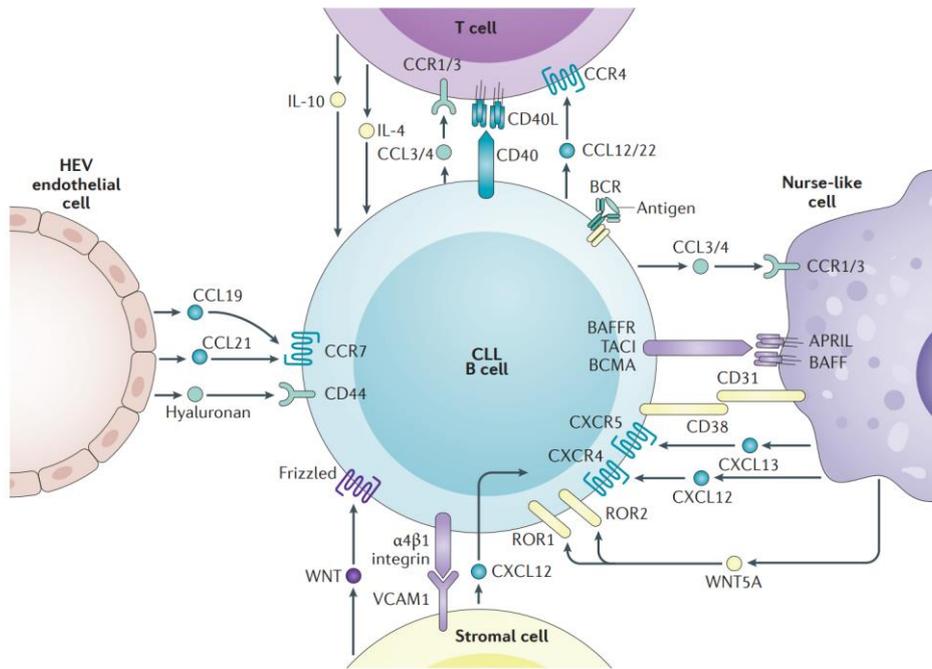


Figura 3: Se muestra la interacción de una célula B con las células de su entorno, entre las cuales se encuentran las Nurse-like cell, las células estromáticas, células T y las células endoteliales. Estas interacciones y permiten a la célula B sobrevivir [2]

1.1.5. Diagnóstico

El diagnóstico de la leucemia linfocítica crónica se lleva a cabo normalmente por análisis de sangre rutinarios, en el que se detectan un elevado número de linfocitos en sangre (al menos 5×10^9 linfocitos B/ Litro en la sangre periférica). Estas muestras de sangre obtenidas se someten a un inmunotipado por citometría de flujo detectando los diferentes marcadores superficiales. Su diagnostica por la diferencia de marcadores de superficie, como se puede observar en la figura 4. En general el diagnóstico tardío produce que el tratamiento para la leucemia se inicie cuando la enfermedad se encuentra en un estado muy avanzado, por lo que se explica el alto índice de mortalidad que posee este tipo de leucemia [2,4]

Por último, también se suele hacer una biopsia de la médula ósea, para determinar así que mutación posee, pudiendo así conocer la gravedad y el tratamiento más adecuado para el paciente.

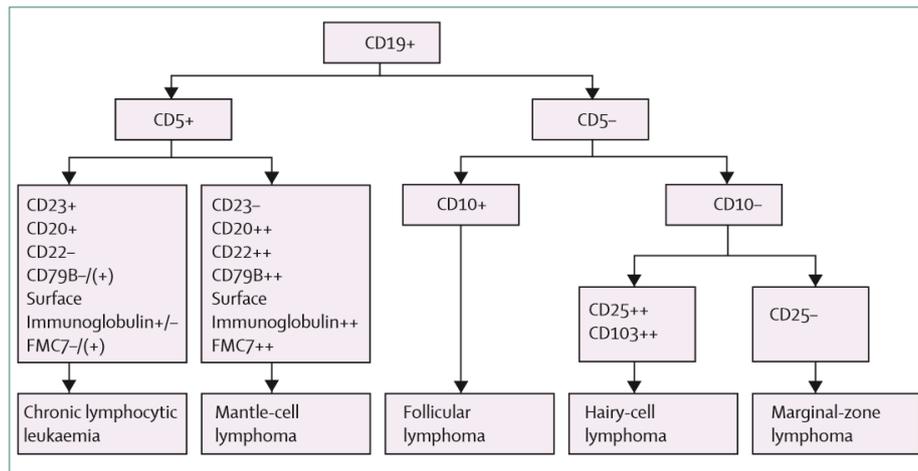


Figura 4: Se muestra el esquema para realizar un diagnóstico diferencial de la leucemia linfocítica crónica. Se realiza mediante la determinación de diferentes receptores de superficie, detectados mediante citometría de flujo. Para determinar que la célula analizada posee un fenotipo concordante con la leucemia linfocítica crónica debe poseer los característicos de tal. [1]

1.1.6. Tratamiento

Durante un gran periodo de tiempo no se obtuvo grandes avances en la terapia tumoral, utilizándose terapias basadas en la radioterapia y la quimioterapia, que son poco selectivas y poseen un amplio número de efectos secundarios. En las últimas décadas se ha investigado nuevas terapias más selectivas con fármacos dirigidos a determinadas vías de señalización o bien basadas en la inmunoterapia,. A continuación, se exponen algunos ejemplos de los tratamientos que se emplean para combatir este tipo de cáncer.

1.1.6.1. **Tratamientos sistémicos**

Los tratamientos tradicionales normalmente se basan en una combinación de quimioterapia, inmunoterapia o drogas que tienen como diana las vías de señalización de proliferación y/o supervivencia de las células B.

1.1.6.1.1. **Quimioterapia**

Es el más antiguo de todos, se utiliza desde hace más de 50 años. Uno de los grupos más importante de quimioterapicos son los análogos de purinas, algunos ejemplos de estos son la fludarabina, cladribina y pentoestatina y los agentes alquilantes, por ejemplo cloromabucil, ciclofosfamida o bendamustina [2,3,4]

Actualmente se está buscando reemplazarlos por los efectos secundarios que poseen, entre los cuales se pueden encontrar la mielosupresión, el riesgo aumentado de infecciones, cánceres secundarios y mielodisplasia.

1.1.6.1.2. Inmunoterapia

Hasta el momento, se ha basado en el uso de anticuerpos monoclonales, más específicos de células tumorales que los tratamientos basados en la quimioterapia, aunque se pueden utilizar en combinación con estos, así como la utilización de anticuerpos conjugados con otro tipo de moléculas.

Uno de los ejemplos más importantes en este ámbito es el rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20), que provoca la activación del sistema inmune contra la célula tumoral [3].

La principal desventaja de estos anticuerpos no conjugados es que es necesario que el paciente posea un sistema inmune competente, ya que sino no se activaran los diferentes mecanismos citotóxicos.

1.1.6.1.3. Inhibidores de la señalización del BCR

Como se ha mencionado anteriormente, esta es otra diana de los tratamientos contra LLC, consiste en la inhibición de la señalización de esta proteína transmembrana con el fin de eliminar las señales necesarias para la supervivencia de la célula, entrando así en un estado anérgico. Cabe destacar que se ha demostrado que las LLC que posean un BCR sin mutación son más sensibles a este tratamiento, dado que poseen la estructura necesaria para que se unan estos fármacos.

Existen principalmente cuatro subtipos [2,3,4], los cuales son:

- Inhibidores de BTK: Ibrutinib, fue el primero aprobado en Estados Unidos por la FDA.
- Inhibidores de PI3K: Algunos ejemplos de estos son idelalisib, duvelisib, TGR-1022 y ACP319. Normalmente idelalisib se utiliza para casos de reaparición de la leucemia.
- Inhibidores de SYK: La mayoría aun se encuentran en desarrollo como puede ser fostamatinib.

1.1.6.1.4. Inhibidores de BCL2

Con este tipo de inhibidores se pretende conseguir la activación de la proteína BCL2 que es proapoptótica, para así inducir la muerte celular. El principal fármaco utilizado es el Venetoclax, una molécula pequeña que mimetiza BH3 para así unirse a BCL2, consiguiendo con ello reducir la capacidad de secuestrar la proteína proapoptótica BIM. Este fármaco es especialmente importante en pacientes con un fenómeno de recurrencia y una deleción en 17p, consiguiendo una efectividad de hasta el 79% con una respuesta completa del 8%, consiguiendo una supervivencia en un tiempo de 12 meses del 87% [4].

1.1.6.2. Nuevos avances

Existen múltiples terapias novedosas, que se encuentran actualmente en ensayos clínicos para tratar diversos casos de cáncer entre los cuales se encuentra la LLC.

Entre los diferentes tratamientos se exponen los más destacables a continuación:

1.1.6.2.1. Drogas inmunomoduladoras

Se encuentran varios fármacos de este tipo aprobados, pero hasta la fecha no se habían utilizado para LLC por su limitada efectividad, como pueden ser thalidomida, lenalidomida. Esta limitación se puede superar utilizando estos fármacos en combinación a un anticuerpo monoclonal anti-CD20 u otros anticuerpos monoclonales que tengan como diana antígenos tumorales presentes en células LLC-B [4].

In vivo la lenalidomida puede inducir la expresión de p21, que inhibe las ciclinas dependientes de quinada y por ende la proliferación celular, también se ha visto que mejora la sinapsis inmunológica por lo que resulta en una mayor efectividad del sistema inmune. Se ha visto hasta un 15% de efectividad completa.

1.1.6.2.2. Inhibidores de puntos de regulación inmunes

Existen una serie de proteínas expresadas en la superficie celular que pueden regular el sistema inmune mediante señales de coestimuladoras o coinhibitorias, se encuentran en células efectoras del sistema inmune, como las células T [4]

Un ejemplo de esto es la proteína PD-1 proteína inhibitoria de células T, que tiene como ligando PD-L1, que se encuentra sobreexpresado en células LLC-B. Es por lo tanto que se han desarrollado anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 y PD-1, con el fin de evitar que las células T se inactiven y puedan provocar una respuesta adecuada contra este tipo celular. Un ejemplo de este tipo de fármaco es Nivolumab, aunque no ha sido aprobado para su utilización en LLC.

1.1.7. Resistencia de LLC

Las células tumorales se caracterizan por poseer una gran cantidad de mutaciones que les permita escapar de la inmunovigilancia y generar una resistencia los tratamientos realizados, como pueden ser en proteínas proapoptóticas (Bak, Bim, Bid, etc), proteínas inhibitoras de la apoptosis (Bcl-2, Bcl-Xl, Mcl-1, etc, que incrementen su función) [2, 4, 7], y mecanismos de escape de la detección por células del sistema inmune como puede ser una expresión reducida del HLA-I [

Son de especial relevancia las mutaciones que afectan a la familia de Bcl-2 (incluidos los reguladores transcripcionales por los miembros de la familia de p-53) en los tumores hematológicos. Se ha detectado en múltiples casos que este tipo de proteínas pueden encontrarse de forma sobreexpresada, por lo tanto produciendo así que las células tumorales, como pueden ser las aparecidas en diferentes cancers hematológicos como pueden ser en linfomas, leucemia mieloide aguda y la leucemia crónica mieloide y la propia leucemia linfocítica crónica.

Para intentar contrarrestar estas resistencias se han utilizado diversas terapias novedosas, anteriormente comentadas, sin embargo no han resultado efectivas por lo que se han propuesto terapias con nuevos enfoques para destruir estas células tumorales, como la utilización de células NK [6,8,10]

1.2. Terapia con células NK

Este tipo de inmunoterapia antitumoral se propuso a raíz de la aparición de muchas resistencias a los tratamientos convencionales, además de ser más selectivo a las células tumorales, y por ende menos dañino para el tejido sano.

El fundamento de este tipo de terapia es la utilización de células NK de donantes, las cuales se extraen, se activan y expanden en un proceso ex vivo, mediante la utilización de células coestimuladoras e interleuquinas [7,10]

Cabe destacar que los pacientes con leucemia linfocítica crónica poseen un mayor número de células NK que un paciente sano en la sangre periférica, como un intento del organismo para compensar la actividad deficiente de los mismos, es decir no son funcionales contra las células leucémicas [2]. Esto es debido a la existencia de varios mecanismos que alteran la citotoxicidad de este tipo celular, como la expresión reducida de receptores de activación, un aumento en los receptores de inactivación o expresión de ligandos defectos de células NK en las células diana. Esta es la razón por la cual se recurre a células NK de donantes [7, 10]

1.2.1. Células NK

Las células asesinas naturales (*Natural Killer*, NK por sus siglas en inglés), pertenecen al sistema inmune, concretamente al innato. Estas células pertenecen al grupo de células linfoides innatas, y se clasifican como linfocitos granulares grandes, y constituyen el tercer tipo de células diferenciadas del progenitor común linfoide (del cual además se generan células B y T). Estas células NK se diferencian y maduran en la médula ósea, nódulos linfáticos, bazo, y en el timo, para pasar luego a la circulación sanguínea. A diferencia de las células NKT, no expresan TCR (T cell antigen receptors) ni CD3. Expresan en su superficie los marcadores celulares CD16 y CD56 [5, 8, 11]

Su modo de acción es análoga a las células citotóxicas (T CD8+) del sistema inmune adaptativo, con la gran diferencia de que pueden eliminar a las células diana de forma independiente al HLA-I, eliminan a células que poseen una expresión reducida del HLA-I (*Human Leukocyte Antigen I*), uno de los genes responsables en la regulación de la respuesta inmunitaria en humanos, que presenta antígenos a las células del sistema inmune debido a alguna infección viral, bacteriana o una transformación tumoral [5, 6]

Las células NK son una población celular heterogénea con diferentes fenotipos y funciones que no solo se limitan a su habilidad citolítica.

Sin embargo la función más importante de estas células es la de eliminar células que se encuentren estresadas, es decir, aquellas que puedan ser tumorales y aquellas que

estén infectadas por algún tipo de virus de una forma rápida antes de que puedan expandirse en el organismo. Al contrario que las células T CD8+ estas no requieren de una activación previa para producir la muerte celular mediante sus diversos mecanismos, por lo que actúan de una forma más rápida.

1.2.2. Activación de las células NK

La activación de las células depende del balance de señalización de receptores de activación e inactivación, de forma que si las señales de activación superan a las señales de inhibición se producirá la activación de los diferentes mecanismos de citotoxicidad de este tipo celular.

Los diferentes receptores de las células NK junto a sus ligandos se muestran en la figura 5. En ella se pueden observar los diferentes ligandos junto a sus receptores conocidos en la célula tumoral y la célula NK.

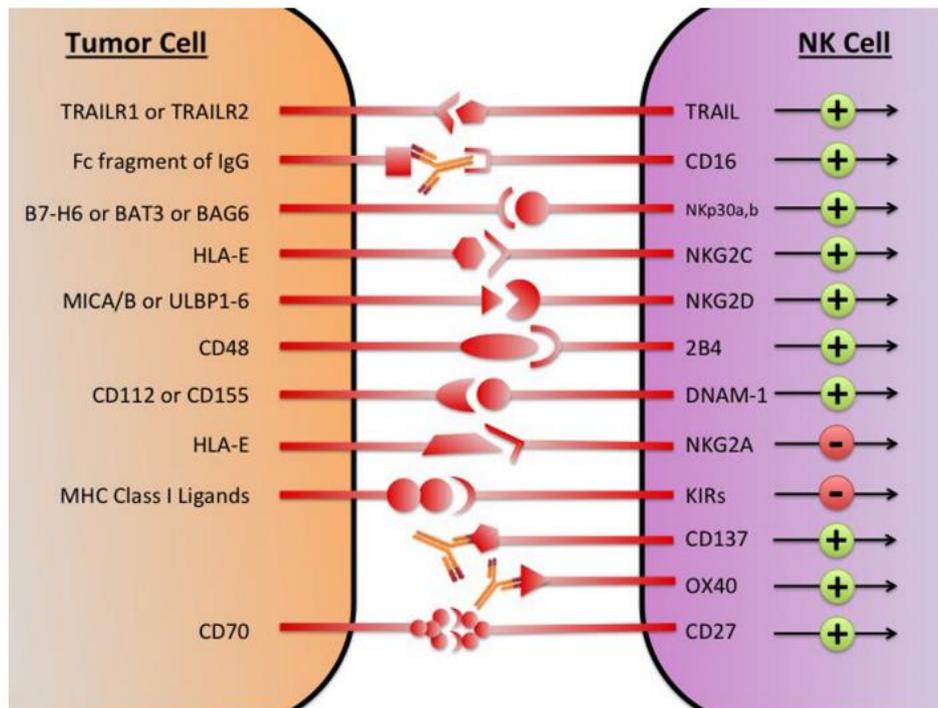


Figura 5 Figura 6 En la imagen superior se muestran la red de interacción de receptores y ligandos que se produce entre una célula diana tumoral y una célula NK. La activación de la célula NK depende del balance entre estos receptores de inactivación (marcados en rojo con un signo negativo) y los de activación (marcados en verde con un signo positivo) [12]

Primeramente encontramos los receptores de activación. Los principales son los receptores NKG2D y NCRs (NKp30, NKp44, and NKp46), que reconocen ligandos de estrés en las células diana. Se tratan de ligandos que indican que la célula se encuentra comprometida, por ejemplo diferentes proteínas víricas, heparina ó proteínas bacterianas [7, 9]

Estos receptores no son independientes entre sí sino que actúan de forma sinérgica. El receptor NKG2D es miembro de la superfamilia de las lectinas de tipo C, se expresa únicamente en algunas subpoblaciones de células T y en células NK. Su papel fundamental es la detección de células infectadas y/o transformadas, como es de esperar sus ligandos no suelen aparecer en tejidos sanos, sin embargo son normales en células estresadas, por lo que es útil en la destrucción de células tumorales [7]

Los receptores tanto de activación como de inhibición dependen de los diferentes ligandos expresados en la superficie celular de la célula diana. Los principales receptores de inhibición son los de la familia KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors*), su diana es el HLA-I de las células diana. Estos receptores, poseen una alta diversidad, existiendo receptores de activación o inhibición (iKIRS), dependiendo de si existe un motivo de inactivación citoplasmático en la estructura del mismo [13, 14, 16]

En células sanas el HLA-I se expresa constitutivamente por lo que las células NK no son reactivas contra las mismas, por la señal inhibitoria producida. Por el contrario en células transformadas en múltiples ocasiones (con el fin de evadir otros mecanismos antitumorales como pueden ser las células T citolíticas) no se expresa, por lo que aumenta la capacidad citotóxica de las células NK contra ellas.

La función biológica del HLA-I es presentar péptidos propios y ajenos para presentarlos en la superficie celular, siendo así reconocidos por células del sistema inmune. Existen múltiples haplotipos de HLA-I (el gen del HLA es uno de los más polimórficos que existen [14,15,16]

Cada haplotipo de KIR reconoce a un haplotipo determinado de HLA-I. Esto es así debido a que se busca una tolerancia inmunogénica a las células propias, pero no a las ajenas. Los KIR de inhibición más importantes, esquematizados en la figura 7, son: KIR2DL2/3, KIR2DL1, KIR3DL1 y KIR3DL2, que reconocen a los HLA-I C1, HLA-I C2, HLA-I

Bw4 y HLA-I A3,A11, respectivamente. Debido a que son los de mayor interés para conocer si existirá una tolerancia inmunológica son los que se suelen analizar [13, 15, 14]

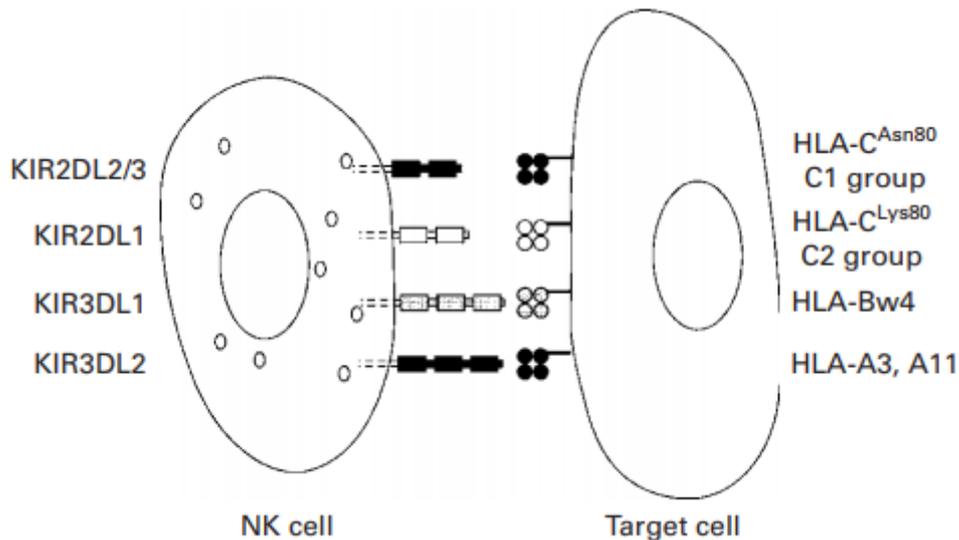


Figura 7 En la imagen superior se puede observar los KIR inhibitorios en la célula NK (izquierda), junto a sus respectivos receptores en la célula diana (derecha) [15]

1.2.3 Mecanismos de citotoxicidad

Si la activación finalmente se produce, la célula NK tiene varias vías por las cuales destruir a la célula diana, de forma análoga a una célula T [5, 7, 8, 12]. La primera de ellas son los receptores mortales, se basa en que la célula NK expresa los ligandos mortales FasL y TRAIL que ligan a sus receptores (Fas, DR4 y DR5) en las células tumorales e inducen su muerte por apoptosis [17].

El segundo de los mecanismos consiste en que la célula NK cuenta con una serie de gránulos citoplasmáticos que contienen perforina y granzimas. La perforina forma poros en la membrana celular, que permiten el paso de las granzimas al interior. Se trata de enzimas proteolíticas que inducen la apoptosis celular [17].

Por último, las células NK activadas producen citoquinas proinflamatorias, principalmente IFN- γ y TNF- α , citoquinas que pueden causar daño directo además de activar a otras células del sistema inmune como las células T CD8+.

2. Antecedentes

En este mismo grupo de investigación se han llevado a cabo ensayos para determinar si es posible la utilización de células NK como terapia contra el cáncer en los casos de leucemia linfocítica crónica.

Para ello se estimularon células mononucleares de sangre periférica (PBL) procedente de donantes sanos 20 días, utilizando interleuquinas IL2 y IL-15, y células coestimuladoras 721.221, línea deficiente en la expresión de HLA-I e inmortalizadas debido por el virus de Epstein-Bar. A final de la expansión, se aislaron las células NK y se utilizaron en ensayos de citotoxicidad sobre células de pacientes con LLC-B.

Los resultados, en su mayoría, fueron positivos con lo cual se concluyó que sería una novedosa terapia para combatir tumores hematológicos, sin embargo en algunos pacientes se observó resistencias a las células NK utilizadas y en dos casos se observó que, mientras las células LLC-B fueron sensibles a las células NK la primera vez que se ensayaron, resultaron resistentes a las células NK de otros donantes un año después.

En un estudio anterior del grupo de Julián Pardo se realizó un estudio del transcriptoma (mRNA y miRNA) de células NK humanas activadas durante 5 días, comparado con células NK de las mismos donantes sin activar. Una observación relevante de ese estudio fue la reducción de miR-23a tras la activación [9] , lo cual resultaba en un aumento de la expresión de Catepsina C, que procesa y activa las granzimas en el interior de los gránulos citotóxicos. Se pretende realizar ahora un estudio similar, pero en este caso en células NK expandidas, que serían las que se utilizarán en la clínica en último término.

2.1. Objetivos

Las resistencias observadas podrían ser debidas a la compatibilidad entre el receptor KIR de células NK y el HLA-I, expresado por las LLC-B o quizá podría ser una propiedad intrínseca desarrollada por las leucemias resistentes.

Así pues con el objeto de confirmar esta hipótesis se han propuesto los siguientes objetivos:

- 1- Extraer y analizar el DNA de las células LLC-B, así como el de las células NK utilizadas para el ensayo los ensayos de citotoxicidad, para analizar el haplotipo de HLA-I que cada una expresa.
- 2- Una vez obtenido el análisis de los haplotipos de HLA-I se deberá comparar el haplotipo obtenido entre ambas líneas celulares en cada ensayo realizado previamente, determinando si existe una coincidencia que justifique aquellos casos en los que se produjo una resistencia.
- 3- Extraer y analizar el miRNA de células NK de donantes, a tiempo cero y tras el protocolo de expansión, para analizar los cambios en estos elementos reguladores que se puedan relacionar con la capacidad antitumoral de las células NK expandidas.

3. Materiales y métodos

3.1. Cultivos celulares

3.1.1. Células y medios de cultivo.

Las células utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

- Muestras de pacientes de LLC-B congeladas.
- Muestras de células NK expandidas congeladas.
- Células NK frescas, o bien aisladas de PBMC de donantes sanos o bien estimuladas y expandidas durante 20 días.

El medio de cultivo utilizados para la descongelación de LLC-B y de células NK es el medio RPMI-1640 (Gibco), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10-20%, glutamax y antibióticos (penicilina y estreptomina).

El medio de cultivo para la expansión de las células NK frescas contiene RPMI 1640 (Gibco) + 10% SFB, suplementado con 100 UI/ ml de IL-2, 25 UI/ ml de IL-5 y células estimuladoras 721.221. En el caso de las LLC-B, el medio de descongelación contiene también 100 UI/ml de IL-4

3.1.2. Condiciones de esterilidad

Al existir una gran variedad de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) en el aire y en las superficies de trabajo, se ha de utilizar medios que garanticen la esterilidad de estos. Para cumplir este fin se trabaja en una campana de flujo laminar que filtra estos microorganismos aéreos, gracias a un filtro de alta eficiencia (HEPA), y alcohol al 70% para la esterilización de las superficies de trabajo, así como la utilización de material previamente esterilizado.

3.1.3. Mantenimiento del cultivo celular

Los cultivos se han mantenido en frascos de cultivo de 150 ml, con tapón hermético con un filtro de 0,2 μm de diámetro que posee el objeto de permitir el intercambio gaseoso sin que se produzca una contaminación por microorganismos. Los recipientes

de cultivos se mantuvieron en una incubadora celular a una temperatura fija de 37° C y un aporte de 5% de CO₂.

3.1.4. Contaje y viabilidad celular

Con el objetivo de determinar el número de células utilizadas en los diferentes ensayos y análisis se empleó una cámara de Neubauer (acoplada a un microscopio óptico a 200 o 400 aumentos) y la tinción con azul de trypan. Este colorante no puede penetrar la membrana celular, es por ello que sólo tiñe células cuya integridad de membrana se ha visto comprometida, por lo tanto células no viables.

La tinción se realizó mezclando en tubos eppendorf, 50 µl de la suspensión celular y 50 µl de azul trypan (consiguiendo una dilución 2:1, con el fin de evitar que una alta concentración dificulte el contaje al microscopio óptico).

3.1.5. Centrifugación celular

En diversos ensayos se requiere de una concentración exacta de células o un pellet celular. Para ello, las suspensiones celulares utilizadas se centrifugaron en tubos Falcon de 15 y 50 mL a 1500 RPM durante 5 minutos, a fin de no dañar las células.

3.1.6. Congelación y descongelación

La congelación celular se llevó a cabo mediante una centrifugación para eliminar el medio de cultivo presente, el cual se sustituyó por medio suplementado con SFB al 10% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%. Esta suspensión se trasvasa a viales de congelación, que son introducidos a un congelador a -80°C para su conservación y posteriormente a un contenedor de N₂ líquido.

En el caso de la descongelación de células, los viales se trasvasan rápidamente a un tubo Falcon con 10 ml de medio RPMI con 10% de SFB. Se centrifuga para eliminar el medio suplementado con DMSO, y sustituirlo por el medio de cultivo, con 10% de SFB.

3.2. Obtención de linfocitos de sangre periférica

Los linfocitos de sangre periférica (PBMC) a partir de los cuales se obtuvieron las células NK se obtuvieron a partir de "Buffy coats" cedidos por el Banco de Sangre y Tejidos de Aragón. Las PBMC se obtuvieron mediante una separación con Ficoll. Este

mezcla celular contiene los linfocitos de la sangre como pueden ser linfocitos B, linfocitos T y células NK así como monocitos circulantes.

3.3. Purificación de células NK

Las células Nk se obtuvieron a partir de PBMC o bien al tiempo 0, o bien tras 20 días de cultivo y expansión en presencia de células estimuladoras 721.221 y de IL-2 más IL-15. Para obtener las células NK, se procedió a utilizar una separación en columna de afinidad basada en una separación magnética, denominada MACS (del inglés *Magnetic-Activated Cell Sorting MIRA REF*).

El fundamento de esta técnica es la utilización de anticuerpos, específicos para cada tipo celular, marcados con esferas magnéticas, de forma que al pasar por una columna de afinidad magnética, se quedarán fijadas aquellas células de interés, eluyéndose las demás. Posteriormente se retira el campo magnético (formando por un imán en el soporte de fijación de la columna) para eluir las células marcadas. Se muestra el esquema de separación en la figura 6.

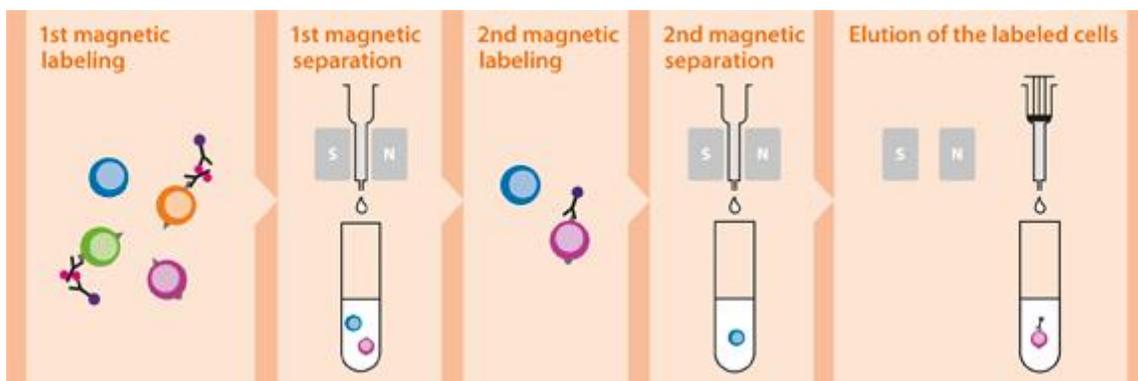


Figura 8 En la imagen superior se muestra el protocolo esquematizado de la separación MACS. En primer lugar se procede a marcar las células de interés con los anticuerpos conjugados con esferas magnéticas. Posteriormente se carga en una columna de separación magnética en presencia de un campo magnético formado por un imán acoplado al soporte de la columna, a continuación se eluyen las células no marcadas, opcionalmente se puede realizar un segundo marcaje. Con el fin de eluir las células marcadas se retira la columna del soporte magnético para permitir la obtención de las células marcadas.

En este caso particular se utilizaron anticuerpos anti-CD56, proteína de membrana característica de las células NK ausente en células T y B. En primer lugar se centrifugaron los linfocitos de sangre periférica o las células expandidas correspondientes. Este pellet se resuspendió en 90 μ l de tampón MACS y 10 μ l de la suspensión con anticuerpos, por cada 10^7 células totales. Se incubó esta mezcla a 4°C durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se añaden 20 ml de tampón para

detener el marcaje. Se centrifuga a 1500 RPM durante 5 minutos, tras los cuales se resuspende el pellet celular formado en 3 ml de tampón MACS. Se carga en la columna, que se encuentra sujeta en un soporte dotado de un imán que genera el campo magnético necesario, realizando tres lavados. De esta forma se obtiene una población celular purificada de células NK marcadas con anti-CD56.

3.4. Análisis del haplotipo de HLA-I de células NK y células leucémicas

Con el objetivo de conocer si existe una compatibilidad entre el haplotipo del HLA-I de las células leucémicas y los receptores KIR de las células NK utilizados en los ensayos de citotoxicidad realizado anteriormente en este grupo de investigación (Tania Calvo, comunicación personal), se procedió a extraer su DNA genómico analizando posteriormente los genes de HLA-I presentes en ambos tipos celulares [18].

Se ha de comentar que no se han analizado los genes KIR de las células NK sino que se supone que si existe un haplotipo determinado de HLA-I en las células de estos donantes, se expresará también su correspondiente ligando KIR para garantizar la tolerancia inmunitaria.

3.4.1. Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se llevó a cabo mediante un protocolo con DNAzol, un reactivo químico compuesto de tiocionato de guanidinio (un agente caotrópico) y detergentes, que hidroliza el RNA y promueve la precipitación selectiva del DNA.

El protocolo que se realizó fue el siguiente, las células congeladas de los ensayos anteriormente comentados se descongelaron siguiendo el protocolo indicado en los archivos adjuntos del reactivo. Una vez preparadas se centrifugaron para obtener un pellet celular. Este pellet se solubilizó mediante pipeteo en 1 ml de DNAzol hasta obtener una lisis completa. Sobre este volumen se añadió 0,5 ml de etanol absoluto, produciendo una precipitación del DNA en forma de ovillo blanco.

La madeja formada se pasó a un nuevo tubo con 1 ml de etanol al 75%, para lavar los posibles restos proteicos que pudiesen quedar. El siguiente paso fue eliminar el sobrenadante mediante pipeteo, sin dejar que se secase el ovillo. Por último se

disolvió este ovillo en una solución acuosa con Tris-HCL 10 mM, pH 8, según la cantidad de material entre 50 μ L y 300 μ L.

El material se guardó hasta su posterior utilización a 4°C para evitar su posible degradación.

3.4.2. Secuenciación de los genes de HLA-I

Los haplotipos de HLA-I y sus receptores KIR se determinaron en el hospital Pùerta de Hierro de Madrid, por el grupo del Dr. Carlos Vilches. El proceso se llevó a cabo mediante una secuenciación PCR-SSCP (del inglés *Single-Strand Conformation Polymorphysim*), en posiciones diana polimórficas.

Este tipo de PCR se fundamenta en la amplificación de una región de interés del DNA, posteriormente se separa en forma de una monohebra. Estas monohebras amplificadas poseerán un mismo número de nucleótidos al ser del mismo gen. Sin embargo los cambios en diferentes nucleótidos producirán una serie de cambios conformacionales. El segundo paso consiste en la separación mediante una electroforesis nativa de estas hebras, permitiendo así detectar los diferentes haplotipos de HLA-I expresados.

3.5. Extracción y análisis de miRNA de células NK

La activación y expansión de células NK en los procedimientos ex vivo anteriormente mencionados cambian el patrón de expresión génica de estas células con el fin de estudiar estos cambios se pretende extraer y purificar el RNA total y el miRNA, que posee funciones regulatorias, de células NK recién asiladas o activadas y expandidas según el protocolo descrito. Seguidamente se pretende analizar comparativamente estas muestras mediante la técnica de RNAseq.

3.5.1. Condiciones de trabajo

El RNA es una molécula mucho más inestable que el DNA, además de que es sensible a la actividad enzimática de las RNAsas ambientales, que pueden encontrarse en la piel del operador y en la superficie de trabajo. Estas enzimas pueden degradar la cadena de RNA, por lo que se ha de trabajar en condiciones semiestériles, evitando las corrientes

de aire que pueden contener RNAsas bacterianas, limpiando las superficies de trabajo con un spray inhibidor de RNAsas (RNAzap away), reactivos y utensilios estériles para evitar contaminaciones.

3.5.2. Extracción de miRNA

El miRNA es un tipo de RNA no codificante pequeño de unas pocas decenas de nucleótidos, que posee función de silenciamiento y regulación génica [9]

La extracción de miRNA se llevó a cabo con el kit comercial *Invitrogen PureLink™ miRNA Isolation Kit*. Se trata de un protocolo basado en la separación mediante columnas de silica gel.

Primeramente se utilizó aproximadamente 1×10^6 células totales de cada línea de NK a analizar. Se centrifugó para formar un pellet celular. A continuación se añadió, a continuación los diferentes buffer del kit tal y como se indica en el protocolo del mismo. En los sucesivos pasos se utilizó una ultracentrífuga para realizar la separación de los componentes de la mezcla mediante las columnas de silica gel adjuntadas. El miRNA, al igual que el RNA, se guardaron en el congelador a -80°C debido a su inestabilidad, para preservarlo el mayor tiempo posible hasta el análisis del mismo.

3.5.3. Análisis de miRNA

El miRNA extraído en los pasos anteriores se está analizando en estos momentos en el servicio de genómica del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), mediante técnicas de RNAseq de secuenciación de nueva generación (NGS)

3.6. Cuantificación de la concentración y determinación de la pureza del material genético.

Una vez obtenidos los diferentes materiales genéticos, es necesario determinar su concentración para los ensayos analíticos posteriores, así como su pureza para cerciorar que no existiesen contaminaciones en la muestra obtenida, que pudiesen interferir en los ensayos anteriormente mencionados.

Para ello se utilizó un espectrofotómetro de tipo “Nanodrop”, que permite cuantificar una muestra de unos pocos microlitros, mediante una espectrofotometría en el entorno ultravioleta.

La pureza se consigue deducir a partir del ratio entre las absorbancias a 260 y 280 nm. Dependiendo del ratio se puede llegar a la conclusión de que pudiese existir alguna contaminación como puede ser algún tipo de fenol o proteínas. Los ratios de pureza para el DNA son de alrededor de 1.8 para el ratio 260/280 nm y para el RNA son de aproximadamente 2 para el ratio 260/280 nm .

4. Resultados

4.1. Extracción de DNA

Con el fin de conocer el haplotipo de HLA-I expresado por las células leucémicas y por las células NK, se ha extraído el DNA genómico de estas células. En la tabla 2 se detallan los resultados obtenidos de las extracciones de las células NK y LLC-B que se habían utilizado en los ensayos de citotoxicidad realizados anteriormente en nuestro grupo. Se analizaron muestras de 23 pacientes de LLC-B y de 9 donantes de células NK.

La cantidad de DNA obtenido ha sido variable, ya que se partía en cada caso de células con una viabilidad variable, y en algunos casos la cantidad es demasiado pequeña para garantizar su análisis óptimo.

La relación 260/280 nm se encuentra en gran número de muestras entre 1.8 y 2.1 lo cual sería aceptable para su posterior análisis, aunque en algunos casos se alejaba bastante de estos valores, indicando que la pureza no sería óptima en estas muestras.

Muestra	Concentración (ng/ml)	Relación absorbancia 260/280
LLC 4	6,4	2,35
LLC 6	108	1,895
LLC 9	61,5	2,159
LLC 12	8,2	2,076
LLC 13	27,5	3,264
LLC 16	117	2,108
LLC 19	207	2,112
LLC 21	50,1	19,32
LLC 23	135	1,901
LLC 25	156	2
LLC 29	64	2,909
LLC 35	194	1,93
LLC 38	114	2,073
LLC 40	161	2,105
LLC 42	318,5	1,913

LLC 43	329	2,172
LLC 44	213	2,162
LLC 45	116	2,252
LLC 53	112,5	3
LLC 55	35,5	3,287
LLC 56	426	1,852
LLC 57	159	2,765
LLC 62	166	2,128
PBL1 E.15	46,5	2,735
PBL2 E.15	26	3,506
PBL1 E.17	183,5	2,265
PBL2 E.17	205,5	1,843
PBL1 E.19	52,5	1,909
PBL3 E.19	43,5	4,244
NK1 E.19	105,5	3,459
NK3 E.19	59,5	3,927
PBL2 E.23BIS	658	1,904
PBL 2 E.24	94	1,825
PBL3 E.24	251	1,992
LLC 29 (Repetido)	310	1,867
PBL1 E.19 (Repetido)	120,5	1,84
LLC 21 (Repetido)	86,5	1,730

Tabla 1 La tabla muestra los resultados de la extracción de DNA genómico de células NK (denominadas como NK o PBL) y de células LLC-B de diferentes pacientes. Se han medido dos parámetros mediante espectrofotometría, el primero de ellos la concentración y el segundo la relación de 260 nm / 280 nm. Este último parámetro es indicador de la pureza del DNA.

4.2. Análisis de haplotipos de HLA-I en células de LLC-B y en células NK de donantes sanos

Los resultados en el análisis de los haplotipos de HLA-I en células de pacientes de LLC-B y en células NK se detallan a continuación en la tabla 3. En primer lugar podemos observar los cuatro tipos de HLA-I, relevantes de cara a la ligación de KIR funcionales, que existen (A3/A11, BW4, C1 y C2) que han sido analizados. En la tabla se indica si

cada tipo de células es positivo o negativo para la expresión de estos haplotipos de HLA-I.

Cabe destacar que en algunas muestras, debido a problemas hallados con la concentración o con la calidad de la muestra no se ha podido analizar correctamente los haplotipos, y por lo tanto se ha marcado con signos de interrogación.

Por ejemplo, no se ha podido obtener resultados válidos para las muestras de células NK (o PBL) del experimento 15 (E.15), en los que la pureza del DNA obtenido no fue óptima (ver tabla 2).

Muestra	C1	C2	Bw4	A3/A11
LLC 6	+	-	+	-
LLC 9	+	-	+	-
LLC 12	+	+	+	¿?
LLC 13	+	+	+	-
LLC 16	+	+	+	-
LLC 19	+	-	+	-
LLC 21	+	+	+	-
LLC 23	+	+	+	-
LLC 25	+	-	+	+
LLC 29	+	-	-	+
LLC 35	+	-	+	-
LLC 38	+	-	+	-
LLC 40	¿-?	+	+	+
LLC 42	¿+?	-	+	-
LLC 43	+	-	+	-
LLC 44	+	-	+	-
LLC 45	+	-	¿?	-
LLC 53	+	-	+	+
LLC 55	+	-	+	-
LLC 56	+	-	-	-
LLC 57	¿?	¿?	¿?	-
LLC 62	+	+	+	-

PBL 1 E.15	¿?	¿?	¿?	¿?
PBL 2 E.15 (Reprec.)	¿?	¿?	¿?	¿?
PBL 1. E.17	+	¿+?	-	-
PBL 2 E.17	+	+	+	-
PBL 1 E.19	+	+	-	+
PBL 3 E.19				
NK 1 E.19	¿?	¿?	¿?	+
NK 3 E.19 (Reprec.)	+	+	¿?	¿?
PBL 2 E.23 bis	+	-	+	+
PBL 2 E.24	+	+	+	-
PBL 3 E.24	+	+	+	-

Tabla 2 En esta tabla se detallan los resultados del análisis del haplotipo del receptor HLA-I en células LLC-B y en células NK (denominadas PBL o NK). La existencia de la expresión de un tipo de haplotipo determinado se indica mediante un símbolo positivo, mientras que si no existe se indica con un signo negativo. Existen casos en los que no se ha podido analizar, marcados con signos interrogantes “¿?” y otros en los que se posee una duda sobre la positividad o negatividad de la expresión “¿+?” o “¿-?”.

4.3. Análisis de la compatibilidad entre HLA-I de células LLC-B y receptores KIR de células NK.

En la tabla 4 se muestran los datos resultantes de la compatibilidad (“match”) o no entre el ligando HLA-I presente en células LLC-B y los posibles receptores KIR de las células NK, utilizadas en los ensayos de citotoxicidad realizados anteriormente. Así mismo, se indica si las células de LLC-B fueron resistentes o no a la citotoxicidad ejercida por las células NK utilizadas en cada experimento (Tania Calvo, comunicación personal). Si la citotoxicidad específica ejercida por las células NK fue superior a un 30% en ensayos de 4 horas se consideraba que las células de LLC-B son sensibles y si por el contrario esta es menor del 30% se consideraba que son resistentes.

La compatibilidad de las diferentes células se produce si todos los haplotipos de HLA-I coinciden entre sí. Si hay alguna variación entre la expresión de alguno de los cuatro tipos de HLA-I relevantes determinados, la combinación se considera alogénica, aunque esta claro que puede haber diferentes grados de incompatibilidad o “mismatch”.

Como puede observarse, no se pudo llegar a conclusiones válidas en el caso de las células usadas en el experimento 15 o en el donante 3 (PBL3) del experimento 19, indicado con un signo negativo “-”.

Teniendo en cuenta los datos considerados válidos se puede observar, tan solo tres de las células leucémicas ensayadas son resistentes al tratamiento con células NK de los diferentes donantes. Se trata de las células leucémicas de los pacientes 16, 23 y 53. Resulta destacable el hecho de que las células de los pacientes 16 y 23, que en un primer ensayo se vio que eran sensibles al tratamiento, adquirieron resistencia en ensayos posteriores, mientras que la leucemia 53 era resistente desde un primer momento.

En cuanto a la compatibilidad observamos que la gran mayoría de casos no existe una compatibilidad de HLA-I de las células leucémicas con los KIR de las células NK de los donantes.

Experimento	NK	LLC	Match	Resistencia
15	PBL1	4	-	No
		6	-	No
		9	-	No
		13	-	No
		21	-	No
		23	-	No
		25	-	No
	29	-	No	
	PBL2	4	-	No
		6	-	No
		9	-	No

		13	-	No
		21	-	No
		23	-	No
		25	-	No
		29	-	No
17	PBL1	6	No	No
		12	No	No
		16	No	No
		35	No	No
		38	No	No
	PBL2	40	No	No
		6	No	No
		12	No	No
		16	Si	No
		35	No	No
	19	PBL1	38	No
40			No	No
42			No	No
43			No	No
PBL3		44	No	No
		45	No	No
			42	-
		43	-	No

		44	-	No
		45	-	No
23 Bis	PBL2	19 Bis	No	No
24	PBL2	16	Si	Si
		23	Si	Si
		53	No	Si
		54	No	No
		55	No	No
		56	No	No
		57	¿?	¿?
	PBL3	16	Si	Si
		23	Si	Si
		53	No	Si
		54	No	No
		55	No	No
		56	No	No
		57	No	No

Tabla 3 Resultados de la compatibilidad de entre los receptores KIR y el ligando HLA-I. Se muestran los experimentos de citotoxicidad en los que se ensayaron estas células. En cada experimento se detalla cuáles fueron las células NK utilizadas y las células LLC-B de los pacientes ensayadas. Por último se indica si existió una resistencia al tratamiento. Marcado en rojo se encuentran los casos relevantes, en los que hubo una resistencia.

En el caso de LLC 16 estas células fueron sensibles a las células NK de los dos donantes del experimento 17. Sin embargo, se da la circunstancia de que estas células estaban en match con el donante 2 (PBL2), aunque no con las del donante 1 (PBL1). Posteriormente (experimento 24), células de este mismo paciente resultaban resistentes a las células NK de los donantes utilizados en ese experimento y se da la circunstancia de que estaban en “match”.

En el caso de la LLC 23, estas células fueron sensibles a las NK utilizadas en el experimento 15 pero no tenemos datos válidos para estas células NK. En un experimento posterior (experimento 24) las células de este paciente fueron resistentes

a las células NK utilizadas y se da la circunstancia de que en esta ocasión las células leucémicas fueron compatibles (estaban en un “match”) con las células NK de esos donantes.

En el caso de LLC 53, que fue resistente a las células NK utilizadas en el experimento 24, no existe una compatibilidad con los KIR expresados por estas células, luego la resistencia ha de ser intrínseca a las células leucémicas.

4.4. Extracción de miRNA

La concentración podría parecer relativamente baja, sin embargo, esto es debido a que la cantidad de miRNA en las células es baja. En cualquier caso, estas cantidades son suficientes para afrontar su análisis por las nuevas técnicas de NGS (*next generation secuencene*). En cuanto a la relación 260/280 nm, ésta se aproxima a la relación óptima de 2 en la mitad aproximadamente de las muestras, aunque se alejaba de este valor en el resto de las muestras, pudiendo indicar la presencia de impurezas anteriormente comentada.

Extracción de miRNA		Concentración ng/mL	Relación 260 nm/ 280 nm
Experimento 1	1 Día 0	4,8	1,765
	1 Día 20	20,4	2,17
	2 Día 0	3,9	1,441
	2 Día 20	4,5	1,9
	3 Día 0	5,9	1,931
	3 Día 20	5,7	0,798
Experimento 2	1 Día 0	2,2	1,598
	1 Día 20	17,2	1,493
	2 Día 20	3	2,387
Experimento	1 Día 0	53,2	1,752

3	1 Día 20	93,6	1,603
	2 Día 20	7,2	1,607

Tabla 4 En la tabla superior se exponen los resultados de la extracción de miRNA a partir de células NK. Se trata de tres experimentos en los que se ha utilizado célula NK antes de iniciar el protocolo de activación y expansión (Día 0) y células NK tras este protocolo (Día 20). Se han medido dos parámetros mediante espectrofotometría, el primero de ellos la concentración. El segundo la relación de 260 nm / 280 nm. Este último parámetro es indicador de la pureza del miRNA.

4.5. Análisis de miRNA

El análisis del microRNA nos permitiría conocer los genes objetivos de estos reguladores post transcripcionales, y por lo tanto qué cambios se producen en la célula NK tras su expansión y activación.

La secuenciación se está llevando a cabo en estos momentos en el servicio de Genómica del CIBA.

5. Discusión

La utilización de células NK activadas y expandidas podría ser una alternativa para el tratamiento de leucemias, especialmente aquellas refractarias a otros tratamientos [11]. Nuestros datos previos, así como los de otros grupos [8], indican que esta opción sería viable en el caso de la LLC-B.

En nuestros estudios anteriores, aunque el 80% de las células de pacientes de LLC-B ensayadas se mostraron sensibles a las células NK, aparecieron algunas células resistentes al tratamiento. Es por ello que se ha tratado de elucidar la causa de estas resistencias, en concreto el haplotipo de las células LLC-B y las células NK para deducir si la resistencia podría deberse a la compatibilidad entre los HLA-I de las células leucémicas y los receptores de inhibición de las células NK utilizadas en los ensayos de citotoxicidad realizados previamente.

En la mayor parte de los casos se pudo realizar correctamente la secuenciación del HLA-I, trabajo realizado en el laboratorio del Dr. Carlos Vilches, Hospital Puerta de Hierro, Madrid, uno de los mayores expertos mundiales en ese tipo de análisis.

En los resultados que se han podido obtener se ha observado que la mayoría ensayos no existe una compatibilidad de HLA-I / KIR entre las células leucémicas de los pacientes y las células NK de los donantes. Esto correlaciona con una notable capacidad citotóxica de las células NK sobre las células leucémicas, lo cual es una prueba de concepto de la viabilidad de esta aproximación terapéutica, sin embargo en algunos casos se ha observado una resistencia.

Como se ha podido determinar en los resultados, en el experimento 17 fueron sensibles las células LLC-B del paciente 16 a la capacidad citotóxica de las células NK del donante 2, a pesar de que poseía un “match” con las células del donante. En cuanto a las células LLC-B del paciente 23, ocurre que en el primer ensayo de citotoxicidad (experimento 15) fueron sensibles al tratamiento, sin embargo no se poseen datos válidos para determinar si existe una compatibilidad entre los dos tipos celulares.

En un experimento posterior (experimento 24) ambas las células de los pacientes 16 y 23 poseen un “match” con las células NK de ambos donantes, siendo resistentes a la

citotoxicidad de las mismas en ambas ocasiones. Sin embargo, el hecho de que las células LLC-B del paciente 16 fueran sensibles al tratamiento en el experimento 17 a pesar del “match” observado, nos induce a pensar que la resistencia o no al tratamiento se puede deber a una combinación de múltiples factores, además del “match”.

Por último observamos el caso del paciente 53, en el que también ha aparecido una resistencia al mismo tratamiento, sin embargo en este caso no existe un emparejamiento entre el receptor y su ligando, por lo que la resistencia generada se debe a otro mecanismo aún no conocido.

Para obtener un resultado concluyente se debería de repetir los ensayos de citotoxicidad con células NK que posean un haplotipo de HLA-I diferente a las células ensayadas, con el fin de determinar que la resistencia aparecida no se deba a este fenómeno de emparejamiento. De hecho, en un trabajo paralelo, se demostró que las muestras descongeladas de los pacientes 16 y 23 obtenidas en la segunda extracción al paciente (momento del experimento 24) eran más resistentes a las células NK descongeladas del experimento 15 y del experimento 17, respectivamente, que las células originales descongeladas de estos pacientes, indicando la existencia adicional de mecanismos de resistencia intrínsecos a las células leucémicas. Uno de los mecanismos de resistencia podría ser debido al aumento considerable en la expresión de PD-L1 en las células leucémicas resistentes (TFM María Gascón).

Se debe de investigar más sobre este fenómeno, así como repetir los experimentos con el objetivo de tener resultados estadísticamente relevantes para obtener una conclusión válida sobre la causa de la resistencia en estos casos, empleando preferiblemente células que posean un haplotipo diferente a las células efectoras, para descartar que se deba a un emparejamiento del receptor KIR y el ligando HLA-I.

El análisis del miRNA aún no se ha podido realizar a día de hoy por falta de tiempo. Se deberían de poder observar los cambios a nivel de regulación transcripcional generados y ver si se confirman los resultados anteriores obtenidos [9] o si se detectan diferencias en el caso de las células NK expandidas durante 20 días en comparación con los observados en ese estudio en células NK activadas durante 5 días, lo cual daba lugar a su activación funcional, pero no tanto a su expansión.

6. Conclusiones/ Conclusions

Las conclusiones que se han podido obtener en el desarrollo y resultados de este trabajo son enumerados a continuación:

1. Se ha realizado una extracción del DNA genómico de células NK y de células de pacientes de LLC-B que se habían enfrentado previamente en ensayos de citotoxicidad, resultando parcialmente exitoso el aislamiento, y se ha analizado el DNA obtenido para obtener el haplotipo de HLA-I y de KIR.
2. Tras los análisis de los HLA-I expresados por estas células, se ha observado que de tres casos de resistencia de células LLC-B a estas células NK activadas, existía compatibilidad con las células NK utilizadas en dos de ellos. Sin embargo, las células de uno de esos pacientes de LLC-B no había mostrado resistencia a células NK de otro donante con el que también mostraba compatibilidad.
3. Estos datos indican que, si bien la compatibilidad entre los HLA-I expresados por las células de pacientes de LLC-B y los KIR de células NK activadas contribuye en parte a las resistencias observadas, debe existir otros factores intrínsecos a las células leucémicas que pueden contribuir al fenómeno observado.
4. Se ha extraído miRNA procedente de células NK no activadas y de células NK de los mismos donantes expandidas durante 20 días, se ha comprobado su pureza y se ha enviado a secuenciar.

The conclusions that could have been obtained during the development and results of this essay are listed below:

1. Genomic DNA from NK cells and the LLC-B patients cells that were tested against cytotoxicity tests has been extracted, with partial exit. The obtained DNA was analysed to obtain the haplotype of HLA-I and KIR.
2. After the analysis of the HLA-I shown by these cells, it was observed that, out of the three cases of LLC-B cells resistant to activated NK cells, two of them showed compatibility with the used NK cells. Nevertheless, the cells from one of these LLC-B patients have not shown resistance to the NK cells from another donor with whom he showed compatibility.
3. These data indicate that, even though the compatibility between the HLA-I expressed by the LLC-B patients cells, and the KIR from activated NK cells contributes to part of the observed resistances, there must be other intrinsic factors to leukaemic cells that can contribute to the observed phenomenon
4. miRNA from inactivated NK cells and NK cells obtained from the same patients expanded for 20 days was extracted. Its purity has been verified and it has been sent to sequence.

7. Bibliografía

- 1- G Dighiero, et al "Chronic lymphocytic leukaemia" The Lancet, volumen 371, páginas 1017-1029. (2008)
- 2- Thomas J. Kipps, et al. "Chronic lymphocytic leukaemia" Nature Reviews, volume 3, páginas 1-22 (2017)
- 3- Paola Picardi, et al. "Monoclonal Antibodies in Chronic Lymphocytic Leukemia" Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemias, volumen 1, páginas 1-11 (2016)
- 4- Nitin Jain, et al. "Targeted therapies for CLL: Practical issues with the changing treatment paradigm" Blood Reviews, volumen 30, páginas 233-244. (2016)
- 5- Eric Vivier, et al. "Functions of natural Killer cells". Nature Immunology, volumen 9, páginas 503-510 (2008)
- 6- Maxim Shevtsov, et al. "Immunological and translational aspects of NK Cell-based antitumor Immunotherapies" Frontiers in Immunology, volumen 11, páginas (2016)
- 7- Diego Sánchez-Martínez, et al. "Human NK cells activated by EBV+ lymphoblastoid cells overcome anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in haematological cancer cells" OncoImmunology, volumen 4, pag 210-220 (2015)
- 8- Diego Sánchez-Martínez, et al. "Activated Allogeneic NK Cells Preferentially Kill Poor Prognosis B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells" Frontiers in Immunology, volumen 7 (2016)
- 9- Diego Sánchez-Martínez, et al. "All-trans retinoic acid (ATRA) induces miR-23a expression, decreasesCTSC expression and granzyme B activity leading to impaired NK cellcytotoxicity" The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, volumen 49, páginas 42-52 (2014)
- 10- Sánchez, C.J. et al. "Natural killer cells and malignant haemopathies: a model for interaction of cancer with innate immunity" Cancer Immunol Immunother volumen 60, páginas 1-13 (2011)
- 11- Morvan, M.G. et al. "NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks." Nature Reviews Cancer, volumen 16, páginas 7-19. (2016)

- 12- Cariad Chester, et al. "Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Co-stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy" *Frontiers in Immunology*, volumen 6, (2015)
- 13- Alberto Anel, et al. "Protein kinase C- θ (PKC- θ) in natural killer cell function and anti-tumor immunity" *Frontiers in Immunology*, Volumen 3, artículo 187 (2012)
- 14- Peter Parham "MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival" *Nature Reviews*, volumen 5, paginas 201-214 (2005)
- 15- HJ Symons "Hematopoietic SCT from partially HLA-mismatched (HLA-haploidentical) related donors" *Bone Marrow Transplant*, volumen 42, paginas 365-377 (2008)
- 16- Danillo G. Agosto, et al. "KIR and HLA under pressure: evidences of coevolution across worldwide populations" *Hum Genet*, volumen 134, páginas 929-940 (2015)
- 17- Luis Martínez-Lostao, et al. "How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells?" *Clinical Cancer Research*, volume 21, paginas 5047-5056 (2015)
- 18- C. Vilches, et al. "Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSCP method that amplifies short DNA fragments" *Tissue Antigens*, volumen 70, paginas 415-422 (2007)