



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

INMUNOTERAPIA DE LA LEUCEMIA
LINFÁTICA CRÓNICA DE CÉLULAS B
CON CÉLULAS NK EXPANDIDAS

IMMUNOTHERAPY OF CHRONIC
LYMPHATIC LEUKEMIA OF B CELLS
WITH EXPANDED NK CELLS

María Gascón Resano

Director: Alberto Anel Bernal

Facultad de Ciencias

2017

ÍNDICE

RESUMEN/ ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. SISTEMA INMUNITARIO	2
1.1.1. RESPUESTA INMUNITARIA INNATA.....	2
1.1.2. RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA.....	2
1.2. CÉLULAS NK	3
1.2.1. MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD.....	4
1.3. APOPTOSIS	6
1.3.1. VÍA EXTRÍNSECA	6
1.3.2. VÍA INTRÍNSECA.....	6
1.4. CÁNCER	7
1.4.1. MARCADORES DEL CÁNCER	8
1.4.2. METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN LAS CÉLULAS TUMORALES.....	8
1.4.3. DICLOROACETATO (DCA).....	8
1.5. LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA DE CÉLULAS B (LLC-B)	9
1.6. INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL.....	9
1.6.1. UTILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS NK EN TERAPIA ANTITUMORAL	10
1.6.2. ANTICUERPOS BLOQUEANTES ANTI-PD-1.....	10
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. CULTIVOS CELULARES.....	13
3.1.1. LÍNES CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO	13
3.1.2. CONDICIONES DE ESTERILIDAD	13
3.1.3. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR	13
3.1.4. CONTAJE Y VIABILIDAD CELULAR	13
3.1.5. CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS	13
3.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS NK ACTIVADAS Y EXPANDIDAS	14
3.2.1. CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD EN FICOLL-PAQUE	14
3.2.2. ELIMINACIÓN PARCIAL DE LINFOCITOS T MEDIANTE LA TÉCNICA DE MACS.....	14
3.2.3. ACTIVACIÓN Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS NK.....	15
3.2.4. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN Y DE LA EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	15
3.2.5. AISLAMIENTO DE CÉLULAS NK Y MARCAJE CON “CELL TRACKER GREEN”	16

3.3.	ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.....	16
3.4.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PD-1 EN LAS CÉLULAS NK	17
3.5.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE EN CÉLULAS DE PACIENTES DE LLC-B.....	17
3.6.	EFFECTO DEL DCA SOBRE LAS CÉLULAS DE PACIENTES DE LLC-B	18
4.	RESULTADOS	20
4.1.	DESARROLLO DE RESISTENCIAS A LAS eNK EN PACIENTES DE LLC-B	20
4.2.	PACIENTES DE LLC-B	21
4.3.	ANÁLISIS DE MARCADORES EN LLC-B RESISTENTES.....	21
4.3.1	EXPRESIÓN DE LIGANDOS DE NCR	22
4.3.2	EXPRESIÓN DE HLA-E.....	23
4.3.3	EXPRESIÓN DE HLA-ABC	24
4.3.4	EXPRESION DE PD-L1	25
4.4.	EXPRESIÓN DE PD-1 EN LAS CÉLULAS NK.....	26
4.5.	EFFECTO DEL DCA EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES EN LLC-B	27
4.5.1	EFFECTO DEL DCA EN LA EXPRESIÓN DE HLA-E	28
4.5.2	EFFECTO DEL DCA EN LA EXPRESIÓN DE HLA-ABC.....	28
4.5.3	EFFECTO DEL DCA EN LA EXPRESIÓN DE PD-L1.....	29
4.6.	EFFECTO DEL DCA EN LA VIABILIDAD Y CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS DE LLC-B	30
4.7.	ANÁLISIS DE LA MUESTRA DE LLC-B DEL PACIENTE 1 DE 2017 (LLC Pac.1 (2017))	31
4.7.1	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1	32
4.7.2	ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD EN PRESENCIA DE eNK.....	32
5.	DISCUSIÓN	34
6.	CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS	39
7.	BIBLIOGRAFÍA	41

RESUMEN/ ABSTRACT

El empleo de la inmunoterapia como tratamiento del cáncer está adquiriendo gran importancia, convirtiéndose en una estrategia prometedora y en desarrollo. Los estudios y avances en el conocimiento de las células NK hace que se estén convirtiendo en una importante herramienta en la inmunoterapia celular adoptiva. Nuestro grupo ha desarrollado un protocolo de activación y expansión de células NK humanas (eNK), basado en el uso de citoquinas (IL2 + IL15) y de células estimuladoras (721.221) inactivadas, y se han ensayado sobre células de pacientes de leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B). Tras realizar distintos ensayos en presencia de eNK, dos muestras de pacientes de LLC-B fueron resistentes a este tratamiento mientras que muestras anteriores de los mismos pacientes habían resultado sensibles. Con el objetivo de explicar la posible causa de esta resistencia y pensando que podría deberse a una propiedad intrínseca de las células leucémicas adquirida con el tiempo, se ha analizado la expresión de distintos marcadores de superficie de las células de LLC-B, el efecto de la droga metabólica DCA en la expresión de estos marcadores y en ensayos de citotoxicidad, así como el efecto del anticuerpo bloqueante anti-PD1 pembrolizumab. Se observa que los niveles de expresión de los NCR han disminuido mientras que los de PD-L1 aumentan en las muestras resistentes. Así mismo, en presencia de DCA, disminuye la expresión de PD-L1 sin causar ningún efecto tóxico adicional sobre las células de LLC-B.

The use of immunotherapy as a cancer treatment is becoming increasingly important, becoming a promising and developing strategy. Studies and advances in the knowledge of NK cells make them an important tool in adoptive cellular immunotherapy. Our group developed a protocol for the activation and expansion of human NK cells (eNK), based in the use of cytokines (IL2 + IL15) and inactivated stimulating cells (721.221), and they were tested against cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) patients. After performing different tests in the presence of eNK, two samples of patients from B-CLL were resistant to this treatment whereas previous samples of those same patients were sensitive. In order to explain the possible cause of this resistance and thinking that it could be due to an intrinsic property of the leukemic cells acquired over time, we have analysed the expression of different surface markers of the B-CLL cells, the effect of the metabolic drug DCA in the expression of these markers and in cytotoxicity assays, and also the effect of the blocking anti-PD1 antibody pembrolizumab. It has been observed that NCR expression levels have decreased while PD-L1 expression increases in resistant samples. Also, in the presence of DCA, the expression of PD-L1 decreases without causing any additional toxic effect on LLC-B cells.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 SISTEMA INMUNITARIO

El sistema inmune está compuesto por una red de moléculas solubles, citoquinas, proteínas y células que trabajan de manera coordinada para defender al organismo de agentes patogénicos. Existen dos tipos de respuesta inmunitaria: innata y adaptativa [1].

1.1.1 RESPUESTA INMUNITARIA INNATA

La respuesta inmunitaria innata se caracteriza por ser inmediata, inespecífica y de corta duración, llevando a cabo una respuesta rápida contra antígenos extraños. No presenta memoria inmunológica, pero es capaz de distinguir lo propio de lo extraño mediante distintos receptores que reconocen patrones moleculares específicos asociados a patógenos (PAMPS) o a peligro (DAMPS). En la inmunidad innata, también intervienen proteínas solubles bioactivas como las citoquinas, que presentan diversas funciones dependiendo del microambiente y de las células que las secretan, y las proteínas del complemento, que tras su activación pueden producir lisis microbiana, fagocitosis o activación de distintas células. Las células que intervienen en la respuesta inmunitaria innata son principalmente monocitos, macrófagos, células dendríticas y las células NK [1, 2].

1.1.2 RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA

La respuesta inmunitaria adaptativa se caracteriza por presentar memoria inmunológica y ser específica contra un determinado antígeno. Es menos rápida que la respuesta innata, ya que los linfocitos naive deben madurar y diferenciarse a células T efectoras o células B secretoras de anticuerpos. Las células T se diferencian en células T $\gamma\delta$, pequeña subpoblación que puede reconocer moléculas no propias por reconocimiento de patrones, y células T $\alpha\beta$, subdivididas en células T CD4⁺ (linfocitos T helper) y células T CD8⁺ (linfocitos T citolíticos o CTL). Las células B generan anticuerpos o inmunoglobulinas, los cuales son específicos del tipo de respuesta inmunitaria [1, 3].

Aunque estas dos clases de respuesta inmunitaria presentan características distintas, ambas trabajan de manera conjunta. La respuesta innata se inicia en un primer lugar, y si ésta no es suficiente, se necesita de la respuesta inmune adaptativa para ayudar en la eliminación del patógeno y para generar memoria inmunológica. Distintos tipos de células actúan evidenciando la relación existente entre ambos tipos de inmunidad, como son los macrófagos, las células dendríticas o las células NK [1].

1.2 CÉLULAS NK

Las células NK o asesinas naturales, del inglés “natural killer”, pertenecientes al sistema inmunitario innato, son consideradas como un tipo de linfocitos, distintos de las células T y las células B, que presentan citotoxicidad natural contra células infectadas y células tumorales [4-6]. Derivan de precursores hematopoyéticos, representando entre el 5% y el 20% de los linfocitos de la sangre periférica humana y encontrándose en tejidos periféricos, incluyendo el hígado, la cavidad peritoneal y la placenta [5, 7].

Morfológicamente, son similares a los linfocitos granulados y se caracterizan fenotípicamente por la expresión de CD56 y CD16 (receptor del dominio Fc de las inmunoglobulinas G, responsable de la citotoxicidad mediada por anticuerpos o ADCC) y la ausencia de CD3 y del receptor de células T (TCR) [4, 7]. La población de células NK humanas es heterogénea, distinguiéndose dos grupos: las llamadas CD56^{dim}, que representan el 90% de las células NK humanas circulantes, expresan niveles intermedios de CD56, pero elevados niveles de CD16, siendo las responsables de la función citotóxica, tanto natural como mediada por anticuerpos (ADCC). Por otra parte, las llamadas CD56^{bright} corresponden al 10% de las células NK circulantes y son las encargadas de una función principalmente inmunorreguladora, mediante la secreción de citoquinas [7, 8]. Las células NK CD56^{bright} son más abundantes en los órganos linfoides [9, 10].

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 se ha observado en diferentes tumores tanto de origen hematopoyético como no hematopoyético. La infiltración de células NK en tejidos tumorales está asociado con un mejor pronóstico mientras que la baja citotoxicidad de éstas en la sangre periférica se ha relacionado con un mayor riesgo de cáncer. Por ello, se han desarrollado distintas estrategias terapéuticas basadas en las células NK [6, 11].

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). Distintas observaciones dieron lugar a la hipótesis de “pérdida de lo propio”, del inglés “missing self”, según la cual las células NK podían eliminar células tumorales deficientes en MHC-I. Mientras que la falta o la baja expresión de este complejo estaría activando a las células NK, niveles normales de MHC-I las inhibiría, siendo la citotoxicidad de éstas inversamente proporcional a la expresión de MHC-I (o HLA-I en humanos) en la célula diana [12, 13]. 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 [13]. 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 [14, 15].

1.2.1 MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD

Las células NK maduras son caracterizadas morfológicamente como linfocitos granulares, ya que presentan gránulos citoplasmáticos que se asemejan a lisosomas secretores. El primer mecanismo de citotoxicidad está basado en la exocitosis de estos gránulos, tras la formación de una sinapsis inmunológica. Los gránulos citotóxicos contienen perforina (proteína de membrana que perfora la membrana de la célula diana) y granzimas (familia de serín-proteasas). Por lo tanto, al liberarse el contenido de los gránulos, la perforina permite la entrada de las granzimas en el citoplasma de la célula diana, induciendo su muerte [11, 16, 17].

Por otra parte, las células NK también son capaces de matar células tumorales mediante el empleo de moléculas de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), como FasL o TRAIL, que interaccionarán con sus respectivos receptores en las células tumorales. Esto conlleva a la muerte por apoptosis dependiente de la activación de caspasas [11, 17, 18].

Además, la secreción de distintas moléculas efectoras por parte de estas células, como interferón γ (IFN- γ), presenta efectos antitumorales ya que restringe la angiogénesis del tumor y estimula la inmunidad adaptativa [2].

Las células NK tienen una actividad citolítica dual, presentando un mecanismo de citotoxicidad natural y un mecanismo de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) [13].

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC)

La ADCC es entendida 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, activando así los mecanismos descritos anteriormente.

Este mecanismo tiene cierta importancia en el tratamiento de tumores sólidos o hematológicos con anticuerpos monoclonales (mAB) [11].

Citotoxicidad natural

La activación de las células NK está mediada por una red de receptores de activación y de inhibición. Muchos de los receptores de inhibición son específicos para moléculas de MHC-I, expresadas en células normales, pero que con frecuencia se ha perdido su expresión en células infectadas o tumorales. Por otra parte, los ligandos de los receptores de activación suelen ser escasos en las células sanas, mientras que su expresión puede verse aumentada en células infectadas o transformadas [19]. Por ello, tanto los niveles de expresión del MHC-I como la presencia o ausencia de los diferentes ligandos de los receptores de activación son de gran importancia en la respuesta [4, 6].

Los receptores de activación son un elemento crucial en la regulación de la función de las células NK. Parece que no existe un receptor de activación dominante, sino que se

necesitan señales de activación sinérgicas. Solo cuando se activan simultáneamente distintos receptores de activación, la señal resultante supera el umbral de activación requerido, desencadenando la respuesta citotóxica. Algunos de estos receptores son los NCRs (NKp46, NKp30 y NKp44) o receptores de la familia de las lectinas tipo C (NKG2D, entre otros) [11].

Los NCRs son una familia de receptores de activación que fueron descubiertos en los años 1990 en las células NK, y que incluyen tres receptores: NKp30, NKp44 y NKp46. NKp30 y NKp46 se suelen expresar de manera constitutiva en todas las células NK, mientras que NKp44 solo es expresado en las células NK activadas [16]. El bloqueo con anticuerpos de uno o varios de estos receptores inhibe con frecuencia la capacidad de las células NK para matar a células tumorales [19].

El receptor homodimérico NKG2D es miembro de la superfamilia de las lectinas de tipo C y se expresa en células NK, en linfocitos T CD8⁺ activados y, en algunos casos, también en los linfocitos T CD4⁺. Interviene en la respuesta inmunitaria relacionada con el cáncer, la infección y la autoinmunidad, presentando una función importante en la vigilancia inmunitaria de los tumores. Se han identificado numerosos ligandos, pero raramente se expresan en tejidos sanos. Sin embargo, sí son inducidos por el “estrés” celular debido a transformación o infección viral, por lo que las células tumorales expresan ligandos de NKG2D con frecuencia [19, 20].

En relación a los receptores de inhibición, la familia de receptores KIR es el grupo dominante. Los diferentes tipos de estos receptores interaccionan con diversos haplotipos HLA-A, -B o -C. La expresión del HLA-I en las células sanas proporciona la señal inhibitoria que evita la inducción de una respuesta autoinmunitaria por parte de las células NK. Sin embargo, si no hay interacción KIR-HLA-I, tendrá lugar un aumento en la capacidad citotóxica de las células NK [11].

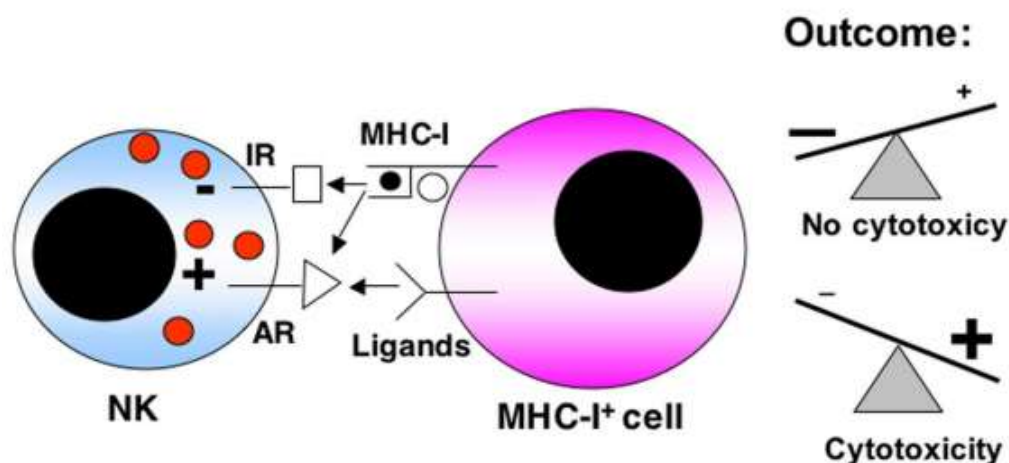


Figura 1: balance de las señales de activación (AR) e inhibición (IR) en la función antitumoral de las células NK [4].

1.3 APOPTOSIS

La apoptosis o muerte celular programada es una vía importante de regulación del crecimiento y proliferación celular en la cual las células responden a señales específicas iniciando distintos procesos intracelulares que conducen a la muerte de la célula [21]. Entre estas modificaciones producidas, se encuentran un redondeamiento celular y disminución en el tamaño, fragmentación del núcleo y condensación de la cromatina, externalización de la fosfatidilserina a la membrana externa plasmática, y mantenimiento de la membrana celular intacta. Este proceso no está asociado con una reacción inflamatoria ya que el contenido intracelular no es liberado al exterior y los cuerpos apoptóticos formados son rápidamente fagocitados por células del sistema inmunitario [21, 22].

El mecanismo de apoptosis tiene lugar durante el desarrollo y el envejecimiento, permitiendo mantener un equilibrio homeostático de las poblaciones celulares. Además, es empleado como mecanismo de defensa ante reacciones inmunitarias o cuando las células son dañadas [21]. Si la apoptosis es insuficiente, puede aparecer cáncer o autoinmunidad, mientras que una muerte celular superior a lo normal podría desencadenar enfermedades degenerativas, inmunodeficiencias o infertilidad [23].

Existen dos vías para inducir la apoptosis: la vía extrínseca y la vía intrínseca o mitocondrial.

1.3.1 VÍA EXTRÍNSECA

La vía extrínseca tiene lugar como respuesta a un estímulo externo, transmitiendo la señal desde la superficie al interior celular. Se inicia por la unión de un homotrímero de un ligando mortal a su correspondiente receptor, produciendo la trimerización de éste. Estos receptores son miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), como Fas o el receptor del TNF- α de tipo I. Presentan dominios extracelulares ricos en cisteína, que permitirán la unión del ligando, y dominios citoplasmáticos llamados dominios mortales (DD).

Tras la unión del ligando, se lleva a cabo el reclutamiento de proteínas adaptadoras intracelulares, como la proteína FADD, y la posterior incorporación de la pro-caspasa 8, formándose el complejo señalizador inductor de muerte (DISC). Esto conlleva a la activación de la caspasa 8 [18, 21, 22].

1.3.2 VÍA INTRÍNSECA

La vía intrínseca tiene a la mitocondria como orgánulo regulador central. La familia de proteínas Bcl-2 va a regular y controlar esta vía apoptótica, principalmente la salida del citocromo C de la mitocondria por alteración en la permeabilidad de la membrana. Pueden ser pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bim) o anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) [24].

Se inicia como respuesta a distintos estímulos (toxinas, situaciones de hipoxia, infecciones virales, radicales libres) que provocan cambios en la membrana interna mitocondrial haciendo que se permeabilice. Se produce la disminución del potencial mitocondrial y la liberación de proteínas pro-apoptóticas desde el espacio intermembranas al citosol, como el citocromo C, Smac/DIABLO o AIF. El citocromo C se une a la proteína Apaf-1 y a la pro-caspasa 9, formando un complejo denominado apoptosoma, que permitirá la activación de la caspasa 9 [18, 21, 22].

Tanto la vía intrínseca como la extrínseca terminan con la activación de una cascada de caspasas (proteasas que rompen distintas moléculas), que dismantelan la arquitectura celular, la producción energética y la integridad genética, finalizando con la muerte de la célula [25].

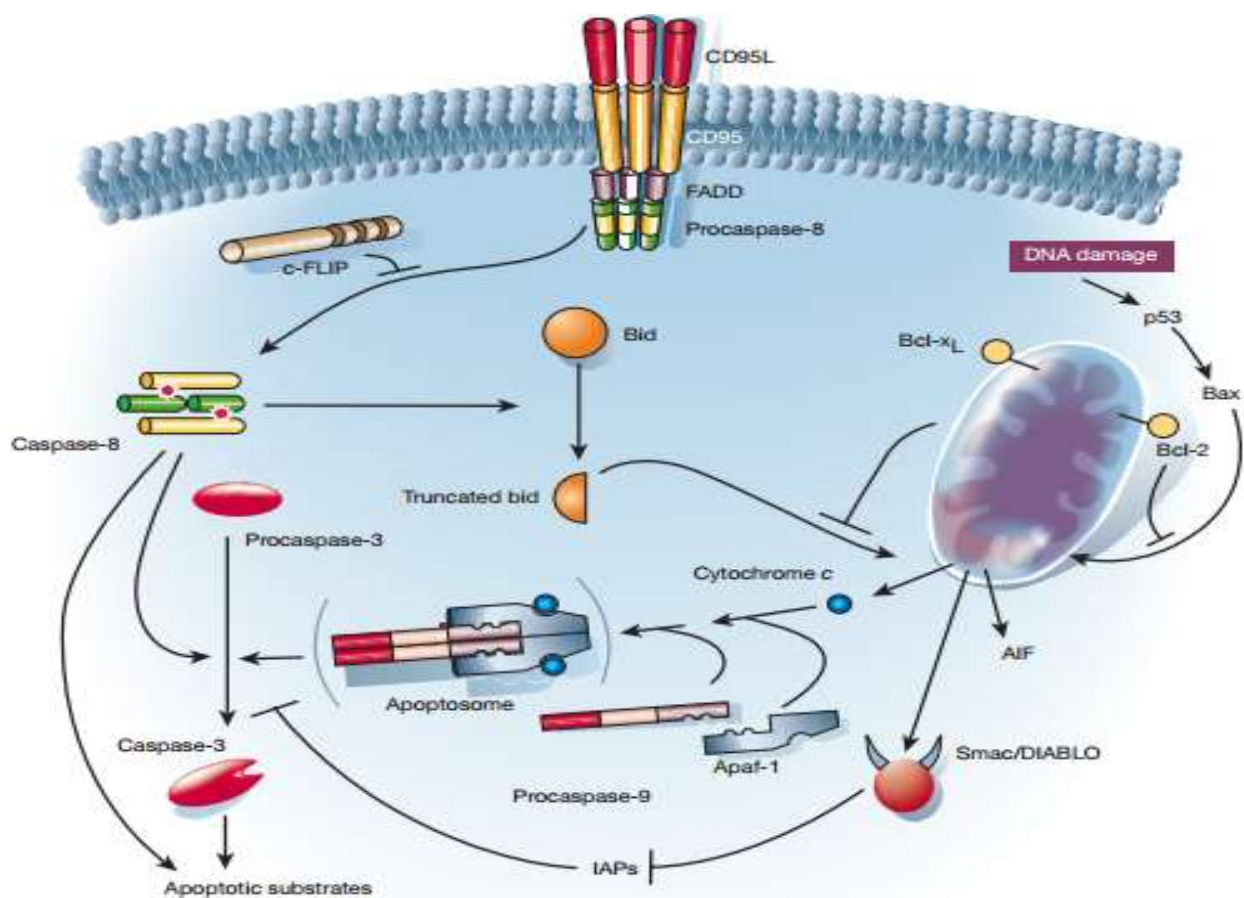


Figura 2: representación esquemática de la vía extrínseca y vía intrínseca de la apoptosis [26].

1.4 CÁNCER

El cáncer es una enfermedad neoplásica producida por la acumulación de mutaciones en el material genético de células individuales, que les confieren la capacidad de proliferar de manera descontrolada con la consecuente formación de un tumor [27, 28].

Además, estas células pueden migrar desde el tejido de origen a otros órganos, proceso conocido como metástasis [29].

Las células de un mismo tumor presentan heterogeneidad fenotípica y funcional como consecuencia del cambio genético, la influencia del microambiente y los cambios reversibles en las propiedades celulares [30].

1.4.1 MARCADORES DEL CÁNCER

Existen seis alteraciones esenciales en la fisiología celular, denominadas marcadores del cáncer, del inglés “hallmarks of cancer” que, en conjunto, desencadenan en la formación de un tumor maligno: señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, evasión de la muerte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis e invasión y metástasis de tejidos [31].

Además, estas células adquieren la capacidad para evadir el ataque de las células del sistema inmune, lo que favorece el desarrollo y progresión del cáncer, así como una reprogramación del metabolismo [32].

1.4.2 METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN LAS CÉLULAS TUMORALES

A diferencia de las células normales, que emplean la fosforilación oxidativa mitocondrial como principal vía para obtener la energía necesaria en los procesos celulares, la mayor parte de las células cancerígenas utilizan la glucólisis aerobia, fenómeno conocido como efecto Warburg [33]. En este proceso, el piruvato resultante de la glucólisis es transformado en lactato, generando 2 moléculas de adenosina 5'-trifosfato (ATP) por cada molécula de piruvato [34]. En comparación con la fosforilación oxidativa, es una vía menos eficiente en cuanto a producción de ATP y, sin embargo, el efecto Warburg ha sido demostrado en distintos tipos de tumores [35].

Las razones por las cuales las células cancerígenas emplean esta vía metabólica parecen ser la prioridad por acumular biomasa en vez de la obtención de energía. Existen evidencias que sugieren que debido al efecto Warburg y a esta producción de lactato, las células cancerígenas poseen ventajas sobre las células normales en el microambiente. Parece ser que el lactato es importante en la angiogénesis y en el desarrollo y crecimiento de tumores [34, 35].

1.4.3 DICLOROACETATO (DCA)

El dicloroacetato (DCA) es una molécula de 150 Da que inhibe a la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK1) y, consecuentemente, activa a la piruvato deshidrogenasa (PDH). Esto provoca un aumento en la oxidación de la glucosa a través del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte oxidativa. Esto produce la inhibición del crecimiento en muchas células tumorales, que se habían habituado a usar la fermentación de la glucosa para obtener energía en vez de la fosforilación oxidativa mitocondrial y, por lo tanto, se ha propuesto su utilización en el tratamiento del cáncer

[36]. De hecho, se ha demostrado que el DCA puede sinergizar con la doxorubicina o con nutlin-3 en el tratamiento de neoplasias hematológicas como la LLC-B [37, 38].

Por otra parte, nuestro grupo demostró que el DCA también es capaz de aumentar la expresión del MHC-I en células tumorales, e incluso de revertir la resistencia a la acción de los CTL en células en las que la expresión de MHC-I se había reducido drásticamente [39].

1.5 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 está caracterizada por la acumulación de linfocitos B maduros en sangre periférica, médula ósea y órganos linfoides secundarios. Parece que no hay relación con la exposición a radiaciones y productos químicos, mientras que los factores genéticos probablemente tengan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad [40].

Las células de la 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 en su membrana plasmática [41]. Expresan una variedad de proteínas de la familia Bcl-2 que favorecen la inhibición de la apoptosis lo cual, junto con la interacción con el microambiente celular y la liberación de citoquinas, resultan en la acumulación de células de LLC-B en varios órganos [40].

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 desarrollan una enfermedad agresiva con necesidad de tratamiento. La decisión de cuándo iniciar un tratamiento y de qué tipo está basada en múltiples factores, incluyendo el estado clínico de la enfermedad, los síntomas o la edad del paciente [42].

Las terapias basadas en fármacos alquilantes, solos o en asociación con corticoesteroides, han sido la primera línea de tratamiento de LLC durante décadas, así como los análogos de purinas. Sin embargo, estos tratamientos pueden comprometer las respuestas inmunes antitumorales debido a sus efectos secundarios inmunosupresores [41, 42].

1.6 INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL

Durante décadas, se han empleado la quimioterapia y la radioterapia como tratamientos contra el cáncer. Mientras que algunos de esos tratamientos han presentado beneficios, en múltiples casos se han desarrollado resistencias y en algunos tipos de cáncer los

tratamientos no han sido eficaces. Por ello, parece necesario el desarrollo de nuevas terapias antitumorales más eficientes [3].

La capacidad del sistema inmune para reconocer y eliminar células cancerígenas, así como los avances en el entendimiento de los mecanismos, han permitido establecer la inmunoterapia antitumoral como una terapia prometedora y en desarrollo [43, 44]. El agente inmunoterápico ideal sería aquel capaz de discriminar entre células cancerígenas y normales, de matar tumores de pequeño y gran tamaño y de evitar la recurrencia del tumor [45].

Aunque el sistema inmunitario puede evitar el desarrollo del tumor, lo cual se conoce como inmunovigilancia o vigilancia inmunitaria, muchos son capaces de evadir estos mecanismos por múltiples vías como son la producción de citoquinas inmunosupresoras, la inducción de células T reguladoras o la inactivación de células dendríticas. Por ello, es necesario modular la respuesta inmunitaria desarrollando tratamientos contra el cáncer [45].

1.6.1 UTILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS NK EN TERAPIA ANTITUMORAL

Los avances en la comprensión de la biología de las células NK y de sus funciones hacen que se hayan convertido en una potente herramienta de la inmunoterapia, buscando mejorar su activación y proliferación mediante diversas estrategias, algunas de las cuales están en fase de ensayo clínico [16].

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 [9].

1.6.2 ANTICUERPOS BLOQUEANTES ANTI-PD-1

Los puntos de control inmunes, o “immune checkpoints” en inglés, hacen referencia a una serie de vías inhibitorias cruciales para mantener la auto-tolerancia y modular la duración y amplitud de las respuestas inmunes fisiológicas. Uno de los mecanismos de supresión inmune desarrollada en el cáncer es la inducción de estos puntos de control intrínsecos en la superficie de células T activadas. CTLA-4 y PD-1 son los dos receptores de inhibición más estudiados [46].

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 [47]. Por ello, el bloqueo de este receptor se encuentra entre los enfoques más prometedores de la inmunidad antitumoral terapéutica [48]. El empleo de anticuerpos bloqueantes anti-PD1 se ha convertido en un tratamiento de primera línea en tumores de mal pronóstico, como es el caso de los anticuerpos pembrolizumab y nivolumab [49].

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En un consorcio en el que participaba nuestro grupo, el grupo de Julián Pardo realizó inicialmente experimentos en los que las células NK de donantes sanos eran activadas *in vitro* durante 5 días en presencia de células linfoblastoides transformadas con el virus de Epstein Bar (EBV⁺). Se demostró que estas células NK activadas eran citotóxicas sobre una gran variedad de líneas celulares de cánceres hematológicos [50]. Se demostró posteriormente que las células NK activadas de esta manera eran citotóxicas sobre células de pacientes de LLC-B [50, 51], que esta citotoxicidad se correlacionaba con el grado de compatibilidad de los HLA-I entre las células NK y las células de LLC-B, y que además la citotoxicidad era mayor sobre células de pacientes de LLC-B con peor pronóstico [51].

En un trabajo realizado en este consorcio por el grupo de Martín Villalba, del INSERM en Montpellier, se puso a punto también un protocolo de expansión de células NK a partir de células de cordón umbilical [52]. Por otra parte, nuestro grupo puso a punto un protocolo similar a partir de células NK obtenidas de donantes sanos, realizando expansiones de las células NK durante 20 días en presencia de células linfoblastoides EBV⁺ 721.221, negativas para la expresión de HLA-I, y de IL-2 + IL-15 en presencia o ausencia de IFN- α . Se comprobó que esta última citoquina no tenía un efecto adicional sobre IL2 + IL-15 ni en cuanto a expansión ni en cuanto a citotoxicidad. Sin embargo, sí que se consiguió una expansión suficiente para poder tratar un paciente con células NK alogénicas de un solo donante. Además, se demostró que estas células NK expandidas (eNK) resultaban citotóxicas sobre células procedentes de 30 pacientes de LLC-B (Tania Calvo, comunicación personal; María Gascón, TFG Biotecnología, 2016).

Sin embargo, tres de las leucemias analizadas mostraron resistencia a las células eNK. Las células leucémicas de dos de estos pacientes habían sido analizadas con anterioridad y sí habían sido sensibles a células eNK procedentes de otros donantes. Se demostró además que las células resistentes también lo eran a las células eNK descongeladas a las que habían sido sensibles inicialmente, demostrando una capacidad de resistencia a la citotoxicidad intrínseca las células leucémicas. En ese estudio, se observó además que las células resistentes habían aumentado muy significativamente la expresión de PD-L1 con respecto al momento en el que eran sensibles a las eNK (María Gascón, TFG Biotecnología, 2016).

Así pues, para continuar con este trabajo y analizar las posibles causas moleculares de las resistencias adquiridas por parte de las células de LLC-B, se han establecido los siguientes objetivos:

1. Estudiar la expresión de distintos marcadores de superficie relacionados con la citotoxicidad de las células NK en las células de LLC-B sensibles y resistentes.

2. Analizar la expresión de PD-1 en las células NK, comparando los resultados a día 0 y a día 20 de expansión.
3. Determinar las variaciones que pudiera producir el DCA sobre los marcadores estudiados en las células de LLC-B y sobre la citotoxicidad.
4. Observar el efecto del DCA sobre la proliferación y viabilidad de las células de LLC-B.
5. Analizar la expresión de PD-L1 en muestras frescas de los mismos pacientes y realizar ensayos de citotoxicidad en presencia del anticuerpo bloqueante anti-PD-1 pembrolizumab y de DCA.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CULTIVOS CELULARES

3.1.1 LÍNES 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. Estas células se emplean como células estimuladoras en co-cultivos con las células NK. Se cultivan en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) de complementado al 10% (v/v), Glutamax y antibióticos (penicilina y estreptomicina).

3.1.2 CONDICIONES DE ESTERILIDAD

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

Por tanto, la manipulación de los cultivos celulares se ha llevado a cabo en una campana de flujo laminar vertical y todo el material empleado ha sido esterilizado previamente.

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 cm² con un tapón hermético con un filtro de 0.2 µm para permitir el intercambio de gases, pero no el paso de microorganismos, manteniéndose en un incubador termostatzado a 37°C y con aporte fijo del 5% de CO₂.

Se realizaron subcultivos cada 2 ó 3 días en una campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, manteniendo así la concentración adecuada de células.

3.1.4 CONTAJE Y VIABILIDAD CELULAR

Para evaluar la concentración y la viabilidad celular, se empleó la cámara de Neubauer y el colorante azul Trypan, el cual proporciona un color azul intenso a aquellas células que han perdido la integridad de su membrana celular, lo que permitirá distinguir las células vivas de las muertas.

Se mezclaron, en un tubo eppendorf, 50 µl de la suspensión celular con 50 µl de azul Trypan (dilución 1:1) y se resuspendió de manera adecuada. Posteriormente, se depositó en la cámara de Neubauer y se llevó a cabo la observación y conteo mediante el empleo de 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. Después, las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 con un 10% de SFB y enriquecido en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%. Se trasvasaron a viales de congelación y posteriormente se introdujeron en un congelador a -80°C. Finalmente, se trasvasaron a contenedores de N₂ líquido.

Para llevar a cabo la descongelación de las células, el contenido de cada vial de congelación fue trasvasado a un tubo Falcon con 10 ml de medio RPMI 1640 con 10% de SFB y centrifugado durante 5 minutos a 1500 rpm para eliminar el sobrenadante con DMSO, tóxico para las células. Después, las células se resuspendieron en medio de cultivo completo y se cultivaron en placas de 6 pocillos en un volumen de 2-3 ml.

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 mejorando su supervivencia.

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 la separación de las distintas poblaciones de células sanguíneas. Previamente, todos los materiales y reactivos fueron esterilizados.

Se parte de “buffy-coats”, capas leucoplaquetarias que contienen la mayoría de leucocitos y plaquetas de la unidad de sangre de la que proceden, obtenidos a través de los correspondientes permisos del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón. El contenido del “buffy coat” fue diluido en un tubo Falcon en 10 ml de PBS y depositado sobre 20 ml de Ficoll-Paque. Se llevó a cabo una centrifugación en gradiente de densidad a 1500 rpm durante 20 min y sin freno, para evitar el daño celular. Tras la centrifugación, las células de interés se encuentran en la interfase entre la fase acuosa y el Ficoll, formando un anillo blanquecino. Este anillo fue recogido y depositado en un tubo Falcon con PBS, permitiendo eliminar los restos de Ficoll mediante centrifugación, proceso que se repite dos veces. Las células obtenidas fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 al 10% en SFB (v/v) de complementado. Se obtuvo así una población 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 las células NK, es necesario eliminar, al menos parcialmente, la población de linfocitos T, puesto que es la mayoritaria y podría interferir en la proliferación y activación de las células NK. Para ello, se llevó a cabo una separación celular empleando microsféricas MACS, partículas paramagnéticas unidas a anticuerpos

específicos que reconocen la proteína de membrana CD3, presente en linfocitos T, pero no en células NK.

Las células se resuspendieron en 90 µl de tampón MACS y 10 µl de microsféricas conjugadas con anti-CD3 por cada 10^7 células totales y se incubaron 15 minutos a 4°C. Tras centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos, se pasó la muestra celular a través de una columna MACS.

De esta manera, aquellas células que expresan CD3 en su superficie quedarán retenidas en la columna mientras que las que carecen de ella serán eluidas, obteniéndose una población enriquecida en células NK.

3.2.3 ACTIVACIÓN Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS NK

Antes de establecer el cultivo, las células 721.221 fueron tratadas con 1 ml de mitomicina C por cada 10^7 células 721.221 en 2 ml de RPMI 1640 por cada $2 \cdot 10^6$ células 721.221 durante 120 minutos a 37°C. Posteriormente, se lavaron para eliminar los restos de mitomicina C. Este tratamiento permite inactivar la proliferación de las células estimuladoras, aunque conservan la expresión de sus receptores de membrana.

Para permitir la proliferación e incrementar la capacidad citotóxica de las células NK, se establecieron cultivos celulares a una densidad celular inicial de $2 \cdot 10^6$ células/ml en frascos con 10 ml de medio RPMI 1640 al 10% en SFB, en presencia de IL-2 (100 UI/ml), IL-15 (25 UI/ml) y células 721.221 pre-tratadas con mitomicina C en relación 10:1 (PBL: células 721.221).

Se establecieron dos cultivos diferentes: uno de ellos serviría de control, incorporando únicamente las células sanguíneas; el otro llevaría, aparte de las células sanguíneas, células 721.221, IL-2 e IL-15.

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

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 distintas poblaciones celulares en función del tiempo, se realizó un análisis mediante citometría de flujo a día 0, 5, 10, 15 y 20. Se llevó a cabo un marcaje empleando anticuerpos anti-CD3 conjugado con FITC y anti-CD56

conjugado con APC, ambos de la casa Miltenyi, que permite la diferenciación entre las distintas poblaciones linfocitarias. Las células NK son negativas para la expresión de CD3 y positivas para la expresión de CD56.

Los marcajes se realizaron en una placa de 96 pocillos, empleando una densidad de 100000 células/pocillo. Tras añadir el volumen necesario de células y centrifugar, se añadieron 96 µl de PBS al 5% en SFB, 2 µl de anticuerpo anti-CD3 y 2 µl de anticuerpo anti CD-56 en cada pocillo y se incubó durante 15 minutos a 4°C. 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 de cultivo, se llevó a cabo un nuevo aislamiento empleando las columnas MACS donde las bolas paramagnéticas, en este caso, estaban conjugadas con anticuerpo anti-CD56. Se trata de una separación positiva puesto que las células NK quedan unidas a las microsféricas 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 RPMI 1640 y se realizó el conteo mediante tinción con azul Trypan (*apartado 3.1.4*) y microscopía óptica.

Después, se realizó una nueva centrifugación con posterior eliminación del sobrenadante, y las células se resuspendieron en 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 5ml de sangre heparinizada.

Las células fueron obtenidas mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque y seleccionando la población leucocitaria (*apartado 3.2.1*). Tras los correspondientes lavados, las células se resuspenden en medio RPMI 1640 al 10% en SFB para realizar el conteo empleando tinción con azul Trypan y microscopía óptica. En el caso de las células de LLC-B congeladas, se llevó a cabo su descongelación (*apartado 3.1.5*) y conteo mediante tinción con azul Trypan y microscopía óptica.

Para realizar el ensayo de citotoxicidad, se utilizó una placa de 96 pocillos en la cual se depositaron 250.000 células NK activadas marcadas con “Cell Tracker Green” y 50.000

células leucémicas en cada pocillo, es decir, en relación 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, que servirían como control, tanto de células NK como de las células leucémicas.

Transcurrido este tiempo, se centrifugó la placa a 3500 rpm durante 2 minutos y se añadió 1,5 µl de 7-AAD (7-Aminoactinomicina D), compuesto químico fluorescente que se une al DNA de células que tienen 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.

Algunos de estos ensayos se llevaron a cabo en presencia del anticuerpo bloqueante anti-PD1 pembrolizumab (Merck), que fue cedido amablemente por el Dr. Roberto Pazo, del Servicio de Oncología del Hospital Miguel Servet de Zaragoza. Para ello, previamente al ensayo de citotoxicidad, las células eNK se incubaron en presencia de pembrolizumab a una concentración de 1 µg/ml durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se llevó a cabo el ensayo de citotoxicidad, como se ha indicado arriba.

3.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PD-1 EN LAS CÉLULAS NK

Se analizó la expresión del receptor PD-1 en la superficie de las células NK, comparando a día 0 y a día 20 de expansión. Se utilizó un anticuerpo anti-PD1 conjugado con FITC de la casa comercial Biolegend.

Para ello, se empleó una placa de 96 pocillos. Primero, se analizó la concentración y viabilidad de las células mediante tinción con azul Trypan (*apartado 3.1.4*) y, posteriormente, se depositaron 100.000 células por pocillo. Tras centrifugar a 3500 rpm durante 2 minutos y decantar el sobrenadante, se añadieron 2 µl de anticuerpo anti-PD1, 2 µl de anticuerpo anti-CD56 que permitió seleccionar la población de interés, y 96 µl de PBS al 10% en SFB y se incubó durante 30 minutos a 4°C.

3.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE EN CÉLULAS DE PACIENTES DE LLC-B

Se ha llevado a cabo el análisis de la expresión de distintos marcadores en muestras de leucemia de pacientes. Estas muestras estaban congeladas en nitrógeno líquido y ya habían sido empleadas en experimentos anteriores. Por ello, lo primero fue

descongelarlas (*apartado 3.1.5*) y evaluar su viabilidad mediante tinción con azul Trypan (*apartado 3.1.4*).

Posteriormente, se llevaron a cabo los marcajes, que se realizaron en una placa de 96 pocillos, distribuyéndose 100.000 células/pocillo. Tras centrifugar durante 2 minutos a 3500 rpm y eliminar el sobrenadante, se procedió a realizar los distintos marcajes.

Los anticuerpos empleados fueron: anticuerpo anti-PDL1 conjugado con PE, de la casa comercial BioLegend, anticuerpo anti-HLA-E conjugado con PE de la casa comercial eBioscience, anticuerpo HLA-ABC conjugado con FITC de la casa comercial eBioscience y quimeras entre NKp30, NKp44 y NKp46 y la fracción Fc de una IgG de ratón, seguido de marcaje con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con FITC. Las quimeras se obtuvieron del sobrenadante de hibridomas cedidos amablemente por el Doctor Ofer Mandelboim, Hebrew University, Jerusalén (Israel).

Los marcajes se llevaron a cabo incorporando, a cada pocillo, 2 µl de anti-PDL1, 2 µl de anti-HLA-E o 2 µl de anti-HLA-ABC, junto con 98 µl de PBS al 10% en SFB. La placa se incubó durante 30 minutos a 4°C. En el caso de los NCRs, los marcajes se realizaron en tubos eppendorf en presencia de 1 ml del sobrenadante de los hibridomas durante 30 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo un lavado con PBS y posteriormente, se marcó con 2 µl del anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con FITC de la casa comercial BD-Pharmingen y 98 µl de PBS al 10% en SFB durante 30 minutos a 4°C.

Además, se incorporaron pocillos de control, constituidos por las células resuspendidas en 100 µl de PBS al 10% en SFB, y pocillos de control de isotipo, donde las células fueron incubadas en presencia de 2 µl de anticuerpo anti-IgG2a κ conjugado con PE o con FITC de la casa comercial BD Pharmingen.

Cumplido el tiempo de marcaje, se procedió a realizar una nueva centrifugación a 3500 rpm durante 2 minutos. Se resuspendió cada pocillo en PBS y se llevó a cabo el análisis por citometría de flujo.

3.6 EFECTO DEL DCA SOBRE LAS CÉLULAS DE PACIENTES DE LLC-B

Las células de LLC-B de pacientes fueron incubadas en presencia de DCA y se analizó su viabilidad mediante tinción con azul Trypan a las 24 ó 48 horas.

Para ello, en primer lugar, se evaluó la viabilidad y la concentración de las muestras de LLC-B, recién descongeladas u obtenidas, mediante tinción con azul Trypan. Posteriormente, se realizaron los cultivos celulares en placas de 6 pocillos distribuyendo $1 \cdot 10^6$ células/pocillo en un volumen total de 3 ml de medio RPMI 1640 con 10% de SFB y en presencia de IL-4 (100 UI/ml). Se establecieron 3 pocillos por cada muestra de LLC-B, donde uno de ellos servía de control, incluyendo únicamente las células de LLC-B en

ausencia de DCA, y dos de ellos sí incorporaron el DCA a una concentración de 5 mM y 15 mM. La placa fue incubada a 37°C.

La viabilidad y concentración de cada pocillo fue evaluada a las 24 horas, así como a las 48 horas. Además, se llevaron a cabo marcajes para evaluar el efecto del DCA sobre la expresión de PD-L1, así como ensayos de citotoxicidad (*apartado 3.3*) una vez cumplidas las 48 horas de incubación con DCA.

Por otra parte, también se evaluó la expresión de los marcadores de superficie en células de pacientes de LLC-B en presencia de DCA a las 48 horas de incubación. Para ello, transcurrido este tiempo, se transvasaron 100000 células/ pocillo a una placa de 96 pocillos donde se realizaron los correspondientes marcajes (*apartado 3.5*).

4. RESULTADOS

4.1 DESARROLLO DE RESISTENCIAS A LAS eNK EN PACIENTES DE LLC-B

En estudios previos realizados en el Trabajo de Fin de Grado en el curso 2015/2016, se analizaron muestras de LLC-B de dos pacientes. En este estudio, se comprobó que las muestras iniciales de éstos eran sensibles a las células NK mientras que las muestras posteriores no lo eran. Sin embargo, en estos ensayos las células NK utilizadas en 2015 procedían de donantes diferentes a los utilizados en los ensayos de 2016. Es por ello que procedimos a realizar un nuevo ensayo en el que se emplearon tanto las muestras sensibles como las resistentes frente a las células NK descongeladas empleadas en el primer ensayo. Se observó como el porcentaje de muerte inducida sobre las muestras resistentes fue menor que el obtenido en las muestras inicialmente sensibles (*Figura 3*).

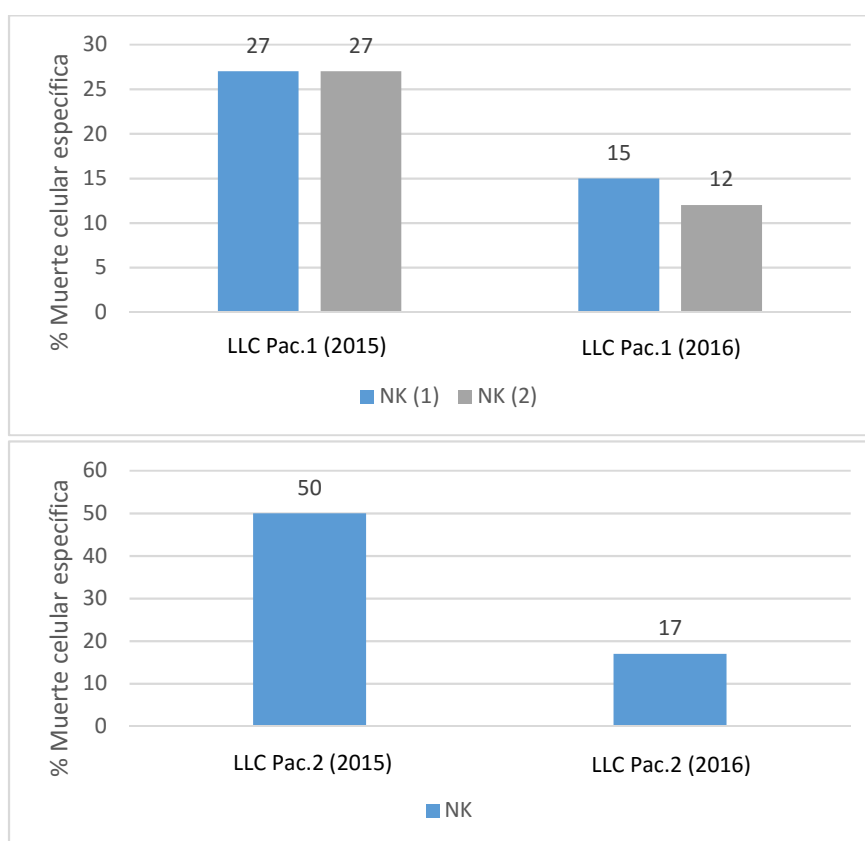


Figura 3: Porcentajes de muerte celular de las células LLC-B inducida por las células NK descongeladas que se usaron inicialmente contra las muestras LLC Pac.1 (2015) (dos donantes: NK1, NK2) y LLC Pac.2 (2015) (un donante: NK). Las células eNK marcadas con Cell Tracker Green fueron ensayadas frente a células de pacientes de LLC-B durante 4 horas. Posteriormente, se realizó el marcaje con 7-AAD y se analizó el porcentaje de células positivas para 7-AAD y negativas para Cell Tracker Green.

4.2 PACIENTES DE LLC-B

En la tabla I, se muestran los datos clínicos de estos pacientes, amablemente cedidos por la Doctora Azaceta, del Servicio de Hematología del Hospital Clínico.

El paciente 1 se encontraba en un estado IA de la enfermedad en 2015 y, tras un año y recibir un primer tratamiento, pasó a un estado IV-C en 2016. La muestra de LLC-B de 2016 fue la que mostró resistencia. El tratamiento recibido antes de obtener la muestra de 2015 fueron 6 ciclos de rituximab (R) combinados con ciclofosfamida, vincristina y prednisona (COP), más un ciclo adicional con rituximab y bendamustina (Benda). En el momento de obtener la muestra de 2016 estaba recibiendo tratamiento con esta última combinación. En el caso del paciente 2, es una persona de avanzada edad, en un estadio indolente (0) de la enfermedad, como se observa en la *Tabla I*, que no recibió ningún tratamiento. Sin embargo, la muestra de LLC-B analizada en 2016 mostró resistencia las eNK, a diferencia de la muestra analizada en 2015 de este mismo paciente.

Evolución del paciente


	Edad	Estado	Tratamiento	Respuesta	%CD38	%ZAP70
Paciente 1	75	IA (2015)	R-COP x6 R-Benda x1	Parcial	70	10
		 IV-C (2016)	R-Benda	En tratamiento	Bis	Bis
Paciente 2	89	0 (2015)	No	.	0	.
		0 (2016)	No	.	Bis	Bis

Tabla I: datos de los pacientes 1 y 2 de LLC-B, incluyendo la edad, el estado de la enfermedad, así como el tratamiento, la respuesta a éste y la expresión de CD38 y ZAP 70.

4.3 ANÁLISIS DE MARCADORES EN LLC-B RESISTENTES

Se analizó la expresión de NKp30, NKp44, NKp46, HLA-E y HLA-ABC en 4 muestras (LLC Pac.1 (2015), LLC Pac.2 (2015), LLC Pac.1 (2016) y LLC Pac.2 (2016)) de leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B). De tal forma, se compararon los resultados obtenidos para las muestras iniciales y sensibles a las eNK (LCC Pac.1 (2015), LLC Pac.2 (2015)) con los resultados obtenidos para las muestras posteriores de los mismos pacientes y resistentes a las eNK (LCC Pac.1 (2016), LLC Pac.2 (2016)).

Estos ensayos fueron llevados a cabo con muestras de LLC-B previamente descongeladas.

4.3.1 EXPRESIÓN DE LIGANDOS DE NCR

Los NCRs (NKp46, NKp44 y NKp30) son receptores de activación de las células NK. Cuando estos receptores se unen a sus correspondientes ligandos en la superficie de las células diana, ponen en marcha los mecanismos efectores de las células NK. Al analizar la expresión en las muestras de leucemia sensibles y compararlo con las muestras de leucemia resistentes, se comprueba que los tres ligandos de los NCRs han disminuido su expresión en ambas muestras de LLC-B resistentes.

Como se observa en la *figura 4*, la disminución en el caso de la LLC Pac.1 (2016) en contraste con los valores de la LLC Pac.1 (2015) es relativamente pequeña, obteniendo la variación más significativa en el caso de NKp44 (de un 22.5% a un 13.1%).

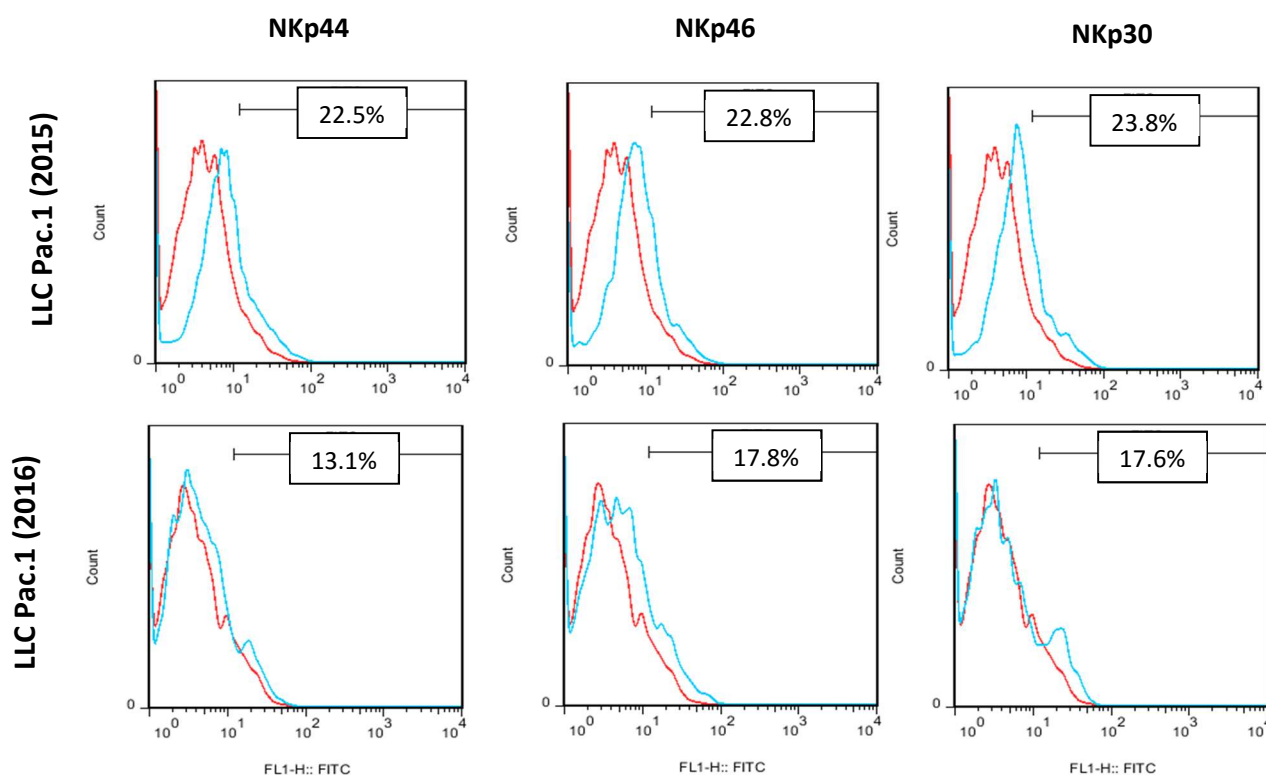


Figura 4: análisis de la expresión de NCRs (NKp44, NKp46 y NKp30) en las muestras de leucemia LLC Pac.1 (2015), LLC Pac.2 (2016). Las células se marcaron con 1 ml de los sobrenadantes de los hibridomas que producían las quimeras NKp30-Fc, NKp44-Fc o NKp46-Fc, siendo la fracción Fc de IgG de ratón, durante 30 minutos y, posteriormente, con 2 µl de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con FITC y se analizaron mediante citometría de flujo. La gráfica roja representa el marcaje con un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo, mientras que la línea azul se refiere al marcaje con la quimera de interés. Los números representan el porcentaje de células positivas en cada caso.

En cuanto a los valores obtenidos para la muestra de LLC Pac.2 (2016), se observa una mayor disminución en relación a los valores de la muestra LLC Pac.1 (2015). En el caso de NKp30, el porcentaje de expresión casi desaparece, desde un valor de 32.1% en la muestra sensible a un valor de 3.26% en la muestra resistente.

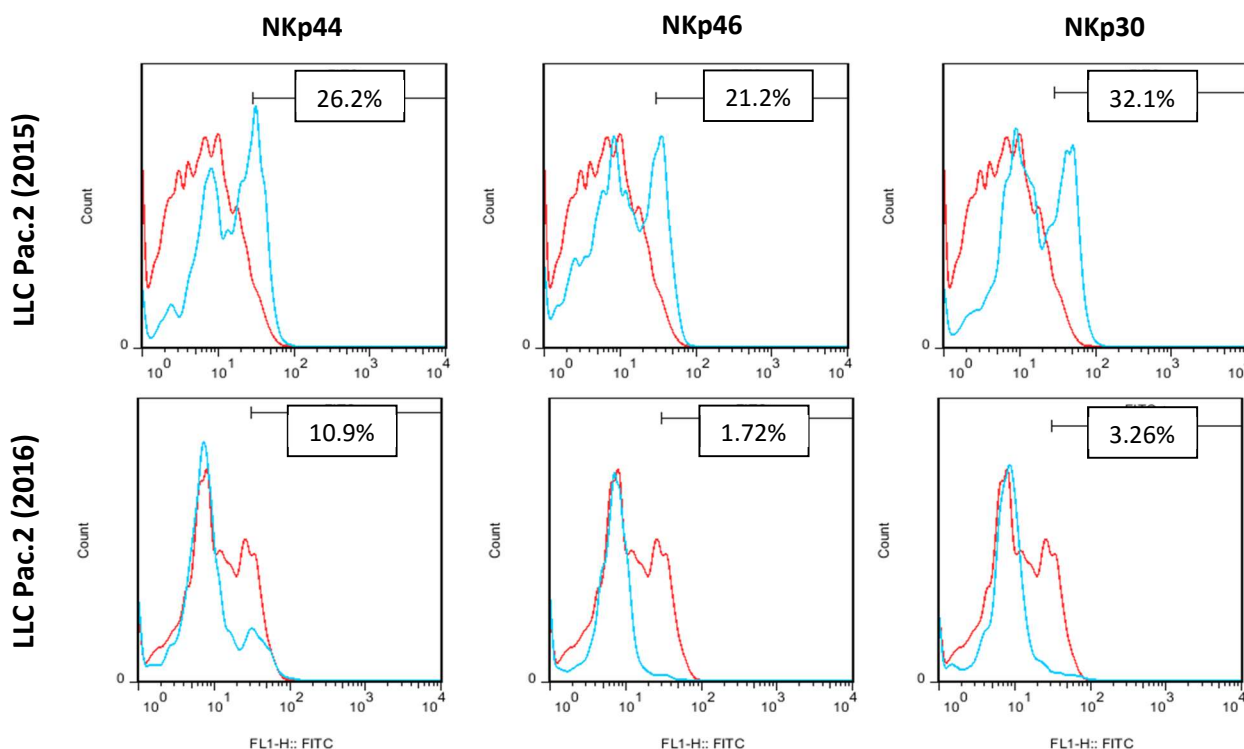


Figura 5: análisis de la expresión de NCRs (NKp44, NKp46 y NKp30) en las muestras de leucemia LLC Pac.2 (2015), LLC Pac.2 (2016). Las células se marcaron con 1 ml de los sobrenadantes de los hibridomas que producían las quimeras NKp30-Fc, NKp44-Fc o NKp46-Fc, siendo la fracción Fc de IgG de ratón, durante 30 minutos y, posteriormente, con 2 µl de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con FITC y se analizaron mediante citometría de flujo. La gráfica roja representa el marcaje con un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo, mientras que la línea azul se refiere al marcaje con la quimera de interés. Los números representan el porcentaje de células positivas en cada caso.

4.3.2 EXPRESIÓN DE HLA-E

La expresión de los HLA está relacionada con la inhibición de las funciones de las células NK. En concreto, HLA-E es el ligando del receptor de inhibición NKG2A [14]. Al analizar la expresión de HLA-E en las cuatro muestras de LLC-B nombradas anteriormente, se comprueba que ha descendido levemente en la muestra LLC Pac.1 (2016) en relación a la muestra LLC Pac.1 (2015), mientras que ha aumentado en el caso de la muestra LLC Pac.2 (2016) en comparación con la muestra LLC Pac.2 (2015), tal y como se observa en la figura 6.

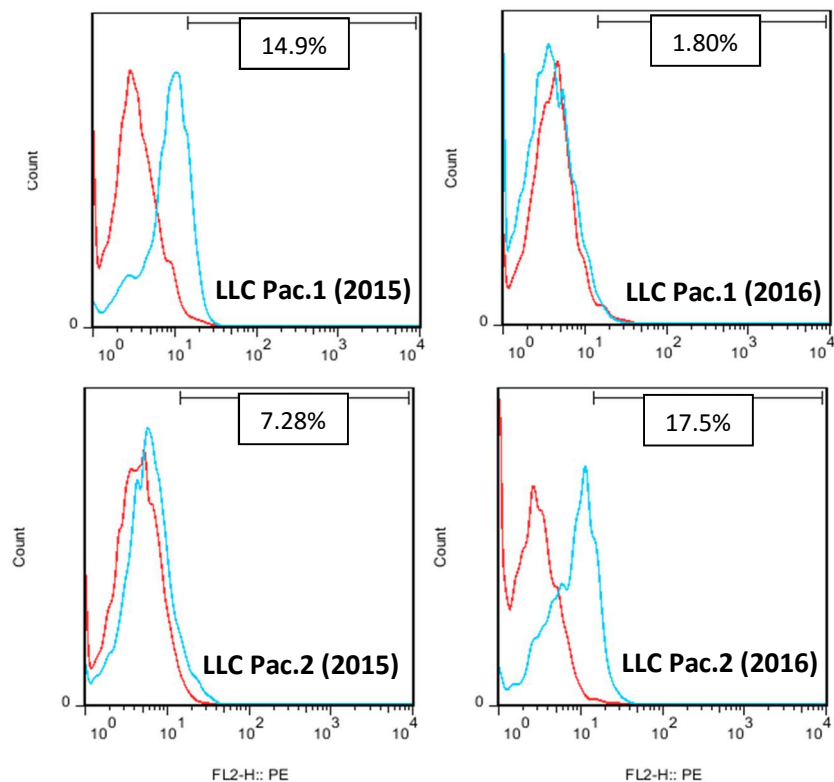


Figura 6: análisis de la expresión de HLA-E en las muestras de leucemia LLC Pac.1 (2015), LLC Pac.1 (2016), LLC Pac.2 (2015), LLC Pac.2 (2016). Las células se marcaron con anticuerpos anti-HLA-E conjugado con PE y se analizaron mediante citometría de flujo. La gráfica roja representa el marcaje con un anticuerpo irrelevante, mientras que la línea azul hace referencia al marcaje con el anticuerpo de interés. Los números representan el porcentaje de células positivas en cada caso.

4.3.3 EXPRESIÓN DE HLA-ABC

Como se ha comentado anteriormente, la expresión de los HLA está relacionada con la inhibición de las funciones de las células NK. Por tanto, si aumenta la expresión del HLA-ABC, la citotoxicidad de las células NK podría verse disminuida, ya que las moléculas de HLA de clase I son los ligandos de receptores de inhibición de las células NK conocidas como KIR.

Como se comprueba en la *figura 7*, la expresión del HLA se ve disminuida en la muestra resistente LLC Pac.1 (2016) en comparación con la muestra sensible del mismo paciente (LLC Pac.1 (2015)). En relación al otro paciente, se observa que no hay cambio en el nivel de expresión de HLA entre la muestra sensible (LLC Pac.2 (2015)) y la muestra resistente (LLC Pac.2 (2016)), siendo éste muy bajo, en cualquier caso.

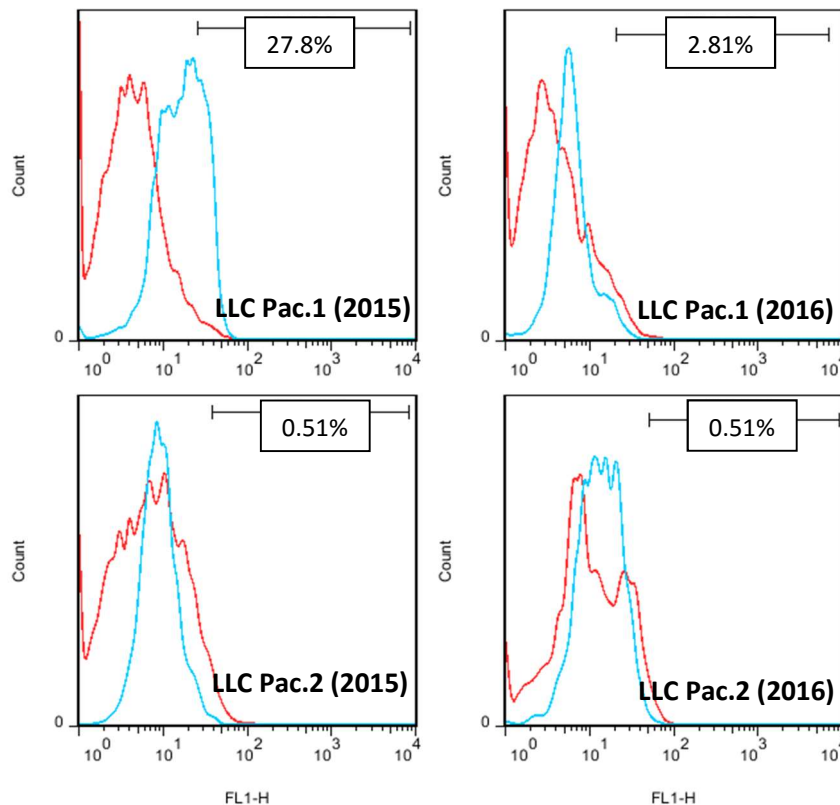


Figura 7: análisis de la expresión de HLA-ABC en las muestras de leucemia LLC Pac.1 (2015), LLC Pac.1 (2016), LLC Pac.2 (2015), LLC Pac.2 (2016). Las células se marcaron con anticuerpos anti-HLA-ABC conjugado con FITC y se analizaron mediante citometría de flujo. La gráfica roja representa el marcaje con un anticuerpo irrelevante, mientras que la línea azul hace referencia al marcaje con el anticuerpo de interés. Los números representan el porcentaje de células positivas en cada caso.

4.3.4 EXPRESION DE PD-L1

PD-L1 es el ligando del receptor PD-1, el cual está presente en linfocitos T y células NK. La interacción de este ligando con su receptor provoca la inhibición de las funciones citotóxicas en los linfocitos T y posiblemente también en las células NK. Por ello, si aumenta la expresión de PD-L1 en las muestras de LLC-B, podría estar disminuyendo la citotoxicidad de las células NK. Se comprobó que la resistencia de las leucemias correlacionaba, en ambos casos, con un aumento en la expresión de PD-L1, que llega a ser muy sustancial en el caso de la muestra resistente del paciente 2 tomada en 2016, con un 94% de las células leucémicas expresando PD-L1 (*figura 8*).

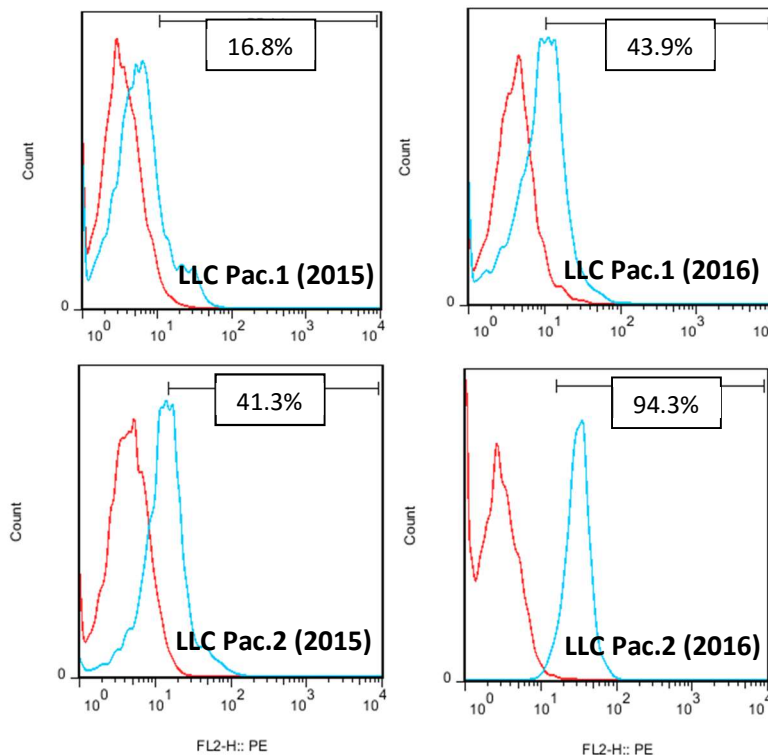


Figura 8: análisis de la expresión de PD-L1 en las muestras de leucemia LLC Pac.1 (2015), LLC Pac.1 (2016), LLC Pac.2 (2015), LLC Pac.2 (2016). Las células se marcaron con un anticuerpo anti-PDL1 conjugado con PE y se analizaron mediante citometría de flujo. La gráfica roja representa el marcaje con un anticuerpo irrelevante, mientras que la línea azul representa el marcaje de las células con el anticuerpo anti-PDL1. Los números representan el porcentaje de células positivas en cada caso.

4.4 EXPRESIÓN DE PD-1 EN LAS CÉLULAS NK

La expresión del receptor PD-1 fue analizada en seis muestras distintas de células NK, tanto a día 0 como a día 20 de expansión. La finalidad era determinar si el receptor podría intervenir en la resistencia de determinadas leucemias debido a la interacción entre éste, presente en las células NK y el ligando PD-L1, presente en las muestras de LLC-B resistentes.

Como puede observarse en la *figura 9*, en las muestras NK1 y NK5 la expresión de PD1 fue mayor a día 20, tras la expansión y activación de las células NK, mientras que en el caso de NK2, que expresaba PD-1 en un porcentaje muy alto de células a nivel basal (63.4%), este porcentaje disminuyó a día 20. En las otras tres muestras analizadas (NK3, NK4 y NK6) este porcentaje no mostró variaciones significativas y, en cualquier caso, no fue muy elevado.

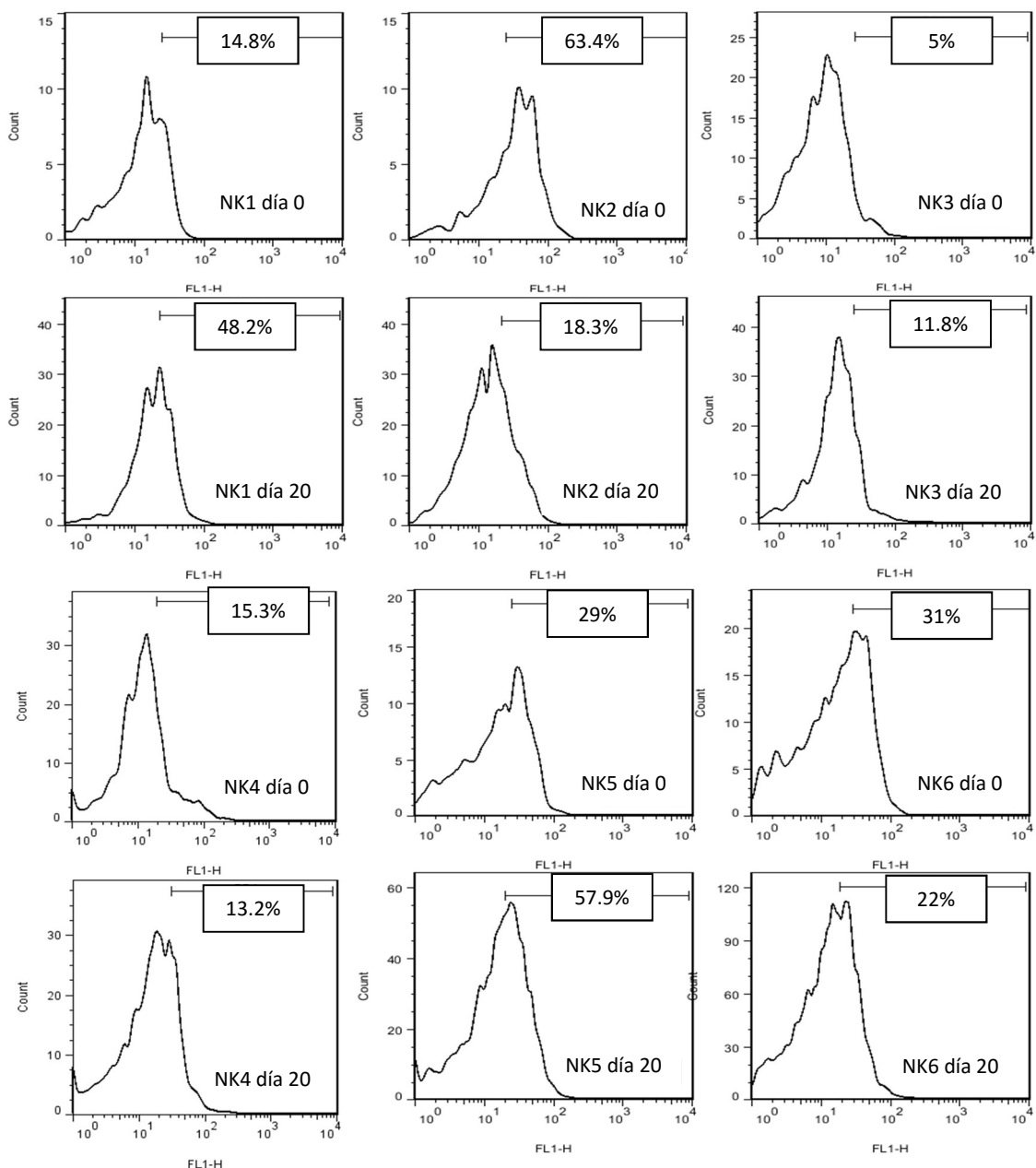


Figura 9: análisis de la expresión de PD-1 en 6 muestras de células NK (NK1, NK2, NK3, NK4, NK5, NK6) a día 0 y a día 20 de la expansión y activación de éstas. Las células se marcaron con anticuerpo anti-PD1 conjugado con FITC y anticuerpo anti-CD56 conjugado con APC (para determinar la población de células NK) durante 30 minutos y se analizaron mediante citometría de flujo. Los números representan el porcentaje de células positivas para la expresión de PD-1 en cada uno de los casos.

4.5 EFECTO DEL DCA EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES EN LLC-B

Tras los resultados de la expresión de los distintos marcadores en las muestras de las LLC-B resistentes en comparación con las muestras sensibles, se analizó el efecto de la droga metabólica DCA, observando si modificaba o no los niveles de expresión de estos

marcadores. Se observó un cierto efecto en los niveles de PD-L1, HLA-E y HLA-ABC, mientras que en los marcajes de NCRs no se vio ninguna variación significativa.

4.5.1 EFECTO DEL DCA EN LA EXPRESIÓN DE HLA-E

La expresión de HLA-E disminuyó en todas las muestras en presencia de DCA como se observa en la *figura 10*. En el caso de las muestras LLC Pac.1 (2015) y LLC Pac.1 (2016), las células dejaron de expresar HLA-E por completo.

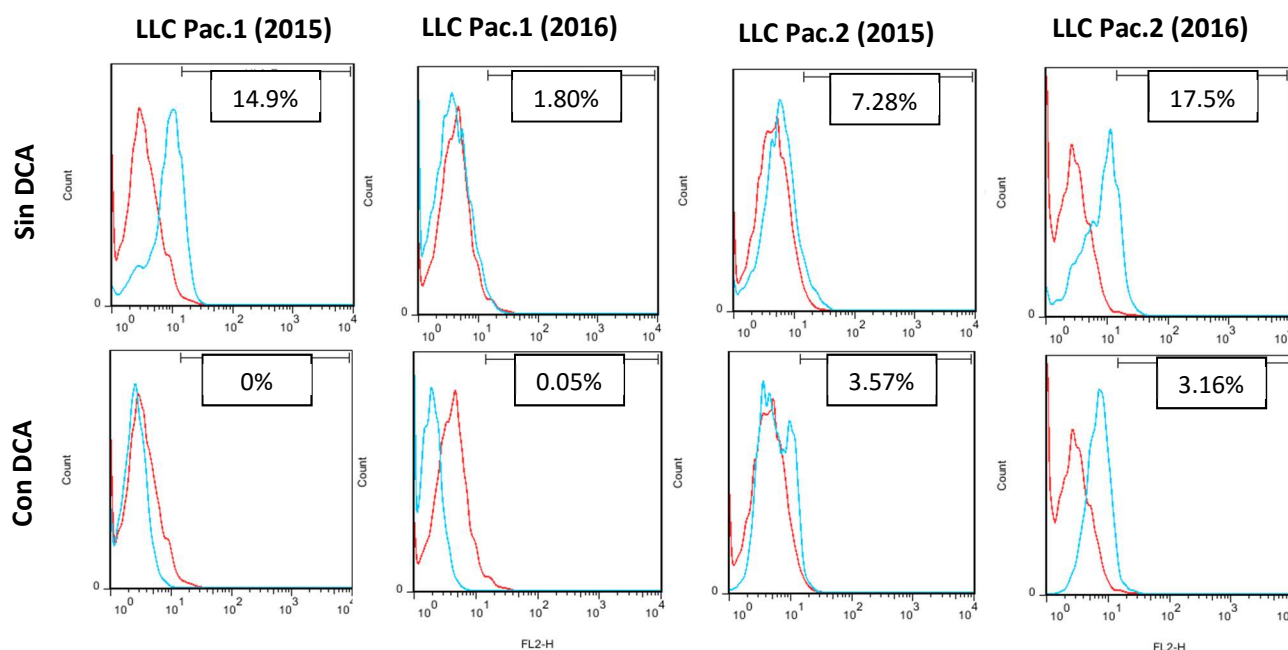


Figura 10: análisis de la expresión de HLA-E en presencia y ausencia de DCA en las muestras de leucemia LLC Pac.1 (2015), LLC Pac.1 (2016), LLC Pac.2 (2015), LLC Pac.2 (2016). Las células se cultivaron en presencia de DCA a una concentración de 5mM durante 48 horas y, transcurrido este tiempo, se marcaron con anticuerpo anti-HLA-E conjugado con PE durante 30 minutos y se analizaron mediante citometría de flujo. La gráfica roja representa el marcaje con un anticuerpo irrelevante, mientras que la línea azul hace referencia al marcaje con el anticuerpo de interés. Los números representan el porcentaje de células positivas en cada caso.

4.5.2 EFECTO DEL DCA EN LA EXPRESIÓN DE HLA-ABC

En presencia de DCA, la expresión de HLA-ABC aumentó en las muestras LLC Pac.1 (2015), LLC Pac.1 (2016) y LLC Pac.2 (2016), mientras que se mantuvo prácticamente invariable en el caso de la muestra LLC Pac.2 (2015), como se observa en la *figura 11*. El efecto positivo del DCA sobre la expresión de HLA de clase I ya se había descrito en estudios anteriores [39, 53].

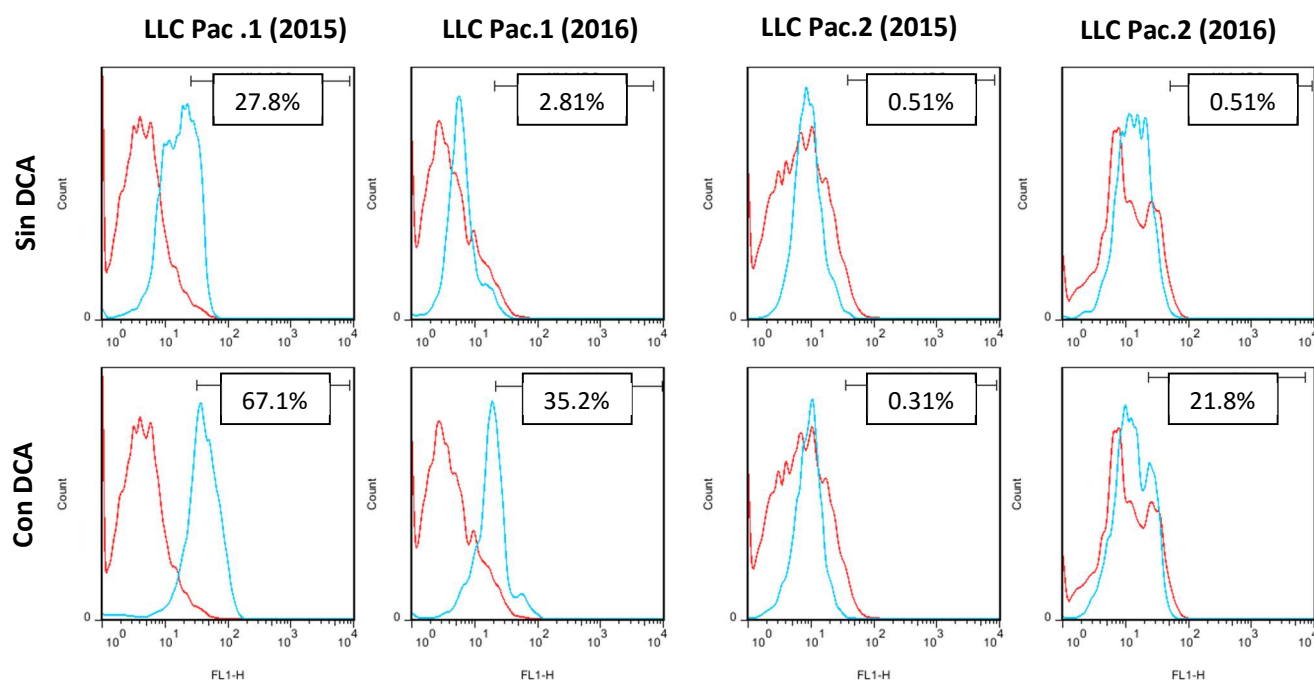


Figura 11: análisis de la expresión de HLA-ABC en presencia y ausencia de DCA en las muestras de leucemia LLC Pac.1 (2015), LLC Pac.1 (2016), LLC Pac.2 (2015), LLC Pac.2 (2016). Las células se cultivaron en presencia de DCA a una concentración de 5 mM durante 48 horas y, transcurrido este tiempo, se marcaron con anticuerpo anti-HLA-ABC conjugado con FITC durante 30 minutos y se analizaron mediante citometría de flujo. La gráfica roja representa el marcaje con un anticuerpo irrelevante, mientras que la línea azul hace referencia al marcaje con el anticuerpo de interés. Los números representan el porcentaje de células positivas en cada caso.

4.5.3 EFECTO DEL DCA EN LA EXPRESIÓN DE PD-L1

Como se muestra en la *figura 12*, se comprobó que la expresión de PD-L1 descendía en presencia de DCA, a excepción de la LLC Pac.1 (2015). En el caso de las muestras resistentes, las cuales mostraban unos valores superiores en ausencia de DCA en relación a los valores de las muestras sensibles, en presencia de DCA, la expresión de PD-L1 descendía a un valor del 2,33% en el caso de la LLC Pac.1 (2016) (con un valor de 43,9% en ausencia de DCA) y del 49,1% en el caso de la LLC Pac.2 (2016) (con un valor de 94,3% en ausencia de DCA).

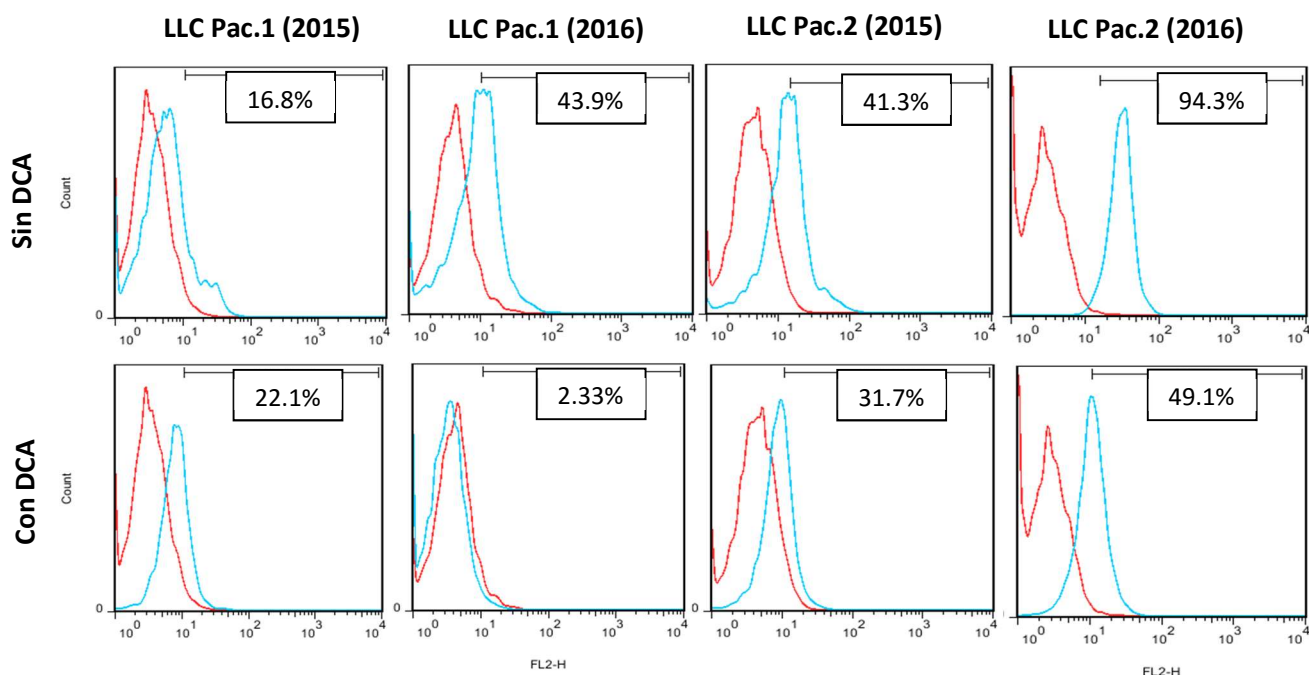


Figura 12: análisis de la expresión de PDL1 en presencia y ausencia de DCA en las muestras de leucemia LLC Pac.1 (2015), LLC Pac.1 (2016), LLC Pac.2 (2015), LLC Pac.2 (2016). Las células se cultivaron en presencia de DCA durante 48 horas y, transcurrido este tiempo, se marcaron con anticuerpo anti-PDL1 conjugado con PE durante 30 minutos y se analizaron mediante citometría de flujo. La gráfica roja representa el marcaje con un anticuerpo irrelevante, que sirvió como control de posibles marcajes inespecíficos mientras que la línea azul hace referencia al marcaje con el anticuerpo de interés. Los números representan el porcentaje de células positivas en cada caso.

4.6 EFECTO DEL DCA EN LA VIABILIDAD Y CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS DE LLC-B

Se llevó a cabo el análisis de la viabilidad y la concentración celular en las cuatro muestras de LLC-B en presencia y ausencia de DCA a las 24 y 48 horas de incubación. Como puede verse en las *figuras 13 y 14*, la presencia de esta droga metabólica, como ya se había demostrado previamente [39], inhibe el crecimiento de las células tumorales sin inducir muerte celular. Esto puede observarse en las muestras LLC Pac.1 (2015), LLC Pac.1 (2016) y LLC Pac.2 (2015). En esta última muestra, parece que la droga produce una reducción del número de células por debajo del nivel del control a las 48 horas. En el caso de la muestra LLC Pac.2 (2016), esto ocurre en ausencia de DCA a las 24 y 48 horas de cultivo y el DCA no tiene un efecto tóxico adicional.

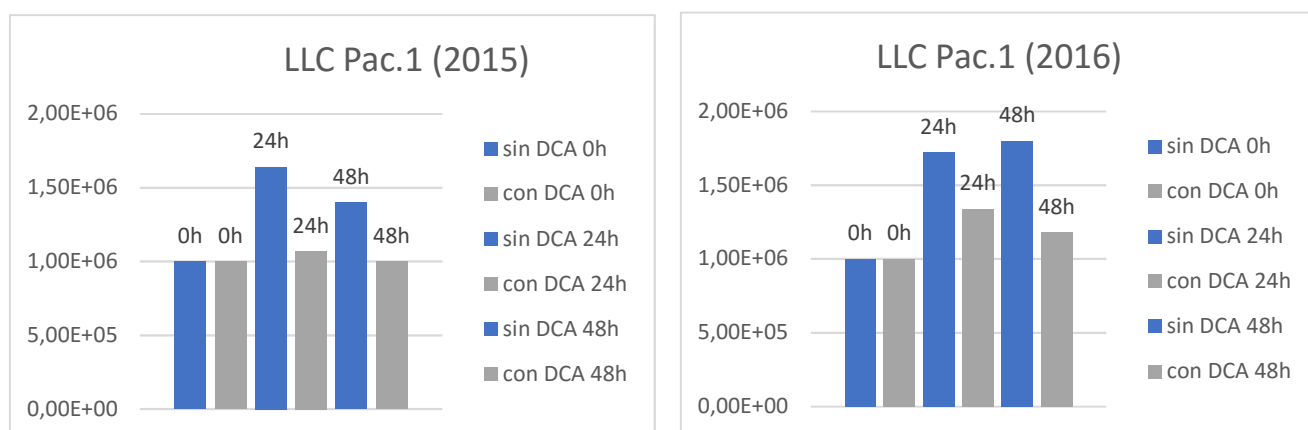


Figura 13: análisis del número total de células viables de LLC presentes en los cultivos celulares a las 0, 24 y 48 horas de la incubación en presencia de 5 mM de DCA y ausencia de DCA. Las barras azules representan las células incubadas en ausencia de DCA y las barras grises, las células incubadas en presencia de DCA.

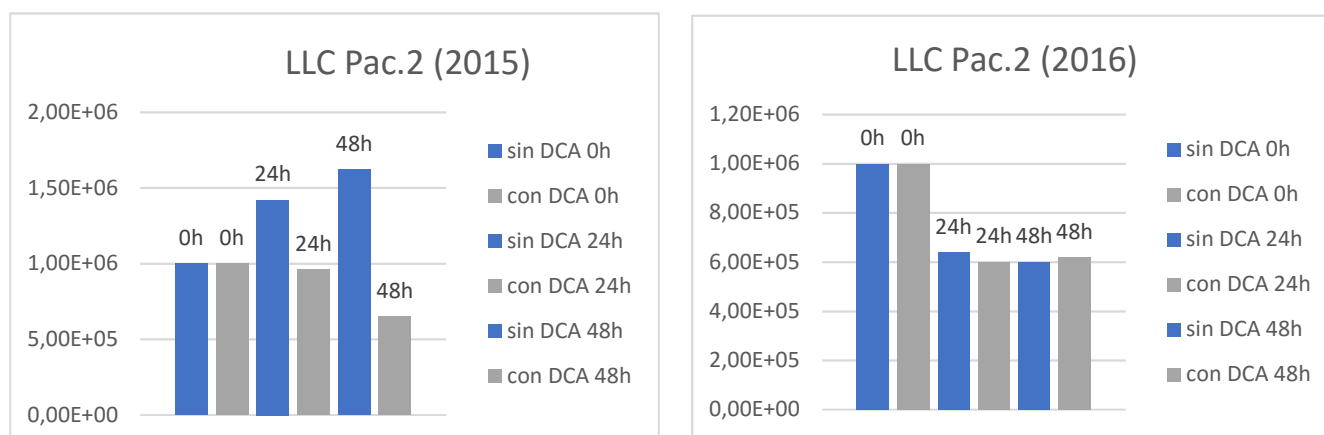


Figura 14: análisis del número total de células viables de LLC presentes en los cultivos celulares a las 0, 24 y 48 horas de la incubación en presencia de 5 mM de DCA y ausencia de DCA. Las barras azules representan las células incubadas en ausencia de DCA y las barras grises, las células incubadas en presencia de DCA.

4.7 ANÁLISIS DE LA MUESTRA DE LLC-B DEL PACIENTE 1 DE 2017 (LLC Pac.1 (2017))

En 2017, se obtuvo una nueva muestra fresca de LLC-B del paciente 1 (LLC Pac.1 (2017)) tras haber sido tratado con un inhibidor de la PI3K δ , denominado idelalisib. Se llevó a cabo el análisis de la expresión de PD-L1, así como ensayos de citotoxicidad en presencia de eNK de tres donantes diferentes.

4.7.1 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1

Como se muestra en la *figura 15*, se observa marcaje de PD-1 en esta muestra por encima del que se obtiene con el anticuerpo irrelevante, indicando que las células de LLC-B han perdido la expresión de PD-L1 observada en la muestra resistente de 2016.

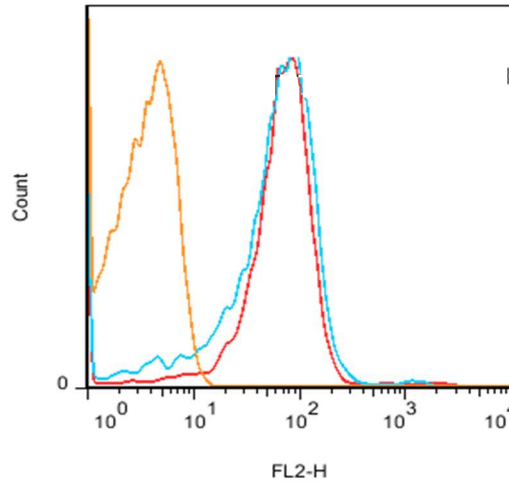


Figura 15: análisis de la expresión de PD-L1 en la muestra de leucemia LLC Pac.1 (2017). Las células se marcaron con un anticuerpo anti-PDL1 conjugado con PE y se analizaron mediante citometría de flujo. La gráfica naranja representa el control negativo, es decir, las células de LLC-B sin marcar con ningún anticuerpo, la gráfica roja representa el marcaje con un anticuerpo irrelevante, mientras que la línea azul representa el marcaje de las células con el anticuerpo anti-PDL1.

4.7.2 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD EN PRESENCIA DE eNK

Tras analizar la expresión de PD-L1, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad en presencia de eNK de tres donantes diferentes. Se realizaron también los mismos ensayos en presencia de DCA a concentración de 5 mM y 15 mM, y en presencia del anticuerpo bloqueante anti-PD1, Pembrolizumab.

Como se observa en la *figura 16*, la citotoxicidad fue muy elevada en todos los casos. En presencia del DCA y del anticuerpo bloqueante de PD-1, se observan resultados similares. Cabe destacar que las células eNK empleadas en estos ensayos corresponden a los donantes NK1, NK2 y NK3 mostrados en la sección 4.4, que muestran niveles de expresión diferentes de PD-1.

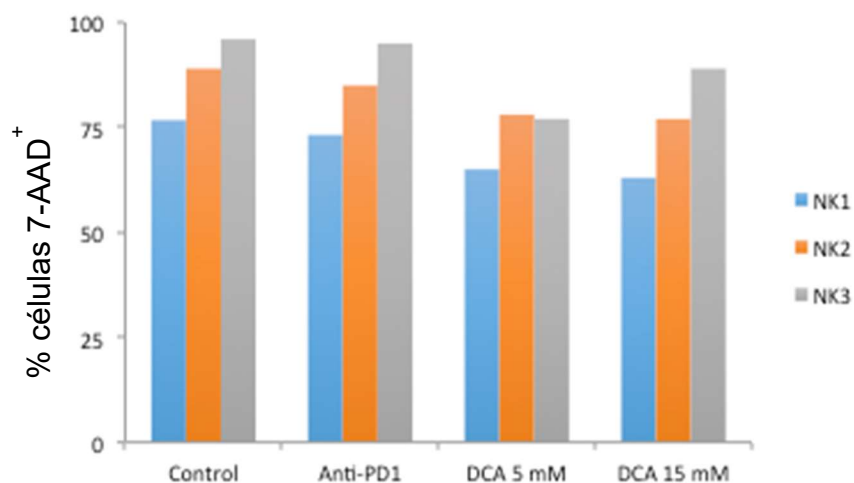


Figura 17: porcentajes de las células de LLC-B positivas para el marcaje con 7-AAD tras ser ensayadas frente a las células NK. Las células NK se expandieron durante 20 días en presencia de IL-2, IL-15 y células 721.221, se aislaron y marcaron con “Cell Tracker Green” (CTG) y se incubaron durante 4 horas a 37°C en una proporción 5:1 con las células de LLC Pac.1 (2017). Posteriormente, se marcaron con 7-AAD y se analizaron las células 7-AAD⁺ y CTG⁻ por citometría de flujo. Las barras azules, naranjas y grises representan, respectivamente, la citotoxicidad ejercida por las células NK de los donantes 1,2 ó 3, según se indica. Los ensayos se llevaron a cabo en ausencia (control) o presencia de 1 µg/ ml del anticuerpo bloqueante anti-PD1 o tras 48 horas de cultivo con DCA a 5 o 15 mM, según se indica.

5. DISCUSIÓN

La evasión de los tumores de la vigilancia del sistema inmune tiene gran importancia en el desarrollo de esta enfermedad. Por ello, el desarrollo de la inmunoterapia del cáncer está adquiriendo mucha relevancia [43]. Las células NK pueden llegar a ser una importante estrategia en el tratamiento de diversas neoplasias hematológicas, entre ellas la LLC-B [54].

Además, un trabajo previo de nuestro grupo ha demostrado que la activación y expansión de las células NK en presencia de IL-2, IL-15 y células estimuladoras 721.221 aumenta claramente su citotoxicidad sobre líneas celulares leucémicas y células de pacientes de LLC-B (Tania Calvo, comunicación personal; María Gascón, TFG Biotecnología, 2016). En distintos ensayos realizados previamente, se obtuvieron buenos resultados sobre varias muestras de LLC-B, observando una citotoxicidad elevada en experimentos de cuatro horas. Sin embargo, en el presente trabajo se ha observado que algunas de las muestras de pacientes de LLC-B presentaban resistencia a este tratamiento. Dado que dos de estas LLC-B habían sido inicialmente sensibles, se procedió a analizar la causa de esta resistencia adquirida.

Pensando que podría ser debida a la expresión en las células NK de KIR compatibles con el HLA-I de las leucemias, se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad en el cual se emplearon las células NK, previamente descongeladas, que habían sido utilizadas sobre las muestras iniciales y sensibles (LLC Pac.1 (2015) y LLC Pac.2 (2015)). Las muestras de LLC Pac.1 (2016) y LLC Pac.2 (2016) presentaban, de nuevo, un porcentaje de muerte inducida inferior al que presentaron las muestras sensibles. Por ello, se pensó que esta resistencia podría ser debida a una propiedad intrínseca adquirida con el tiempo por las células leucémicas. Además, se comprobó que ambos pacientes no poseen ninguna característica común en el estado de la enfermedad ni en el tratamiento recibido que pueda haber causado esta resistencia.

En consecuencia, se procedió al análisis de distintos marcadores de superficie de las leucemias, pensando que la interacción con sus correspondientes receptores presentes en las células NK podría ser el motivo de la resistencia.

En este sentido, se ha observado que las leucemias resistentes disminuyen la expresión de los receptores de activación llamados NCR. Esto es cierto para los tres NCR existentes: NKp30, NKp44 y NKp46. Por tanto, esta disminución se correlacionaría con la inhibición observada en la capacidad citotóxica de las eNK.

También se analizó la expresión de HLA-E, puesto que el aumento de su expresión, al unirse al receptor de inhibición NKG2A, implicaría una disminución en la función de las células NK. No se obtuvo un patrón común en ambas muestras leucémicas, sino que en

el caso de la LLC Pac.1 (2016) se produjo una disminución de la expresión mientras que, en el caso de la LLC Pac.2 (2016), la expresión de HLA-E había aumentado con respecto a la muestra inicial y sensible, por lo cual la variación en este parámetro no puede correlacionarse con la resistencia observada.

Seguidamente, se llevó a cabo el estudio de la expresión de HLA-ABC, ya que produce una disminución en las funciones citotóxicas de las células NK al ligar a los KIR. Se observa una disminución de expresión en el caso de la LLC Pac.1 (2016) en relación a la muestra inicial y sensible LLC Pac.1 (2015), al igual que ocurría con la expresión de HLA-E. En cuanto a la muestra de LLC-B del otro paciente, no se observa cambio en la expresión de este marcador de superficie entre la muestra sensible (LLC Pac.2 (2015)) y la muestra resistente (LLC Pac.2 (2016)). Por consiguiente, las variaciones en la expresión de HLA-I no correlacionan con la resistencia observada.

Por otra parte, se analizó la expresión del ligando PD-L1 en las células de LLC-B y del receptor PD-1 en las células NK puesto que, en otras investigaciones, esta interacción parecía estar implicada en la resistencia de distintas células tumorales a la acción de los linfocitos T citotóxicos [54-56].

PD-1 es un receptor inhibitorio presente en células NK y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que aparece involucrado en la inmunosupresión por la unión a sus ligandos PD-L1 y PD-L2, siendo PD-L1 el de expresión más común [55]. Se observó en estudios anteriores que la expresión de PD-L1 era mayor en linfocitos de las células leucémicas con LLC-B que en otros donantes sanos de la misma edad. Parece que esta interacción afectaría al perfil de citoquinas secretadas por los linfocitos T, suprimiéndose la secreción de IFN- γ . La manipulación farmacológica de la unión entre PD-1 y PD-L1 podría contribuir a recuperar las funciones de las células T en el microambiente leucémico, pudiendo ser efectiva una terapia con el eje PD-1/PD-L1 como diana, combinado con otros agentes inmunomoduladores [56].

En otro estudio previo, se observó que los pacientes con LLC-B presentaban defectos en la formación de la sinapsis inmunológica [54]. Se vio que esto provocaba un fallo en la señal de activación de la GTPasa Rho, con los correspondientes problemas en la polimerización de la actina y formación de la sinapsis inmunológica en las poblaciones de células T. La sobreexpresión de estas moléculas inhibitoras, entre las cuales se encuentra el ligando PD-L1, está relacionada con un peor pronóstico de la enfermedad. Mediante citometría de flujo, se comprobó que la expresión de PD-L1 en las células leucémicas y de PD-1 en los linfocitos T CD3⁺ en pacientes con LLC-B se encuentra aumentada en comparación con los niveles de expresión observados en células de donantes sanos. El fármaco inmunomodulador llamado Lenalidomida produce una disminución de la expresión de PD-L1 en células de mieloma múltiple. Al emplearlo en ensayos con células de LLC-B, se produjo la disminución de PD-L1 y PD-1, por lo que, en

principio, estaría evitando la supresión inmunitaria inducida por el tumor. Además, favoreció un aumento de la actividad citotóxica de los CTL [54].

Dado que el receptor PD-1 también es expresado en las células NK, podría ser que una de las causas de la resistencia adquirida por parte de las células leucémicas se debiera a la expresión de PD-L1 en las LLC-B resistentes y a la interacción con su receptor, al igual que se ha descrito en los linfocitos T. Hay pocos datos sobre el papel de PD1 en la acción antitumoral de las células NK. En un estudio previo, se emplearon células NK expandidas durante 21 días mediante un protocolo en el cual se empleaba un anticuerpo anti-CD16 e IL-2. Se comprobó que las células NK presentaban un mayor efecto citotóxico cuando la expansión se realizaba también en presencia de un anticuerpo bloqueante de anti-PD-1. Sin embargo, no se utilizó el anticuerpo bloqueante anti-PD1 en los ensayos de citotoxicidad sobre la línea de mieloma múltiple RPMI-8226 [57].

Tras analizar la expresión del ligando PD-L1 en las muestras sensibles y resistentes, se comprobó, como se observa en la *figura 8*, que aumentaba considerablemente en las dos muestras resistentes en comparación con las sensibles. Así pues, esta podría ser una de las causas de la resistencia a las células NK, siempre que éstas expresen el receptor correspondiente PD-1.

La expresión de PD-1 en las células NK a nivel basal presentaba valores diferentes dependiendo del donante del que procedieran, observando una expresión del 5% en la muestra NK3 o del 63.4% en la muestra NK2 (*figura 9*). Dado que los ensayos de citotoxicidad frente a células leucémicas se llevaban a cabo tras la activación y expansión durante 20 días de las células NK, se pensó que la expresión de PD-1 podría variar y verse aumentada transcurrido este tiempo. Por ello, se analizó también la expresión a día 20, comparando los resultados con lo obtenido a día 0 en cada caso. De los 6 donantes analizados, se comprobó que, en dos de ellos (NK1 y NK5), había aumentado la expresión de este receptor y, solo en uno de los casos (NK2), había disminuido en comparación con el valor obtenido a día 0 (*figura 9*). En los otros tres casos analizados (NK3, NK4, NK6), la expresión de PD1 parecía no variar de manera significativa entre día 0 y día 20. Por tanto, parece que la variación en la expresión de PD1 en las células NK tras la expansión y activación de éstas varía en cada caso, sin observarse un patrón determinado.

Por tanto, para asegurar esta posibilidad, sería necesario llevar a cabo ensayos de citotoxicidad empleando las distintas células NK expandidas, comprobando si producen el mismo efecto citotóxico sobre las muestras de LLC-B resistentes o si, por el contrario, aquellas que expresan un menor nivel de PD-1 permiten obtener un mayor porcentaje de muerte. Dado que no pudieron obtenerse más muestras de sangre de las leucemias resistentes analizadas (LLC Pac.1 (2016) y LLC Pac.2 (2016)), no fue posible realizar este ensayo.

Por otra parte, si la causa de la resistencia era debida a la interacción entre PD-1 y su ligando PD-L1, sería necesario bloquear esta unión o disminuir los niveles de expresión del ligando en las células de LLC-B. Una opción podría ser el empleo de distintos fármacos, como la Lenalidomida nombrada previamente [53], o anticuerpos bloqueantes como pembrolizumab o nivolumab [49]. Se intentó llevar a cabo estos ensayos con muestras congeladas de las leucemias y nuevas células NK, pero el nivel de muerte basal fue muy elevado y no pudieron obtenerse resultados concluyentes.

Sin embargo, en 2017, se obtuvo una nueva muestra fresca de LLC-B del paciente 1. Este paciente había sido tratado previamente con idelalisib, un inhibidor de la PI3K δ , cuyo uso en el tratamiento de la LLC-B ha sido recientemente aprobado [58]. Se observó que se había perdido la expresión de PD-L1, en comparación con lo obtenido en la muestra anterior de 2016 del mismo paciente resistente a las células eNK, donde la expresión de PD-L1 había sido de un 43.9%. Esto podría estar relacionado con el tratamiento recibido, puesto que idelalisib es un inhibidor de la PI3K, la cual aparece implicada en la transducción de señal del IFN- γ , que induce la expresión de PD-L1 en los tumores y es una observación que podría tener interés clínico [55, 59]. La nueva muestra del paciente 1 en 2017 se ensayó frente a células eNK de tres donantes y se obtuvo una citotoxicidad elevada en los tres casos, correlacionando con la pérdida de expresión de PD-L1. Es decir, estos datos sugieren que la aparición de resistencias a las células eNK están relacionadas con la expresión de PD-L1, pero no lo demuestran fehacientemente.

Por otra parte, teniendo en cuenta que el DCA produce la inhibición del crecimiento en muchas células tumorales [36] así como el aumento de la expresión del MHC-I en células tumorales, se pensó que podría tener algún efecto sobre la expresión de PD-L1, por lo que se llevaron a cabo distintos ensayos.

En el caso de HLA-E, se observa una disminución en los niveles de expresión en todas las muestras de LLC-B en presencia de DCA. Por tanto, esto podría estar evitando la inhibición de las funciones de las células NK provocadas por la unión del HLA-E a su receptor NKG2A. En cuanto a la expresión de HLA-ABC, se obtiene el resultado contrario a lo observado en el caso de HLA-E. En presencia de DCA, aumenta la expresión en tres de las cuatro muestras analizadas (LLC Pac.1 (2015), LLC Pac.1 (2016) y LLC Pac.2 (2016)) y permanece prácticamente invariable en la muestra de LLC Pac.2 (2015). Este resultado está de acuerdo con estudios anteriores [39, 53].

Además, se observó que la expresión de PD-L1 había disminuido en presencia de DCA en las dos muestras de LLC-B resistentes. Esto hizo pensar que si la resistencia adquirida a las células NK era debida a la interacción de PD-L1 con su receptor, el DCA podría revertir esta resistencia. Se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad en presencia de eNK, de DCA y del anticuerpo bloqueante anti-PD1, Pembrolizumab. Sin embargo, no pudo demostrarse su efecto, puesto que la muerte basal fue muy elevada y no pudimos considerar los resultados fiables.

Estos ensayos se llevaron a cabo también sobre la muestra fresca del paciente 1 obtenida en 2017. La elevada citotoxicidad de las células eNK de tres donantes sobre estas células de LLC-B no se vio afectada ni por la incubación previa con DCA ni por la presencia del anticuerpo bloqueante anti-PD1 durante los ensayos. Este resultado podría deberse a la elevada citotoxicidad basal observada en estos ensayos.

6. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

1. Tras analizar la expresión de distintos marcadores en las células de LLC-B, se observa que los NCR han disminuido su expresión en las muestras resistentes a las células eNK, mientras que la expresión de PD-L1 ha aumentado. En cuanto a la expresión de HLA-E y HLA-ABC, no se observan tendencias significativas.
 2. De las seis muestras de células NK analizadas, dos mostraron un aumento en la expresión de PD-1 a los 20 días de expansión y activación, en una de ellas disminuyó la expresión y tres mostraron valores similares a día 0 y a día 20. Por tanto, parece que la expresión de PD1 en las células NK no sigue un patrón fijo.
 3. La droga metabólica DCA produce una disminución en la expresión de PD-L1 en las muestras de LLC-B resistentes. Sin embargo, no pudo demostrarse su efecto en ensayos de citotoxicidad.
 4. Como se había demostrado previamente, el DCA inhibe el crecimiento de las células tumorales, pero no induce muerte celular, lo cual se observa en tres de las cuatro muestras analizadas (LLC Pac.1 (2015), LLC Pac.1 (2016) y LLC Pac.2 (2015)). En el caso de la muestra LCC Pac.2 (2016), el DCA no parece tener un efecto tóxico adicional.
 5. Tras el tratamiento del paciente 1 con idelalisib (2017), las células de LLC-B han perdido la expresión de PD-L1, lo cual puede estar producido por este tratamiento.
 6. La citotoxicidad de las células NK sobre la leucemia LLC Pac.1 (2017), tras el tratamiento con idelalisib, fue muy elevada y el anticuerpo bloqueante anti-PD1 Pembrolizumab o el DCA no tuvieron ningún efecto adicional.
-
1. After analysing the expression of different markers in LLC-B cells, we observed that NCRs have decreased their expression in resistant samples to eNK cells, whereas PD-L1 expression has increased. As for the expression of HLA-E and HLA-ABC, no significant trends are observed.
 2. Of the six samples of NK cells analysed, two of them showed an increase in PD-1 expression at 20 days of expansion and activation, in one of them decreased this expression and three of them showed similar values in day 0 and day 20. Therefore, it seems that the expression of PD1 in eNK cells does not follow a fixed pattern.

3. The metabolic drug DCA reduces the expression of PD-L1 in resistant LLC-B samples. However, its effect could not be demonstrated in cytotoxicity assays.
4. As previously demonstrated, DCA inhibits the growth of tumor cells but does not induce cell death, which is observed in three of the four samples analyzed (LLC Pac.1 (2015), LLC Pac.1 (2016) and LLC Pac.2 (2015)). In the case of the LCC sample Pac.2 (2016), DCA does not appear to have an additional toxic effect.
5. After treatment of the patient 1 with idelalisib (2017), LLC-B cells have lost PD-L1 expression, an effect that could be related with the treatment.
6. The cytotoxicity of NK cells on LLC Pac.1 (2017) cells, after treatment with idelalisib, was very high and the anti-PD1 blocking antibody pembrolizumab or DCA had no additional effect.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Pandya, P.H., et al., *The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches*. Journal of Immunology Research, 2016. **2016**.
2. Cheng, M., et al., *NK cell-based immunotherapy for malignant diseases*. Cellular & molecular immunology, 2013. **10**(3): p. 230-252.
3. Borghaei, H., M.R. Smith, and K.S. Campbell, *Immunotherapy of cancer*. European journal of pharmacology, 2009. **625**(1): p. 41-54.
4. Anel, A., et al., *Protein kinase C- θ (PKC- θ) in natural killer cell function and anti-tumor immunity*. 2012.
5. Cerwenka, A. and L.L. Lanier, *Natural killer cells, viruses and cancer*. Nature Reviews Immunology, 2001. **1**(1): p. 41-49.
6. Ljunggren, H.-G. and K.-J. Malmberg, *Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(5): p. 329-339.
7. Cho, D. and D. Campana, *Expansion and activation of natural killer cells for cancer immunotherapy*. The Korean journal of laboratory medicine, 2009. **29**(2): p. 89-96.
8. Farag, S.S. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development and biology*. Blood reviews, 2006. **20**(3): p. 123-137.
9. Sanchez, C., et al., *Natural killer cells and malignant haemopathies: a model for the interaction of cancer with innate immunity*. Cancer immunology, immunotherapy, 2011. **60**(1): p. 1-13.
10. Caligiuri, M.A., *Human natural killer cells*. Blood, 2008. **112**(3): p. 461-469.
11. Chester, C., K. Fritsch, and H.E. Kohrt, *Natural killer cell immunomodulation: targeting activating, inhibitory, and co-stimulatory receptor signaling for cancer immunotherapy*. Frontiers in immunology, 2015. **6**.
12. Diefenbach, A. and D.H. Raulet, *Strategies for target cell recognition by natural killer cells*. Immunological reviews, 2001. **181**(1): p. 170-184.
13. Robertson, M.J. and J. Ritz, *Biology and clinical relevance of human natural killer cells*. Blood, 1990. **76**(12): p. 2421-2438.
14. López-Botet, M., A. Angulo, and M. Guma, *Natural killer cell receptors for major histocompatibility complex class I and related molecules in cytomegalovirus infection*. Tissue antigens, 2004. **63**(3): p. 195-203.
15. Fujimiya, Y., L.A. Babiuk, and B.T. Rouse, *Direct lymphocytotoxicity against herpes simplex virus infected cells*. Canadian journal of microbiology, 1978. **24**(9): p. 1076-1081.
16. Morvan, M.G. and L.L. Lanier, *NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks*. Nature Reviews Cancer, 2016. **16**(1): p. 7-19.
17. Martínez-Lostao, L., A. Anel, and J. Pardo, *How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells?* 2015, AACR.
18. Martinez-Lostao, L., et al., *Targeting the Apo2L/TRAIL system for the therapy of autoimmune diseases and cancer*. Biochemical pharmacology, 2012. **83**(11): p. 1475-1483.
19. Raulet, D.H. and N. Guerra, *Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(8): p. 568-580.
20. Long, E.O., et al., *Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition*. Annual review of immunology, 2013. **31**: p. 227-258.
21. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicologic pathology, 2007. **35**(4): p. 495-516.

22. Ouyang, L., et al., *Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis*. Cell proliferation, 2012. **45**(6): p. 487-498.
23. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205-219.
24. Marzo, I. and J. Naval, *Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy*. Biochemical pharmacology, 2008. **76**(8): p. 939-946.
25. Altieri, D.C., *The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy*. Trends in molecular medicine, 2001. **7**(12): p. 542-547.
26. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-776.
27. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-724.
28. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. Cancer research, 2010. **70**(14): p. 5649-5669.
29. Sahai, E., *Mechanisms of cancer cell invasion*. Current opinion in genetics & development, 2005. **15**(1): p. 87-96.
30. Meacham, C.E. and S.J. Morrison, *Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 328.
31. Lazebnik, Y., *What are the hallmarks of cancer?* Nature reviews. Cancer, 2010. **10**(4): p. 232.
32. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
33. Vander Heiden, M., L. Cantley, and C. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science (New York, NY), 2009. **324**(5930): p. 1029-1033.
34. Ngo, D.C., et al., *Introduction to the molecular basis of cancer metabolism and the Warburg effect*. Molecular biology reports, 2015. **42**(4): p. 819-823.
35. Hsu, P.P. and D.M. Sabatini, *Cancer cell metabolism: Warburg and beyond*. Cell, 2008. **134**(5): p. 703-707.
36. Michelakis, E., L. Webster, and J. Mackey, *Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer*. British journal of cancer, 2008. **99**(7): p. 989-994.
37. Allende-Vega, N., et al., *The presence of wild type p53 in hematological cancers improves the efficacy of combinational therapy targeting metabolism*. Oncotarget, 2015. **6**(22): p. 19228-19245.
38. Agnoletto, C., et al., *Sodium dichloroacetate exhibits anti-leukemic activity in B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and synergizes with the p53 activator Nutlin-3*. Oncotarget, 2014. **5**(12): p. 4347.
39. Catalán, E., et al., *MHC-I modulation due to changes in tumor cell metabolism regulates tumor sensitivity to CTL and NK cells*. Oncoimmunology, 2015. **4**(1): p. e985924.
40. Matutes, E. and A. Polliack, *Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia*. Reviews in clinical and experimental hematology, 2000. **4**(1): p. 22-47.
41. Ghia, P., A.J. Ferreri, and F. Caligaris-Cappio, *Chronic lymphocytic leukemia*. Critical reviews in oncology/hematology, 2007. **64**(3): p. 234-246.
42. Byrd, J.C., S. Stilgenbauer, and I.W. Flinn, *Chronic lymphocytic leukemia*. ASH Education Program Book, 2004. **2004**(1): p. 163-183.
43. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nature immunology, 2002. **3**(11): p. 991-998.
44. Koebel, C.M., et al., *Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state*. Nature, 2007. **450**(7171): p. 903-907.
45. Chen, D.S. and I. Mellman, *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 1-10.

46. Sehgal, A., T.L. Whiteside, and M. Boyiadzis, *Programmed death-1 checkpoint blockade in acute myeloid leukemia*. Expert opinion on biological therapy, 2015. **15**(8): p. 1191-1203.
47. Blank, C. and A. Mackensen, *Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion*. Cancer immunology, immunotherapy, 2007. **56**(5): p. 739-745.
48. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nature Reviews Cancer, 2012. **12**(4): p. 252-264.
49. Ribas, A., *Adaptive immune resistance: how cancer protects from immune attack*. Cancer discovery, 2015. **5**(9): p. 915-919.
50. 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): p. e991613.
51. Sánchez-Martínez, D., et al., *activated allogeneic nK cells Preferentially Kill Poor Prognosis B-cell chronic lymphocytic leukemia cells*. Frontiers in immunology, 2016. **7**.
52. Krzywinska, E., et al., *Identification of anti-tumor cells carrying natural killer (NK) cell antigens in patients with hematological cancers*. EBioMedicine, 2015. **2**(10): p. 1364-1376.
53. Charni, S., et al. *Oxidative phosphorylation induces de novo expression of the MHC class I in tumor cells through the ERK5 pathway*. The Journal of Immunology, 2010. **185**(6): p. 3498-3503.
54. Ramsay, A. G., et al. *Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer*. Blood, 2012. **120**(7): p. 1412-1421.
55. Boussiotis, V. A. *Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway*. New England Journal of Medicine, 2016. **375**(18): p. 1767-1778.
56. Brusa, D., et al. *The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia*. Haematologica, 2013. **98**(6): p. 953-963.
57. Guo, Y., et al. *PD1 blockade enhances cytotoxicity of in vitro expanded natural killer cells towards myeloma cells*. Oncotarget, 2016. **7**(30): 48360.
58. Arnason, J. E. and J. R. Brown. *Targeting B Cell Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia*. Current Oncology Reports, 2017. **19**(9): 61.
59. Zhang, X., et al. *PD-L1 induced by IFN- γ from tumor-associated macrophages via the JAK/STAT3 and PI3K/AKT signaling pathways promoted progression of lung cancer*. International Journal of Clinical Oncology, 2017. 1-8.