



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Optimización de la expresión de un receptor quimérico de antígeno (CAR) en células NK frente a células de cáncer colorrectal humano

Optimization of a chimeric antigen receptor (CAR) gene expression in NK cells against human colorectal cancer cells

Autora:

Sandra Hidalgo Arizón

Directores:

Julián Pardo Jimeno

Pilar M^a Lanuza Morte

Máster Universitario en Biología Molecular y Celular

Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública

Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA)

Curso académico 2018-2019

Listado de abreviaturas

Término	Abreviatura
2D	2 dimensiones
3D	3 dimensiones
7-AAD	7-aminoactinomicina D
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AML	Leucemia mieloide aguda
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
CAR	Receptor quimérico de antígeno
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
CCR	Cáncer colorrectal
CEICA	Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GalNAc	N-acetilgalactosamina
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-il]etanesulfónico
HBS	Tampón salino HEPES
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
LB	Luria Bertani
LTR	Repetición terminal larga
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
MUC	Mucina
NK	Asesinas naturales (del inglés <i>Natural killer</i>)
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1
PBS	Tampón fosfato salino
PEI	Polietilénimina
PFA	Paraformaldehído
RPMI	Instituto Roswell Park Memorial
scFv	Fragmento de la región variable de cadena sencilla
SFB	Suero fetal bovino
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante β 1

TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	T reguladoras
VNTR	Número variable de repeticiones en tándem
VSV-G	Glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular
YFP	Proteína fluorescente amarilla

Contenido

Resumen / Abstract	1
1. Introducción	3
1.1. El cáncer colorrectal.....	3
1.2. El microambiente tumoral.....	4
1.3. El sistema inmunitario y el cáncer	4
1.3.1. Respuesta anti-tumoral del sistema inmune	5
1.3.2. Antígenos tumorales: la familia de mucinas.	6
1.4. Las células NK.....	9
1.4.1. Receptores de células NK.....	10
1.4.2. Mecanismos de citotoxicidad de las células NK.....	11
1.5. Células NK como terapia contra el cáncer	12
1.6. Edición genética de células NK para el tratamiento del cáncer. Los receptores quiméricos de antígeno (CAR)	14
2. Antecedentes y objetivos	17
3. Materiales y métodos	20
3.1. Técnicas de biología molecular.....	20
3.1.1. Plásmidos	20
3.1.2. Preparación de medios y cultivos bacterianos.....	21
3.1.3. Obtención de bacterias competentes y transformación bacteriana.....	22
3.1.4. Extracción y cuantificación de ADN plasmídico	23
3.1.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	23
3.2. Cultivos celulares	23
3.2.1. Líneas celulares	23
3.2.2. Mantenimiento de los cultivos celulares	24
3.2.3. Congelación y descongelación de células	25
3.2.4. Contaje y determinación de la viabilidad celular	25
3.2.5. Cultivos celulares en 3D. Generación de esferoides	25
3.3. Obtención y expansión de células mononucleares de sangre periférica humana.....	26
3.3.1. Aislamiento y cultivo	26
3.3.2. Separación de poblaciones celulares mediante MACS®	27
3.3.3. Caracterización de las poblaciones celulares	27
3.4. Transfección de células empaquetadoras	27
3.4.1. Transfección mediante el método de fosfato de calcio con el tampón HBS	27
3.4.2. Transfección con el reactivo PEI.....	28
3.5. Transfección lentiviral para la obtención de líneas celulares estables.	28
3.5.1. Producción de partículas virales.....	28

3.5.2.	Infección lentiviral de células eucariotas	29
3.5.3.	Selección de líneas celulares estables mediante dilución límite	29
3.6.	Caracterización de la expresión superficial de la glicoproteína MUC1 en diferentes líneas celulares	29
3.7.	Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> de la línea NK-92 frente a diferentes líneas celulares tumorales.	30
3.7.1.	Marcaje de la línea celular NK-92 mediante la sonda eFluor670	30
3.7.2.	Citotoxicidad <i>in vitro</i> en cultivos 2D	30
3.7.3.	Citotoxicidad <i>in vitro</i> en cultivos 3D	31
3.8.	Cuantificación de la producción de TGF- β 1 en líneas celulares de cáncer colorrectal	31
4.	Resultados	32
4.1.	Amplificación y purificación de plásmidos.....	32
4.2.	Evaluación de protocolos de transfección de células empaquetadoras	34
4.3.	Optimización de un protocolo de transfección para la generación de lentivirus.....	35
4.3.1.	Confirmación de la selección del agente de transfección de células empaquetadoras	35
4.3.2.	Selección de la línea celular empaquetadora más eficaz.....	36
4.3.3.	Selección de policones para el proceso de infección.....	37
4.4.	Infección de células NK-92.....	38
4.5.	Aislamiento, expansión e infección de células NK primarias	39
4.6.	Evaluación de la transfección de pCCL-MUC1	41
4.7.	Análisis de la expresión de MUC1 en diferentes líneas celulares de CCR	42
4.8.	Evaluación de la actividad citotóxica de NK-92 contra líneas de CCR	43
4.8.1.	Estudio de la capacidad citotóxica en cultivos 2D	43
4.8.2.	Determinación de la citotoxicidad de NK-92 frente a cultivos 3D de CCR.....	44
4.9.	Cuantificación de la producción de TGF- β 1 en células de CCR.....	47
4.10.	Obtención de una línea de HCT-116 que exprese de forma estable genes reporteros	48
5.	Discusión	49
6.	Conclusiones / Conclusions	55
7.	Bibliografía	57
Anexos.....		61
Anexo 1 - Materiales y aparatos		62
Anexo 2 - Tampones.....		64
Anexo 3 - Plásmidos		65
Anexo 4 – Evaluación de la citotoxicidad por citometría de flujo.....		65

Resumen

El cáncer colorrectal (CCR) es una patología que provoca la muerte de un gran número de personas en todo el mundo. El uso de células inmunológicas con potencial citotóxico, como las células NK, modificadas genéticamente mediante receptores quiméricos de antígeno (CARs), se ha propuesto como una buena alternativa para su tratamiento. En esta línea, el antígeno Tn de MUC1 puede ser una buena opción para el desarrollo de CARs dado que se encuentra en células tumorales y no en las sanas.

Las células NK se caracterizan por su difícil manipulación genética, por ello, el objetivo principal de esta investigación es optimizar de un protocolo de transfección lentiviral de células NK. Se ha establecido un método que logra eficiencias del 14-19%, de infección, como máximo, en la línea celular NK-92 con un gen reportero. No obstante, no se ha logrado la expresión exitosa de un CAR de 4ª generación anti-Tn de MUC1, probablemente debido a factores asociados con la propia construcción génica.

Asimismo, se han realizado experimentos adicionales para poder evaluar y caracterizar las futuras CAR-NK. En este sentido, con el objetivo de determinar la capacidad citotóxica adquirida por la expresión del CAR, se estudió la citotoxicidad de la línea NK-92 no transfectada frente a cultivos de CCR en 2D y 3D; mostrando resultados moderados en 2D y apenas efectividad en 3D

Por otra parte, se trató de caracterizar la expresión de MUC1 en cultivos 2D y 3D en diferentes células de CCR, pero sin éxito debido a las características de los anticuerpos utilizados. Por último, se evaluó la expresión de TGF- β en células de CCR, para, en un futuro, poder valorar la citotoxicidad de células CAR-NK modificadas con un segundo CAR diseñado contra esta citoquina.

En definitiva, aunque no se ha logrado la modificación genética de células NK con CARs, se han realizado avances tanto en la optimización de la producción e infección lentiviral, como en el desarrollo de experimentos de caracterización.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is a pathology that causes the death of a large number of people around the world. The use of immunological cells with cytotoxic potential, such as NK cells, genetically modified by chimeric antigen receptors (CARs), has been proposed as a good alternative for its treatment. In this line, the MUC1Tn antigen could be a good option for CARs development due to the fact that it is found in tumor cells and not in healthy cells.

The genetic manipulation of NK cells is difficult, therefore, the main objective of this research is the optimization of a lentiviral transfection protocol for NK cells. A method that achieves infection efficiencies with a reporter gene up to 14-19% has been established. However, the 4th generation CAR anti-Tn of MUC1 expression was unsuccessful, probably due to factors associated with the gene construct itself.

Moreover, additional experiments have been carried out in order to evaluate and characterize the future CAR-NK cells. In order to determine the cytotoxic capacity acquired by the expression of CAR, the cytotoxicity of the non-transfected NK-92 line was studied against CRC cultures in 2D and 3D; showing moderate results in 2D and hardly effect in 3D

In addition, we tried to analyze the expression of MUC1 in 2D and 3D cultures in different CRC cells without success due to the characteristics of the antibodies used. Finally, the expression of TGF- β in CRC cells was evaluated, in order to assess the cytotoxicity of modified CAR-NK cells with a second CAR designed against this cytokine in the future.

To sum up, although genetic modification of NK cells with CARs has not been achieved, advances have been made in the optimization of lentiviral production and infection, and in the development of NK cells characterization experiments.

1. Introducción

1.1. El cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) se encuentra entre las principales causas de mortalidad y morbilidad vinculadas con el cáncer en todo el mundo, por lo que supone un importante problema de salud pública. A nivel mundial, en 2018, se detectaron un total de 1.85 millones de nuevos casos y se registraron 880.000 muertes a casusa de esta enfermedad, lo que implica un 11.5% de la mortalidad relacionada con el cáncer. Actualmente, entre los hombres, es el tercer tipo de cáncer más común, después de los tumores de próstata y pulmón; y en el caso de las mujeres, son los segundos tumores más frecuentes tras los de mama (1, 2). Las razones que explican la elevada incidencia de esta enfermedad incluyen: el envejecimiento de la población, los malos hábitos alimenticios, el tabaquismo, la baja actividad física y la obesidad (3). Existe una amplia variación geográfica asociada con la incidencia del CCR, con casi el 55% de los casos en los países más desarrollados, lo que se atribuye a las diferentes exposiciones dietéticas y ambientales, factores fundamentales para la aparición de esta patología por encima de la susceptibilidad determinada genéticamente (2).

En cuanto a su etiología, el CCR es una enfermedad que afecta al sistema gastrointestinal en las regiones del colon y el recto. El epitelio intestinal tiene una alta tasa de renovación celular, lo que lo convierte un punto susceptible para las transformaciones malignas. Esto origina la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que activan oncogenes e inactivan genes supresores de tumores y/o relacionados con mecanismos de reparación del ADN (4). Dependiendo del origen de la mutación, los carcinomas colorrectales se pueden clasificar como esporádicos, hereditarios y familiares.

Las mutaciones puntuales, que aparecen durante la vida, no se asocian con síndromes hereditarios y solo afectan a células individuales y sus descendientes. Los cánceres derivados de mutaciones puntuales se denominan esporádicos y representan el 70% de todos los cánceres colorrectales. La patogenia molecular del cáncer esporádico es diversa, no obstante, aproximadamente el 70% de los casos siguen una sucesión específica de mutaciones que posteriormente se traducen en una secuencia morfológica específica (4). La primera mutación ocurre en el gen APC, un gen supresor de tumores, regulador de la vía de señalización de WNT. Esto causa la aparición de una poliposis adenomatosa que provoca la formación de adenomas no malignos, también llamados pólipos. Aproximadamente el 15% de esos adenomas se transformarán al estado de carcinoma dentro de un período de diez años ya que esta mutación en APC es seguida por mutaciones en KRAS, TP53, SMAD4, CTNNB1, BRAF y DCC entre otras (4).

Los cánceres hereditarios representan solo el 5% de todos los casos de CCR. Son causados por mutaciones hereditarias definidas que provocan patologías que predisponen a un mayor riesgo de sufrir esta enfermedad. Con el fin de generar una clasificación más precisa de los

cánceres hereditarios, se han establecido dos grupos: con poliposis y sin poliposis. La variante con poliposis implica principalmente la poliposis adenomatosa familiar (5). En contraste, el CCR hereditario sin poliposis está relacionado con mutaciones en los mecanismos de reparación del ADN, como el síndrome de Lynch, que es causado por mutaciones hereditarias en uno de los alelos que codifican proteínas reparadoras del ADN (6).

El CCR familiar supone aproximadamente el 25% de todos los casos y también es causado por mutaciones heredadas, aunque no se pueden definir de forma precisa como en el caso de los hereditarios (5).

Por último, existe un tipo de CCR que se denomina asociado a colitis, y el cual se origina debido a procesos inflamatorios crónicos en el intestino de personas con una enfermedad inflamatoria intestinal denominada colitis ulcerosa. En este caso, la secuencia de mutaciones es similar a la indicada anteriormente, pero el desencadenante es la respuesta inflamatoria que origina la transformación celular del epitelio (7).

En definitiva, la patogenia molecular del CCR es heterogénea. El conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de este cáncer es clínicamente importante porque están íntimamente relacionados con el pronóstico y la respuesta al tratamiento del paciente. Cuanto más profundo sea el conocimiento de esta patología a nivel genético y molecular, podrán desarrollarse terapias específicas de un modo más eficaz.

1.2. El microambiente tumoral

Al igual que la mayoría de las neoplasias malignas sólidas, los tumores colorrectales son estructuras complejas. Las células transformadas son las principales responsables de la formación del tumor y reciben el nombre de parénquima tumoral. No obstante, en el desarrollo de los tumores están implicados otros elementos que conforman un microambiente complejo, constituido por componentes celulares y no celulares, lo que es conocido como estroma tumoral o microentorno tumoral. Los componentes celulares incluyen células inmunitarias, células vasculares y células mesenquimales, en su mayoría, fibroblastos. El componente no celular está formado por proteínas de la matriz extracelular, como diferentes tipos de colágeno, laminina, fibronectina y proteoglicanos, que facilitan las interacciones entre las proteínas y son ligandos para las proteínas de la superficie celular (8).

1.3. El sistema inmunitario y el cáncer

El sistema inmunológico tiene un papel complejo y multifacético en el cáncer, que afecta a todos los aspectos de la enfermedad, desde la carcinogénesis hasta el tratamiento. Las células inmunitarias pueden actuar como supresores de la iniciación y progresión tumoral, pero también como promotores de la proliferación y la metástasis, bien bloqueando las células inmunológicas con actividad anti-tumoral o bien induciendo inflamación crónica

como en el caso de la colitis ulcerosa. Dentro del microambiente tumoral, se encuentran diversos tipos de células inmunes cuya composición es variable en función del origen del tumor, la ubicación y las características individuales del individuo. Tanto las células inmunes innatas (macrófagos, mastocitos, neutrófilos, células dendríticas, células supresoras derivadas de mieloides y células asesinas naturales (NK)) como las células inmunes adaptativas (linfocitos T y B) están presentes e interactúan con el tumor vía contacto directo y/o través de la señalización de quimiocinas y citoquinas, condicionando el comportamiento del tumor y su respuesta al tratamiento (9).

Entre los diferentes mecanismos pro-tumorales que evitan que los linfocitos T citotóxicos y las células NK puedan destruir el tumor, la liberación de factores inmunosupresores, como el TGF- β , principalmente por los linfocitos T reguladores (Treg) y por el parénquima tumoral, parece ser clave en el desarrollo del CRC (10, 11). Por un lado, la actividad homeostática del TGF- β tiene un efecto supresor de tumores, dirigiendo diversos tipos de células hacia la detención del ciclo celular y la apoptosis. Por otra parte, las cantidades excesivas de TGF- β en el medio extracelular inducen una señalización sostenida en las células tumorales. En particular, el TGF- β altera la homeostasis y mejora la progresión del tumor a través de su capacidad para revertir la diferenciación celular, suprimir el desarrollo y la actividad de células inmunitarias e, indirectamente, permitir el crecimiento vascular (12, 13).

1.3.1. Respuesta anti-tumoral del sistema inmune

La respuesta del sistema inmunitario contra el tumor es un concepto conocido como *inmunovigilancia del cáncer* (14). El sistema inmunológico, a través de sus mecanismos efectores innatos y adaptativos, es capaz de reconocer y erradicar células transformadas en las etapas iniciales de la carcinogénesis.

El reconocimiento por parte de las células inmunes innatas inicia una cascada inflamatoria que conduce a la presentación de antígenos específicos del tumor por parte de las células dendríticas y los macrófagos a las células T, activando una respuesta inmune adaptativa. Por otra parte, las células inmunes innatas, como las células NK, reconocen las células tumorales y participan en su destrucción activa y en la producción de citoquinas inflamatorias que favorecen el reclutamiento y activación de otras células innatas y la activación de la respuesta inmune adaptativa (9, 15).

Para que pueda desencadenarse la respuesta inmune adaptativa frente al tumor, como se ha mencionado anteriormente, es necesario que el tumor exprese antígenos tumorales que puedan ser reconocidos por los linfocitos T CD4⁺ o por los linfocitos T CD8⁺. Los antígenos tumorales son moléculas de distinta naturaleza: proteínas, glicoproteínas, glicolípidos o carbohidratos, expresados por las células tumorales, que pueden encontrarse directamente ancladas a la superficie celular o bien como péptidos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (MHC-I) o de tipo II (MHC-II) (16). Los primeros son

reconocidos por los linfocitos T CD8⁺ mientras que los segundos por los linfocitos T CD4⁺. La importancia del estudio de los antígenos tumorales radica en el hecho de que pueden ser utilizados como biomarcadores para el desarrollo de métodos de detección y evaluación de la progresión de la enfermedad, así como para la creación de terapias dirigidas.

1.3.2. Antígenos tumorales: la familia de mucinas.

Tal y como se ha citado anteriormente, la naturaleza de los antígenos tumorales puede ser de tipo glicoproteico. La modificación en la expresión de glicanos puede deberse a una alteración en sus vías de biosíntesis como consecuencia de los cambios sufridos en el conjunto de enzimas que se encargan de su formación: las glicosiltransferasas y las glicosilasas. La aparición de patrones de glicosilación aberrantes se puede asociar a múltiples factores relacionados con estas enzimas: desregulación a nivel epigenético, de transcripción, postranscripción y/o de chaperonas, actividad alterada, expresión modificada del aceptor del glicoconjugado, disponibilidad y abundancia de los donadores de nucleótidos de azúcar, cambios en la actividad de los transportadores de nucleótidos de azúcar y/o función inadecuada de la estructura del Golgi donde se albergan muchas de las glicosiltransferasas (17). Por lo tanto, son un gran abanico de factores los que pueden modificar la expresión de glicanos.

Uno de los tipos de glicoproteínas que se ven alteradas debido a los cambios genéticos, epigenéticos y bioquímicos de las células tumorales son las mucinas (MUC), proteínas fuertemente O-glicosiladas, generalmente expresadas en la superficie apical de las células epiteliales. Están presentes en el tracto digestivo, respiratorio y en los epitelios secretores de diferentes órganos como el riñón, el hígado y el páncreas. Las funciones canónicas de las mucinas son proporcionar protección frente a patógenos, a la deshidratación, a las enzimas digestivas y a los cambios en el pH, aunque hay muchas más (18).

La familia de genes MUC humanos codifica hasta 22 proteínas conocidas que pueden dividirse en dos grupos principales: secretadas y asociadas a membrana. Las mucinas asociadas a la membrana (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC11, MUC12 y MUC13), además de su función en la protección de los epitelios, también desempeñan importantes funciones biológicas en la interacción con la matriz extracelular, célula-célula y la transducción de señales.

Una de las mucinas más intensamente estudiadas debido a su implicación en el cáncer es MUC1(19). La proteína MUC1 es una glicoproteína transmembrana, aunque también existe la isoforma secretada, que se expresa en la superficie apical de los epitelios glandulares y ductales de varios órganos como, por ejemplo, las glándulas mamarias, el páncreas, el pulmón, el tracto gastrointestinal y algunas poblaciones linfocitarias. La proteína madura está formada por un complejo heterodimérico, donde ambas subunidades derivan de un mismo precursor proteico. La subunidad β contiene el extremo C-terminal citoplasmático compuesto por 69 aminoácidos, la región hidrofóbica transmembrana (31 aa) y una pequeña

secuencia extracelular que se encuentra unida de forma no covalente a la subunidad α , de mayor tamaño. Esta segunda subunidad contiene la región con número variable de repeticiones en tándem (VNTR) del icosapéptido PAPGSTAPPAHGVTSAPDTR. Se encuentra altamente glicosilada y toda la región VNTR está flanqueada por secuencias no repetitivas a ambos lados incluyendo el péptido señal en la región N-terminal. El dominio VNTR tiene un alto contenido de los aminoácidos serina, treonina y prolina, creándose 5 posiciones como potenciales puntos de O-glicosilación (20).

La glicosilación, es un proceso que ocurre en múltiples etapas, paso a paso, desde el *cis* hasta el *trans* Golgi. En el caso de MUC1, la O-glicosilación es iniciada en el *cis* Golgi y adquiere un elevado grado de glicosilación tras alcanzar el *trans* Golgi, con un incremento sustancial de su peso molecular. Después de atravesar el aparato de Golgi, la proteína MUC1 se expone en la membrana celular tras lo que sufre diversos procesos de internalización mediante endocitosis mediada por clatrina antes de alcanzar el estado de glicosilación maduro, caracterizado por la adición de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) a las cadenas de oligosacáridos. Una vez la proteína ha madurado por completo puede permanecer en la superficie celular o bien puede desprenderse. Debido a su secuencia de aminoácidos rica en prolina, la intensa O-glicosilación de los numerosos residuos de serina y treonina dentro de la región VNTR, así como los efectos electrostáticos ejercidos por la sialilación terminal de las cadenas de carbohidratos, la glicoproteína MUC1 adquiere una conformación lineal rígida (18, 20).

Se ha descrito que MUC1 se sobreexpresa en tumores debido a varios mecanismos que incluyen: un aumento de la transcripción, la amplificación del locus genómico de MUC1 y la pérdida de la regulación postranscripcional. Además, en las células tumorales, MUC1 contiene un menor grado de glicosilación ya que sus glicanos son más cortos y menos ramificados, lo que contrasta con las células normales que normalmente muestran glicanos más alargados y altamente ramificados. La hipoglicosilación de MUC1 en las células cancerosas afecta la estabilidad y la localización subcelular de la proteína, provocando la pérdida de la polaridad en las células tumorales, por lo que su localización ya no se limita a la superficie apical y se encuentra distribuida por toda superficie celular (Figura 1) (21).

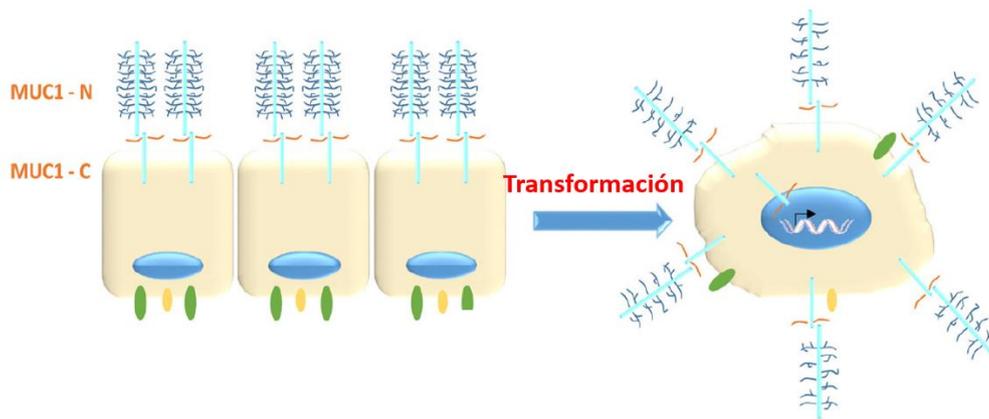


Figura 1. Estructura esquemática y localización celular de MUC1. En el tejido epitelial normal, MUC1 se limita a la superficie apical, sin embargo, en las células tumorales, esta polaridad se pierde y cubre toda la superficie celular. Además en las células transformadas su grado de glicosilación es menor (21).

Debido a las vías de glicosilación alteradas de las células transformadas, los O-glicanos tumorales consisten en estructuras relativamente pequeñas que incluyen los glicanos truncados Tn, sialil-Tn y T, así como los glicanos extendidos ABO (H) y antígenos de Lewis sialilados. Además, los tumores también expresan modificaciones tras la glicosilación desreguladas, como la sulfatación reducida y la acetilación (22). No hay reglas generales o principios fundamentales que puedan extraerse sobre los cambios asociados a tumores de la O-glicosilación. Sin embargo, al menos para los carcinomas de colon y mama, se pueden formular reglas específicas para cada uno de los órganos (18). En el caso del colon, se ha encontrado un cambio de los glicanos basados en el *core 3* a oligosacáridos basados en el *core 2*. También se ha descrito para este órgano un aumento del grado sialilación, que supone una señal de "parada" biosintética del proceso de glicosilación, lo que resulta en la generación de carbohidratos con una cadena más corta. Esto implica una mayor aparición del antígeno sialil-Tn y derivados sialilados de los antígenos de Lewis: sialil-Lewis^x y sialil-Lewis^a(23).

Por otra parte, la presencia del antígeno Tn puede ser debida a una alteración de las enzimas N-acetilgalactosamina (GalNAc) polipéptido transferasas, encargadas de unir GalNAc a los aminoácidos Ser/Thr o también por una disminución de la actividad de la 2-β1,6-N-acetilglucosaminil transferasa, cuya función es sintetizar las estructuras de *core 2*, lo que ocurre especialmente en tumores de mama. Ambas alteraciones conducen a una acumulación de los precursores GalNAc-Ser/Thr (antígeno Tn) y Galβ1-3GalNAc-Ser/Thr (antígeno T) (Figura 2) (18).

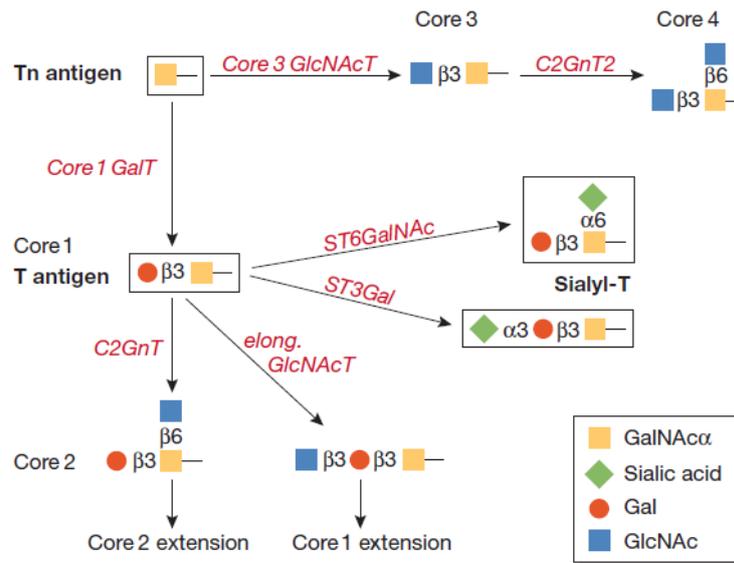


Figura 2. Esquema del proceso de biosíntesis de diferentes antígenos y estructuras core de O-glicanos. Las células de la mucosa colorrectal son capaces de sintetizar los cores 1-4. El core 1, o antígeno T, puede convertirse en el antígeno T-sialilado debido a la acción de las $\alpha 6$ -sialiltransferasas (ST6GalNAc) o la $\alpha 3$ -sialiltransferasa (ST3Gal). Finalmente, todas las estructuras core pueden ser ampliadas para la formación de complejos O-glicanos (24).

La reducción de la longitud de la cadena de los glicanos de MUC1 resulta en una mejor accesibilidad del núcleo peptídico para anticuerpos y receptores de células T permitiendo así un reconocimiento más específico de la célula tumoral. Es importante el estudio de los antígenos específicos de tumores ya que son ideales para el desarrollo de inmunoterapias altamente específicas que minimicen los efectos tóxicos del tratamiento.

1.4. Las células NK

Las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés *natural killer*) constituyen una subpoblación de linfocitos granulares del sistema inmunitario innato con actividad citotóxica. Son capaces de reconocer y eliminar de manera específica células tumorales o infectadas por virus sin el requerimiento de una sensibilización previa y sin necesidad de receptores específicos de antígeno en su superficie (25). Además, son una fuente temprana de citoquinas inmunorreguladoras.

Las células NK humanas comprenden aproximadamente el 15% de la población linfocitaria circulante y se definen fenotípicamente por su expresión de CD56 y la falta de expresión de CD3. Las células NK humanas se pueden clasificar en dos poblaciones distintas en función de la densidad de CD56 en su superficie celular. La mayoría (aproximadamente el 90%) de las células NK humanas tienen una expresión de baja densidad de CD56 (CD56^{dim}) y expresan altos niveles del receptor III de Fc γ (Fc γ RIII, CD16), mientras que aproximadamente el 10% de las células NK son CD56^{bright}CD16^{dim} o CD56^{bright}CD16⁻. Son las células CD56^{dim} el subconjunto más citotóxico mientras que la función principal de las CD56^{bright} es la secreción de citoquinas (26).

Los mecanismos moleculares que regulan la citotoxicidad de las células NK se han descrito bien y se pueden dividir en tres procesos principales:

1. Reconocimiento de células diana.
2. Contacto con las células diana y formación de la sinapsis inmunológica.
3. Muerte de las células diana.

El mecanismo de activación de las células NK implica la acción de múltiples moléculas y señales (27). Estas células expresan sobre su membrana diversas proteínas que posibilitan la adhesión a las células diana como LFA-1, ICAM-1 y DNAM-1 entre otras. La acción de estas moléculas es fundamental para el acercamiento de ambas células, posibilitando la interacción de receptores y también participando en la transducción de señales.

Las células NK están preparadas para atacar a las células infectadas o malignas. Esta capacidad de respuesta inmediata de las células NK puede presentar un peligro para las células sanas en el caso de una activación inadecuada, lo que implica que la actividad citotóxica de estas células esté estrechamente regulada. Las células NK carecen de la especificidad de antígeno característica de las células T y B, pero, en lugar de ello poseen una serie de receptores activadores e inhibidores que, dependiendo de su activación, condicionarán si la célula NK lleva a cabo su acción citotóxica frente a una célula o no (27).

Las células NK atacan a las células diana que muestran un MHC-I reducido o aberrante, pero, cuando se expresa de modo normal, se inhibe su activación. Sin embargo, estudios adicionales han indicado que la activación de las células NK puede determinarse, no solo por la falta de expresión de MHC-I, sino también por la presencia de ligandos para los receptores activadores que poseen estas células, cuya expresión se ve inducida ante el estrés ocasionado por una transformación maligna o una infección viral.

1.4.1. Receptores de células NK

Los receptores activadores e inhibidores de las células NK son un grupo complejo de moléculas que usan motivos de señalización intracelular con funciones opuestas para estimular o inhibir la activación de la célula (28). Los receptores inhibitorios señalizan a través de los motivos llamados ITIMs (del inglés *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) y la mayoría de los receptores activadores transmiten su señal a través de los ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) que, en este caso, no se encuentran en las colas citoplasmáticas de estos receptores, sino que se localizan en moléculas asociadas, aunque existen también otras vías. Tras la fosforilación de estos motivos ITAMs, se produce una cascada de señales que conduce a la degranulación y la transcripción de genes de citoquinas y quemoquinas.

Entre las familias de receptores más importantes de células NK se encuentran:

- Receptores KIR (*killer immunoglobulin-like receptors*). Son un grupo de moléculas tipo inmunoglobulina que incluye receptores tanto activadores como inhibidores. Reconocen a las moléculas HLA-A, -B y -C cuando poseen un péptido unido.
- Familia NKG2. Se trata de receptores tipo lectina en la que se distinguen dos grupos: el formado por NKG2A, C y E; y por otra parte el receptor NKG2D. El primer conjunto de receptores actúa como heterodímeros con CD94 y su función es la detección de los niveles de HLA-E en la superficie de las células diana para prevenir una activación inapropiada. Su expresión se ve afectada por la presencia de citoquinas y por los genes KIR. Por otra parte, el receptor NKG2D reconoce moléculas de estrés formando homodímeros que producen la activación de la célula NK mediante el reclutamiento de DAP-10 o DAP-12. NKG2D puede reconocer diferentes tipos de ligandos expresados por la célula diana cuando ésta detecta daño en el ADN o relacionados con las vías de respuesta a choque térmico, como por ejemplo: MICA, MICB y ULBP1/2/3/4.
- Receptores NCRs (*natural cytotoxicity receptors*). Son una familia de receptores activadores de tipo inmunoglobulina formada por NKp46, NKp80, NKp30, NKp44 y NKp46.
- CD16 o receptor III de Fc (FcγRIII). Se trata de un receptor activador capaz de reconocer la fracción Fc de los anticuerpos que han reconocido su antígeno, permitiendo así la activación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).
- Receptores co-estimuladores como DNAM-1, NKR-P1 y PILR, que proporcionan estimulación a la célula NK para que lleve a cabo su función pero ellos por separado no proporcionan suficiente estímulo para provocar activación (28).

1.4.2. Mecanismos de citotoxicidad de las células NK

Una vez reconocida la célula a eliminar, las células NK interactúan directamente con la célula objetivo a través de la formación de la sinapsis inmunológica lo que facilita la muerte de la célula diana a través de dos mecanismos esenciales (29). El primero de ellos consiste en la activación de los receptores de muerte presentes en la superficie de la célula diana que inician la vía apoptótica extrínseca. Los principales son TRAIL-R (por sus siglas en inglés *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor*) y Fas (CD95), que se activan por la interacción con sus correspondientes ligandos TRAIL y FasL, presentes en las células NK. La expresión superficial de los receptores de muerte puede inducirse en las células diana mediante el IFN- γ derivado de las células NK (Figura 3).

Por otra parte, existe un segundo mecanismo por el que las células NK provocan la muerte de las células diana llamado vía de la exocitosis granular y que consiste en la liberación dirigida de moléculas citotóxicas. Las células NK almacenan estas moléculas en gránulos citosólicos que se transportan a la membrana cuando se establece la sinapsis inmunológica y se secretan sobre la célula diana. Las moléculas contenidas dentro de los gránulos incluyen

la proteína formadora de poros llamada perforina, las serín proteasas conocidas como granzimas, FasL (CD178), TRAIL (CD253) y la granzulina. La granzima B y la perforina son un componente crítico de estos gránulos líticos de células NK. Una vez que la granzima B entra en la célula diana a través del poro de perforina, puede desencadenar la apoptosis a través de mecanismos independientes y dependientes de caspasas (29).

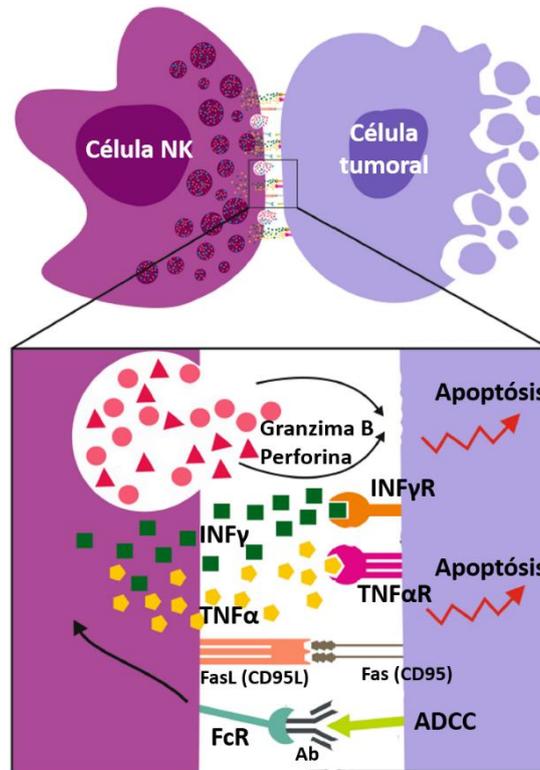


Figura 3. Representación esquemática de la sinapsis inmunológica entre una célula NK y una célula tumoral. Tras el reconocimiento de la célula transformada, las células NK liberan perforina y granzimas que inducen la muerte de la célula. Asimismo, la activación de los receptores mortales junto con la liberación de citoquinas como el INF- γ y en TNF- α conducen también a la muerte celular. Fc γ RIII (CD16) reconoce el dominio Fc de los anticuerpos unidos a su antígeno lo que da como resultado la secreción de citoquinas y la ADCC. Adaptado de (30).

1.5. Células NK como terapia contra el cáncer

El potencial terapéutico de las células NK en la inmunoterapia del cáncer fue evidenciado por primera vez por Miller *et al.* en 2005, ya que demostraron que la administración de células NK haploideénticas alogénicas activadas con IL-2 provocaba remisión de la enfermedad en pacientes con leucemia mieloide aguda (AML) (31). A partir de entonces numerosos estudios y ensayos clínicos se han realizado para evaluar la efectividad de las células NK en el tratamiento del cáncer.

Existen dos posibles enfoques terapéuticos en el uso de las células NK como recurso para el tratamiento del cáncer. El primero de ellos consiste en, mediante la administración de diferentes compuestos, potenciar la efectividad de las células NK del propio paciente incrementando su población, actividad, facilitando su direccionamiento o eliminando los mecanismos de escape del tumor. En esta línea destaca la administración de citoquinas como la IL-2, IL-15 e IL-12 para promover su proliferación y, en el caso de esta última, estimular

la migración y liberación de INF- γ . También se han aplicado fármacos que potencian la actividad de las células NK como los derivados de la talidomida (lenalidomida y pomalidomida). Dentro de este planteamiento destaca el uso de anticuerpos monoclonales, para el reconocimiento de antígenos tumorales específicos y estimular ADCC. Por otra parte también se han desarrollado los llamados anticuerpos bi- y tri-específicos capaces de dirigir y activar las células NK frente al tumor (32).

El segundo enfoque es el uso de la denominada terapia celular adoptiva. Esta aproximación terapéutica consiste en la administración externa de células NK al paciente para su tratamiento. La fuente de células NK para la terapia adoptiva puede ser autóloga (cuando provienen del mismo paciente) o alogénica (cuando proceden de otros donantes) (33). En la terapia basada en células autólogas, las células NK se aíslan del paciente, se activan y expanden *ex vivo* y se transfunden nuevamente a la misma persona, seguido de la administración de citoquinas como la IL-2 y la IL-15 para apoyar su expansión y estimulación *in vivo*. No obstante, el uso de células autólogas no ha manifestado ser una buena opción para el tratamiento del cáncer debido a su baja efectividad. Como resultado de este fracaso se propuso la utilización de células NK alogénicas en los tratamientos de inmunoterapia celular. La ventaja de las células NK alogénicas sobre las autólogas se debe a que es menos probable que sean inhibidas por el reconocimiento mediado por las moléculas del MHC-I. Siguiendo esta línea, se ha demostrado que la transferencia adoptiva de células NK haploidénticas de un donante no compatible con KIR es segura y capaz de generar una remisión completa, especialmente en pacientes con neoplasias malignas hematológicas como la leucemia mieloide aguda (AML) (34-36).

En la mayoría de las investigaciones relacionadas con la de inmunoterapia basada en células NK, se utiliza la sangre periférica para su obtención. No obstante, también se pueden adquirir de otras fuentes alternativas como la médula ósea, hESCs y células NK de sangre del cordón umbilical (37). Por otra parte, existe la posibilidad del uso de líneas celulares establecidas como suministro de células NK. Esta opción tiene las ventajas de la incompatibilidad de reconocimiento de los receptores KIR por el HLA del paciente y la facilidad de su obtención y cultivo en grandes cantidades. Existen múltiples líneas de células NK establecidas entre las que destacan NK-92, KHYG-1, NKL y NKG por su actividad antitumoral. Actualmente, son las NK-92 la única línea de células NK aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*) para su uso en clínica, lo que la ha convertido en objeto de múltiples investigaciones y ensayos clínicos (38).

A diferencia de los buenos resultados obtenidos en el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas, se ha encontrado que la inmunoterapia celular adoptiva es menos prometedora para los tumores sólidos. Esto se debe a la existencia de una combinación de factores que impiden que estas células puedan desempeñar su función terapéutica: la limitación de la infiltración de células NK en el microambiente tumoral, la falta de susceptibilidad de las células tumorales a la citotoxicidad de las células NK y la alteración

de la función de las células NK por las células inmunitarias supresoras, son algunos de los mecanismos que limitan esta técnica. Por ello, es importante desarrollar nuevas aproximaciones terapéuticas que permitan hacer frente a los impedimentos añadidos que genera un tumor sólido a la acción de estas células.

1.6. Edición genética de células NK para el tratamiento del cáncer. Los receptores quiméricos de antígeno (CAR)

Debido a los avances en el campo de la biología molecular y la ingeniería genética, actualmente existen múltiples técnicas para editar a voluntad el material genético. En el tratamiento del cáncer, la capacidad inherente de las células NK para la destrucción de las células tumorales podría mejorarse mediante la modificación de su material genético. Los enfoques que pueden seguirse son diferentes e incluyen: la introducción de genes para la expresión de citoquinas, la sobreexpresión de receptores activadores, el silenciamiento de receptores inhibidores o la incorporación de los denominados Receptores Quiméricos de Antígeno (CARs).

Los CARs son proteínas transmembrana que permiten el reconocimiento de manera específica de antígenos tumorales, provocando la señalización a través de vías que incrementan la supervivencia, la proliferación y la capacidad citotóxica de la célula inmune. En primera instancia, esta aproximación terapéutica se desarrolló en linfocitos T, con el objetivo de utilizar su capacidad citotóxica intrínseca, pero mejorando su selectividad para reconocer de modo específico antígenos tumorales expresados en la membrana de las células. Se las denominó como células CAR-T. Son múltiples los estudios y ensayos clínicos realizados con células CAR-T, especialmente para el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas (39, 40) y también algunos tumores sólidos (41, 42).

Los linfocitos T tienen capacidad de reconocimiento antigénico de forma innata, debido a la estructura localizada sobre su membrana llamada como receptor de linfocitos T o TCR. Este complejo está formado por una cadena α y otra β unidas de forma no covalente, que interactúan a su vez con CD3 (Figura 4). Cuando las cadenas α y β reconocen un antígeno se produce un cambio conformacional en toda la estructura que finalmente, gracias a la acción de CD3, provoca una señal de activación en el linfocito T. Este ensamblado macromolecular tiene la peculiaridad de que únicamente puede reconocer pequeños antígenos peptídicos cuando están ensamblados junto a una molécula del MHC. Sin embargo, esta estructura fue la base para el desarrollo de los CARs, ya que se ha mantenido la región con capacidad activadora de CD3, pero se ha modificado el dominio extracelular para que su reconocimiento antigénico no esté restringido por el MHC. Esto condujo al desarrollo de estructuras con un reconocimiento antigénico mejorado y una mayor diversidad en la capacidad de transmisión de señales al interior celular.

Estructuralmente, los CARs pueden dividirse en cuatro regiones principales: un dominio extracelular de unión a antígeno, una región bisagra, un dominio transmembrana y un

dominio intracelular de señalización. El dominio de reconocimiento antigénico está formado típicamente por el fragmento de la región variable de cadena sencilla (scFv) derivado de las regiones variables de la cadena pesada (VH) y ligera (VL) de un anticuerpo monoclonal. Los dos dominios variables están unidos por una secuencia peptídica flexible, ya sea en la orientación VH-linker-VL o VL-linker-VH. El scFv, un componente crítico de una molécula CAR, puede diseñarse y manipularse con cuidado para influir en la especificidad hacia las células tumorales.

La región bisagra, también conocida como espaciador, es el dominio estructural extracelular del CAR que separa la región scFv del dominio transmembrana. La mayoría de las células CAR-T están diseñadas con bisagras de dominio de tipo inmunoglobulina sin capacidad de reconocimiento por el receptor γ de Fc (Fc γ R). Estos espaciadores generalmente proporcionan estabilidad para la expresión y actividad del CAR. Además, la región bisagra también proporciona flexibilidad y su longitud condiciona la posibilidad de reconocimiento del epítipo deseado. Los dominios extracelulares que naturalmente carecen de actividad de unión a Fc γ R, como CD28 y CD8 α son los más frecuentemente utilizados.

A continuación, se sitúa el dominio transmembrana que consiste en una hélice α hidrófoba embebida en la membrana celular. Aunque su función principal es anclar el CAR en la membrana de la célula, algunos estudios sugieren que la región transmembrana puede ser relevante para desempeñar su función, interviniendo en fenómenos de dimerización e interacción con otras moléculas.

Por último, la región intracelular del CAR, o endodominios, está compuesta por dominios derivados de moléculas co-estimuladoras de la familia CD28 (incluyendo CD28 e ICOS) y/o de la familia de genes del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) (incluyendo 4-1BB, OX40 o CD27). La familia CD28 activa a las células e induce la secreción de citoquinas proliferativas como la IL-2. Los miembros de la familia TNFR modulan la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células T (43). Dependiendo del número de endodominios señalizadores y co-estimuladores que posean (CD3 ζ , CD28, CD27, 4-1BB, ICOS, OX40...) los CARs se clasifican en diferentes “generaciones” (Figura 4). La presencia del dominio CD3 ζ es fundamental para provocar la activación de la célula, por lo que se encuentra en la mayoría de los diseños de CARs tanto para células T como para células NK. Esto es debido a que CD3 ζ regula la señalización y citotoxicidad mediada tanto por receptores de las células NK (NKp30 y NKp46) como por el TCR de los linfocitos T. No obstante, para CARs destinados a células NK, se han hecho algunos diseños con sus endodominios basados en DAP-12 (44). Por otra parte, algunos de los últimos modelos de vectores que contienen CAR se han generado como construcciones génicas que, además del CAR, contienen genes de receptores y de expresión citoquinas que mejoran la función de las células efectoras, lo que se ha denominado como TRUCK (*CAR-T cells redirected for universal cytokine killing*) (45).

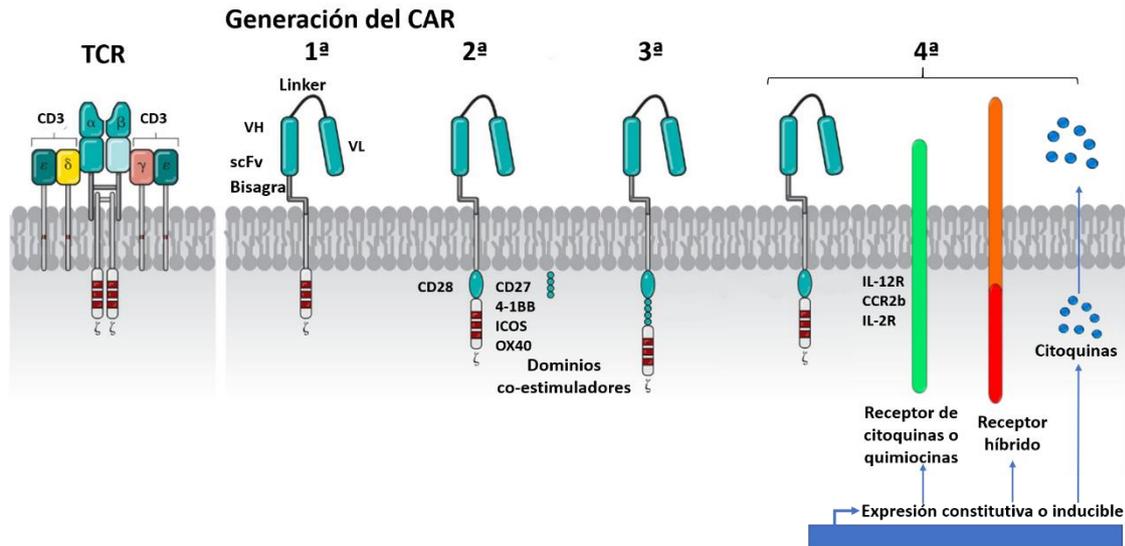


Figura 4. Estructura de las diferentes generaciones de CARs y del TCR. Los CARs de primera generación contienen un endodominio de señalización CD3 ζ . Los CAR de segunda y tercera generación, además del dominio CD3 ζ , incorporan CD28 (segunda generación) o más dominios co-estimuladores adicionales como CD27, 4-1BB, ICOS u OX40 (tercera generación). Las CARs de cuarta generación incluyen la expresión constitutiva o inducible de receptores o citoquinas solubles para promover la activación y supervivencia. Adaptado de (46).

Mientras que los CARs se han utilizado ampliamente para redirigir la especificidad de las células T para uso clínico, existiendo ya diversos ensayos clínicos, algunos de ellos con resultados muy positivos, los estudios de células NK modificadas con CAR todavía no están tan avanzados. Las células NK presentan una serie de ventajas sobre los linfocitos T. Por ejemplo, las células NK transferidas tienen una persistencia *in vivo* limitada debido a la falta de expansión clonal y el rechazo mediado por el sistema inmunitario. Por ello, las células NK alogénicas son eliminadas en días o semanas lo que hace que las toxicidades del tratamiento, como el síndrome de liberación de citoquinas, sean menos probables. Además, aunque algunos pacientes han recibido células CAR-T alogénicas sin incidencia de enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), la mayoría de los estudios de células CAR-T hasta la fecha han usado células T autólogas. Esto se debe a que las células T alogénicas (incluso si coinciden en el MHC) pueden inducir GVHD a través de su TCR nativo. Las células NK, por otro lado, no causan GVHD, como evidencian los estudios clínicos que utilizan infusiones de células NK haploidénticas (47).

La mayoría las investigaciones clínicas y preclínicas que existen actualmente con CAR-NK se centran en el tratamiento de neoplasias malignas de células B con CARs anti CD19 y CD20. No obstante, cada vez aparecen más estudios centrados en el tratamiento de tumores sólidos como el cáncer de mama, de ovario y glioblastomas (48), entre otros.

A pesar de los avances en este campo, todavía existe poco consenso sobre cuál es la estrategia más eficiente para lograr la obtención de las células CAR-NK. En los trabajos con células NK primarias se obtiene una variabilidad muy significativa en la función de estas células, inherente al propio donante y las diferentes estrategias de expansión y activación. En el caso de las células CAR-NK además hay que contemplar el factor asociado

a los diferentes métodos de introducción del material genético deseado para modificar las células (tanto virales como no virales). La mayoría de los estudios en células NK utilizan vectores basados en retrovirus o lentivirus. La transfección lentiviral posee el beneficio, en comparación con la retroviral, de que no requiere que las células se dividan activamente para poder realizar la infección. Si bien los vectores lenti y retrovéricos están diseñados para garantizar la expresión persistente del transgén al integrarse en el genoma del huésped, también se están explorando técnicas alternativas de transfección no viral. Entre estos métodos destaca la electroporación, que introduce ARNm que codifica el CAR a través de poros en la membrana celular, lo que da como resultado la expresión inmediata de la molécula.

A pesar de la efectividad de las NK primarias, recientemente está desarrollándose un mayor interés por el uso de líneas celulares establecidas de células NK para su uso en terapia, ya que permiten obtener una fuente de células a gran escala más apropiada para lograr el desarrollo de terapias. Aunque existen varias líneas de células NK, la más ampliamente estudiada es la NK-92, una línea celular humana tipo NK establecida originalmente a partir de un paciente con linfoma no Hodgkin. Las células NK-92 carecen de casi todos los KIR inhibitorios, excepto KIR2DL4. Esta falta de KIR en las células NK-92 podría, al menos en parte, explicar su marcada actividad citotóxica *in vitro* contra un amplio espectro de dianas tumorales.

En los últimos años, la investigación en el campo de las CAR-NK-92 ha avanzado y varios grupos han diseñado células NK-92 que expresan CARs que se dirigen a tumores malignos tanto hematológicos como sólidos, con especificidad por CD19 y CD20 para la leucemia / linfoma de células B, por CD38 y CS-1 para el mieloma múltiple y por HER-2 para los cánceres epiteliales (49).

2. Antecedentes y objetivos

El CCR es una de las neoplasias malignas más frecuentes y con una mayor tasa de mortalidad. Por ello, es necesario el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas para la superación de las resistencias adquiridas por los tumores a los tratamientos actuales debido a mutaciones frente a quimioterapia, mecanismos inmunosupresores o la reducción de su inmunogenicidad conforme progresa la enfermedad (50). En esta línea, la utilización de células inmunológicas, como linfocitos T CD8⁺ o células NK que expresen CARs, podría ser un buen recurso, para el tratamiento del CCR, especialmente en el caso de tumores resistentes a los tratamientos convencionales, debido a su capacidad de reconocer antígenos tumorales de modo selectivo y su alto potencial citotóxico.

En los últimos años se han generado diferentes anticuerpos monoclonales contra la proteína aberrante MUC1, presente en las células tumorales. La mayoría de ellos reconocen epítomos pertenecientes al *core* de la proteína de las regiones VNTR, aunque también los hay que muestran especificidad por determinados carbohidratos y glicopéptidos (51). Basándose en

estos anticuerpos se han generado diferentes CARs y analizado su actividad antitumoral en forma de células CAR-T tanto *in vitro* como *in vivo* en varios tipos de tumores sólidos, incluyendo ensayos clínicos en fase I. En concreto, se han usado los anticuerpos HMFG2 y SM3 que reconocen el epítipo PDTR de la región VNTR de MUC1 y los anticuerpos 5E5 y TAB004 que reconocen el antígeno Tn y STn de MUC1 respectivamente (52-55).

En 2001, Qi *et al.* desarrollaron el anticuerpo monoclonal AR20.5, conocido como Brevarex®, de origen murino (IgG1), que muestra una alta especificidad por la región VNTR de la forma tumoral de MUC1 (56). Concretamente, Movahedin *et al.* demostraron, mediante cristalografía de rayos X, que AR20.5 se unía de forma específica al antígeno Tn de MUC1 (APDT(Tn)RPAP) (57). De hecho, este anticuerpo ha llegado a ser testado en pacientes con tumores metastásicos, generando una respuesta inmune eficaz y sin efectos secundarios (58). Por ello, su scFv podría plantearse como un buen recurso para el desarrollo de un nuevo CAR.

A pesar de que los tratamientos mediante el uso de CARs están más ampliamente desarrollados en células T, la utilización de células NK parece plantearse como una mejor alternativa para el desarrollo de terapias celulares adoptivas debido a su incapacidad para generar GVHD y a su potencial intrínseco para la eliminación de las células tumorales. Dentro de las diferentes fuentes de células NK, las líneas establecidas, como la NK-92 se ha propuesto como una buena alternativa debido a que se trata de una línea homogénea, bien caracterizada, fácilmente cultivable y que manifiesta elevada capacidad citotóxica. De hecho, la línea NK-92 ha llegado a administrarse a más de 40 sujetos humanos con cánceres avanzados. Sin embargo, a pesar de la seguridad de las infusiones repetidas de células NK-92, su eficacia sigue siendo limitada (47). Por ello, en la actualidad se está explorando la incorporación de CARs para potenciar la actividad antitumoral de estas células. Entre estas mejoras, también es interesante la introducción de genes que permitan evitar la acción inmunosupresora del microambiente tumoral incrementando la supervivencia, proliferación e infiltración en la masa tumoral. En el caso del CCR, tal y como se ha indicado en la introducción, el bloqueo del TGF- β podría ser fundamental para esta mejora (10, 13).

Debido a los antecedentes anteriormente expuestos, este trabajo plantea **la hipótesis** de que la generación de células NK que expresen un CAR frente al antígeno MUC1 y que a su vez sean capaces de bloquear la acción del TGF- β tumoral (CAR-NK-MUC1/TGF- β), serían capaces de eliminar de modo selectivo y efectivo células de CCR.

Este trabajo se engloba dentro de un proyecto de mayor amplitud y por ello se ha planteado la consecución de objetivos de menor envergadura. El **objetivo principal** de esta investigación es optimizar la producción células CAR-NK de cuarta generación frente a MUC1 y TGF- β , así como establecer los protocolos para evaluar su capacidad citotóxica frente a cultivos de CCR en 2D y en 3D con el fin de, en el futuro, poder evaluar su eficacia en modelos *in vitro* e *in vivo* de CCR.

Para ello, se han diseñado dos construcciones génicas: la primera de ellas contiene un receptor quimérico frente al antígeno Tn de MUC1 que co-expresa a su vez IL-15 y la segunda está formada por un CAR anti-TGF- β acompañado del gen de la hialuronidasa. De este modo se dirigirán las células NK de modo selectivo sobre las células de CCR a través de MUC1, bloqueando la acción inmunosupresora del TGF- β , y a su vez, favoreciendo la degradación de la matriz extracelular mediante la hialuronidasa, lo que favorecerá la infiltración de las células NK en el tumor (Figura 5).

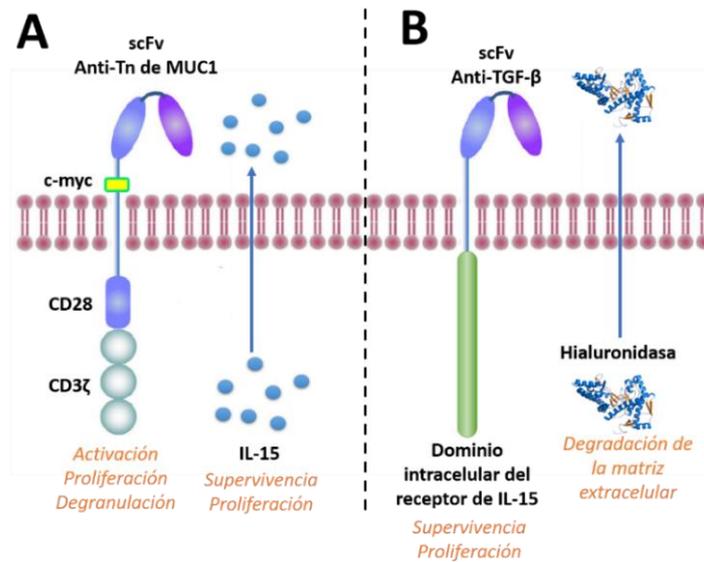


Figura 5. Esquema de los CARs de 4ª generación diseñados. (A) CAR anti-Tn de MUC1 con co-expresión de IL-15. (B) CAR anti-TGF- β con co-expresión de hialuronidasa.

Los objetivos intermedios que se han propuesto son los siguientes:

- Desarrollar y seleccionar un protocolo de transfección mediante infección lentiviral de células NK primarias y de la línea celular NK-92. Para ello, en primer lugar, se realizará la optimización del protocolo con el gen reportero de la proteína fluorescente amarilla (YFP) en líneas celulares de fácil modificación genética. La consecución de este objetivo implica:
 - Seleccionar el mejor método de transfección de la línea celular empaquetadora, así como escoger aquella línea que proporcione mejores resultados.
 - Determinar un protocolo eficaz para desarrollar la transfección mediada por lentivirus en células NK primarias y en la línea celular NK-92.
- Caracterizar la expresión de MUC1 en cultivos 2D y 3D de líneas celulares de CCR humano.
- Evaluar la capacidad citotóxica de la línea celular NK-92 sobre cultivos de líneas celulares de CCR humano tanto en cultivos 2D como 3D.
- Caracterizar la expresión de TGF- β 1 en diferentes líneas de CCR.
- Generar una línea de CCR humana que exprese los genes ZsGreen y Luc2P de forma estable para su utilización en experimentos *in vitro* e *in vivo*.

3. Materiales y métodos

El Anexo 1 contiene un listado de los materiales y aparatos utilizados.

El Anexo 2 recoge la composición de todos los tampones empleadas, no especificadas en esta sección.

3.1. Técnicas de biología molecular

3.1.1. Plásmidos

En el desarrollo de este trabajo se generaron partículas lentivirales para la transfección de, en primera instancia, genes reporteros y posteriormente de los CARs diseñados, en diferentes células. Para ello fue necesario disponer del conjunto de plásmidos que contengan todos los genes necesarios para que, tras su transfección conjunta en una línea productora de virus (conocida como empaquetadora), se produzca la generación de partículas virales con capacidad infectiva. El método de producción lentiviral utilizado es un sistema de 2ª generación formado por un plásmido de envuelta, un plásmido de empaquetamiento y un plásmido de transferencia. A continuación, se detallan los componentes utilizados.

Como plásmido de empaquetamiento se usó **psPAX2** (Addgene), que contiene los genes Gag, Pol, Rev y Tat; y como plásmido de envoltura **pMD2.G** (Addgene) que porta el gen de la glicoproteína de envoltura VSV-G (glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular). En la Tabla 1 se resumen brevemente las funciones de cada uno de los genes implicados en la formación de lentivirus.

Tabla 1. Descripción de los genes implicados en la formación de lentivirus.

Gen	Función
<i>Gag</i>	Proteína precursora de componentes de la matriz, cápside y nucleocápside lentiviral
<i>Pol</i>	Proteína precursora de la transcriptasa reversa y la integrasa
<i>Rev</i>	Proteína de unión a RRE (elementos de respuesta a Rev) para facilitar la exportación nuclear de las moléculas de ARNm
<i>Tat</i>	Transactivador transcripcional que activa la transcripción del promotor LTR
<i>VSV-G</i>	Glicoproteína de la envoltura lentiviral

Se ha hecho uso de diferentes plásmidos de transferencia, que son aquellos que contienen la secuencia deseada a introducir en la célula, flanqueada por las regiones LTR (repetición terminal larga) y la secuencia ψ de empaquetamiento. Por una parte, se utilizaron dos plásmidos con genes reporteros:

- **pHIV-Luc-ZsGreen** (Addgene) contiene el gen de la luciferasa de *Photinus pyralis* y el gen de la proteína fluorescente verde de *Zoanthus sp.* unidos por una secuencia IRES (sitio interno de entrada al ribosoma).

- **pBABE-puro** (Addgene) modificado mediante la introducción de la secuencia de la proteína fluorescente amarilla (YFP) en su sitio de clonaje múltiple empleando las enzimas de restricción EcoRI y Sall.

El otro grupo de plásmidos de transferencia utilizados fueron aquellos que portan las construcciones de los dos CAR diseñados, tomando como esqueleto el plásmido lentiviral pCCL, cedido amablemente por el Dr. Pablo Menéndez (Instituto Universitario de Investigación de Biocomputación y Física de Zaragoza). La construcción génica integrada en el plásmido **pCCL-MUC1** comprende dos genes unidos por la secuencia correspondiente al péptido T2A:

- Gen del CAR con reconocimiento del antígeno Tn de MUC1. Este CAR está compuesto por la scFv del anticuerpo monoclonal AR20.5 que reconoce el antígeno tumoral Tn de MUC1 (57) y cuya secuencia fue proporcionada por el Dr. Ramiro Hurtado (Instituto Josep Carreras). En la región extracelular posee también el epítipo c-myc para facilitar la identificación de las células transfectadas mediante anticuerpos contra esta secuencia. Su región intracelular está compuesta por los endodominios 41BB y CD3 ζ que promueven señales de proliferación, activación y degranulación en la célula NK.
- Gen de la IL-15. Su objetivo es incrementar la producción de IL-15, citoquina relacionada con la supervivencia de las células NK.

El segundo de los plásmidos es **pCCL-TGF- β 1** cuya estructura se compone, al igual que el anterior, de dos genes unidos por un péptido T2A:

- Gen del CAR anti-TGF- β 1. En este caso el CAR está compuesto por la fracción scFv de un anticuerpo monoclonal que reconoce esta citoquina (Fresolimumab). Su región transmembrana y endodominios están compuestos por la fracción intracelular del receptor de IL-15.
- Gen de la hialuronidasa. Esta enzima permite la degradación del ácido hialurónico de la matriz extracelular, facilitando la infiltración de la célula NK.

En el Anexo 3 se encuentran las representaciones gráficas de todos los plásmidos utilizados.

3.1.2. Preparación de medios y cultivos bacterianos

El medio de cultivo utilizado para la realización de todos los cultivos bacterianos fue medio Luria Bertani (LB), preparado mediante la adición de los siguientes componentes: 10 g de triptona (Panreac), 5 g de extracto de levadura (Panreac) y 5 g de NaCl (Merk). Todo ello se disolvió en 1 L de agua destilada y se ajustó el pH a 7, utilizando NaOH 1 M. Posteriormente el medio se esterilizó por autoclavado y se almacenó a 4°. Adicionalmente, para aquellos cultivos que lo requirieran, el medio se suplementó con ampicilina (Roche diagnostics), como antibiótico de selección, a una concentración final de 100 μ g/mL en el momento previo a su utilización.

También se prepararon placas de Petri de 100 mm con medio de cultivo sólido LB-agar. Para ello se adicionaron 15 g de agar por cada litro de medio LB antes del autoclavado. Posteriormente, una vez el medio se hubo atemperado, se suplementó con la cantidad de ampicilina correspondiente y se vertieron 15 mL por placa. Para su almacenaje se sellaron con Parafilm® y se guardaron en oscuridad a 4°C.

La cepa bacteriana utilizada para la replicación de todos los plásmidos fue *Escherichia coli DH10B*, caracterizada por un genotipo que permite una alta eficiencia de transformación por su alelo *deoR*, el mantenimiento del ADN plasmídico de forma estable por ser *recA1* y la obtención de un alto número de copias plásmido por su condición *endA1(59)*.

3.1.3. Obtención de bacterias competentes y transformación bacteriana

La preparación de bacterias *E. coli DH10B* para transformación por choque térmico se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento. En primer lugar, se prepararon las siguientes disoluciones: tampón de trituración y tampón de preservación (Anexo 2).

Posteriormente se procedió al preinóculo la cepa de *E. coli DH10B* en 10 mL de medio LB que se cultivaron en orbital durante 16 horas a 37°C y 250 rpm. A continuación, el cultivo se repartió entre 4 matraces Erlenmeyer, con 100 mL de medio LB cada uno, y se mantuvieron en incubación hasta que alcanzaron una absorbancia a 630 nm mayor de 0.4. Una vez alcanzado este valor, el contenido de los matraces se trasvasó a tubos de centrifuga de 50 mL que se mantuvieron en hielo durante 30 min. Tras esto, se centrifugaron a 2800 x g a 4°C durante 5 min. Todas las manipulaciones que se realizaron a partir de este momento siempre se hicieron en frío. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets formados en 1 mL del tampón de trituración anteriormente preparado. Posteriormente, se añadieron 30 mL adicionales de tampón de trituración a cada tubo Falcon. Se realizó una segunda centrifugación de 7 min a 2800 x g, 4°C y tras la eliminación de los sobrenadantes se resuspendió el pellet en 4 mL de tampón de conservación. Para su preservación, se dividió el cultivo obtenido en alícuotas de 400 µL en microtubos que se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

El proceso de transformación de las bacterias *E. coli DH10B* se llevó a cabo por **choque térmico**. Para ello se descongelaron dos alícuotas de bacterias, una de ellas para adicionarle el ADN plasmídico de interés y la otra para utilizarla como control del proceso. En primer lugar, se descongelaron las bacterias durante 30-40 min en hielo y se añadió una cantidad de ADN plasmídico de entre 40-50 ng. Para la realización del choque térmico se incubaron 30 min en hielo, 1,5 min a 42°C y por último 2 min en hielo de nuevo. Finalmente, se adicionó 1 mL de medio LB y se incubaron en orbital 1 hora a 37°C y 250 rpm. Una vez el cultivo hubo crecido, se centrifugó a 2800 x g 5 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 200 µL de medio para realizar una siembra por agotamiento en placas de LB-agar suplementado con ampicilina (100 µg/mL) como medio de selección. Estas placas se incubaron en estufa 24 h a 37°C para permitir el crecimiento de colonias, de las cuales se

seleccionaron 4 que se inocularon mediante un asa de siembra en 5-12 mL de medio LB con ampicilina para, tras 24 h de incubación (37°C, 250 rpm), extraer el ADN plasmídico.

3.1.4. Extracción y cuantificación de ADN plasmídico

Para la obtención de pequeñas cantidades de ADN y la purificación de plásmidos de un tamaño superior a 10 kb se utilizó el kit *FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit* (Favorgen Biotech) (designado posteriormente como *Mini kit*), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando volúmenes de cultivo de entre 5-12 mL. Por otra parte, también se hizo uso del kit *FavorPrep™ Plasmid Extraction Midi Kit* (abreviado como *Midi kit*) para obtener mayores cantidades de los plásmidos de pequeño tamaño (pMD2.G y pBABE-puro-YFP) partiendo de 120 mL de cultivo bacteriano.

Para la cuantificación del ADN obtenido se hizo uso de un espectrofotómetro Nanodrop-1000 (ThermoFisher), analizando la absorbancia, de 1,5 µL de muestra, a una longitud de onda (λ) de 260 nm para su cuantificación y a 280 nm y 230 nm para determinar su pureza.

3.1.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa.

La realización de geles de agarosa tuvo como objetivo la comprobación de la existencia del plásmido de interés en las diferentes colonias escogidas de las placas con medio de selección tras el proceso de transformación. Se prepararon geles de agarosa (Scharlau) con un porcentaje de entre el 1-0.5%, dependiendo del tamaño del plásmido, en 30 mL de tampón TBE (Tris-Borato-EDTA) que se calentó para permitir la completa disolución de la agarosa. Una vez la disolución se hubo atemperado se añadieron 3 µL del compuesto Lumiprobe dsGreen (Lumiprobe) para el marcaje del ADN. Cuando la agarosa hubo gelificado, para el proceso de carga de las muestras, se utilizó un tampón de carga 10X (Promega) que se mezcló con la muestra para cargar un volumen final de 10 µL por pocillo. Asimismo, se incorporó el marcador de peso molecular *1 kD DNA Ladder* (Takara Bio). La electroforesis horizontal se realizó en un dispositivo Mini-Sub® cell GT cell (BioRad) durante 1 hora y 15 min, a 90V y 0,4 A. Para la visualización de los geles se usó un transiluminador Gel Doc Xr (BioRad).

3.2. Cultivos celulares

3.2.1. Líneas celulares

Se han utilizado varios tipos de líneas celulares humanas en el desarrollo de este trabajo:

- Líneas de adenocarcinomas de colon y recto: **HCT-116** (ATCC® CCL-247™), **HT29** (ATCC® HTB-38™), **Caco2** (proporcionada por la Dra. Anabel Alcalde, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza), **SK-CO-1** y **DLD-1** (estas dos últimas cedidas por el Dr. Gabriel Gil del Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques). Todas ellas caracterizan por un crecimiento adherente en forma de monocapa.
- La línea celular **NK-92®**, suministrada amablemente por el grupo del Dr. Pablo Menéndez (Laboratorio del Instituto Josep Carreras), son células NK procedentes de un

linfoma maligno no Hodgkin. Crecen en suspensión, generando agregados multicelulares esféricos.

- Línea celular **Jurkat clon E6-1** (ATCC® TIB-152™) obtenida de una leucemia aguda de linfocitos T. Crecen en suspensión, con una elevada tasa de crecimiento y son fácilmente transfectables mediante lentivirus y retrovirus.
- Línea celular empaquetadora **293T** (ATCC® CRL-3216™) procedentes de tejido embrionario hepático (HEK-293) y modificadas con el antígeno-T largo del SV40 (virus 40 vacuolado del simio), que permite la replicación episomal de plásmidos que porten el origen de replicación del virus SV40.
- Línea celular empaquetadora **GP2-293** (cedidas por el grupo del Dr. Alberto J. Schuhmacher del Centro de Investigación Biomédica de Aragón) derivada también de la línea HEK-293 que ha sido modificada genéticamente para expresar de forma estable los genes esenciales para la producción viral *gag* y *pol*.
- Línea celular **MCF7** (ATCC® HTB-22™) cuyo origen es un adenocarcinoma de tejido mamario. Son células de tipo epitelial que se caracterizan por un crecimiento adherente.
- Línea celular **K-562** (proporcionadas por el grupo del Dr. Miguel López Botet del Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques) obtenida de una leucemia mielógena aguda y caracterizadas por mostrar una elevada sensibilidad a la acción de las células NK ya que carecen de la expresión de MHC.
- Línea celular **R69** de origen linfoblastoide de tipo B y transfectada con el virus Epstein-Barr, cedidas amablemente por el Doctor Jose Antonio Lopez Castro (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa).

3.2.2. Mantenimiento de los cultivos celulares

Dependiendo del tipo celular, las características del mantenimiento del cultivo se adaptaron a cada una de las líneas. En el caso de las células de CCR, MCF7, 293T y GP2-293, todas ellas se cultivaron en medio DMEM (Gibco) suplementado al 10% (v/v) con suero fetal bovino (SFB) (Sigma), 1% de GlutaMax 2 mM (Sigma) y antibióticos (estreptomicina 100 µg/mL y penicilina 100 U/mL (Sigma)), lo que posteriormente será designado como DMEM completo. Cada dos o tres días se realizaron subcultivos de las líneas, dependiendo de su tasa de división. Al tratarse de células adherentes, se aplicó una mezcla de tripsina/EDTA(Sigma) durante 5-10 min para el despegado de las células. Tras esto, se adicionó medio de cultivo con suero, para neutralizar la tripsina, se centrifugaron a 500 x g 5 min y se descartó el sobrenadante. Por último, se resuspendieron en su medio de cultivo y se sembraron a la densidad deseada.

En lo que respecta a las líneas en suspensión, la línea celular NK-92 se cultivó en medio α MEM (Gibco) suplementado al 12.5% con SFB, 12.5% suero de caballo (Sigma), 1% de Glutamax 2 mM e IL-2 (100 U/mL) (Sigma) (α MEM completo). Por último, las líneas celulares K-562, R69 y Jurkat se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado al 10% con SFB y 1% de Glutamax 2 mM (RPMI completo).

Todas las líneas celulares se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm² de forma rutinaria con 5 mL de medio de cultivo para las células adherentes y entre 5-10 mL para las de crecimiento en suspensión.

En todos los casos, los cultivos se mantuvieron en un incubador termostatzado a 37°C, con saturación de humedad y una atmósfera controlada de CO₂ del 5%. Todas las manipulaciones de los cultivos se llevaron a cabo en campana de flujo laminar vertical (Telstar Bio All), en condiciones de esterilidad.

3.2.3. Congelación y descongelación de células

Las diferentes líneas celulares se congelaron para su almacenamiento a -80°C en criotubos. El volumen congelado en todos los casos fue de 1 mL de medio de cultivo suplementado al 10% con dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), como agente para mejorar la criopreservación, y con una densidad aproximada de 2·10⁶ cel/mL para las líneas celulares adherentes y de 5·10⁶ cel/mL para las células en suspensión.

La descongelación se realizó mediante la adición gradual de 10 mL del medio de cultivo atemperado correspondiente, para, posteriormente, proceder a la centrifugación de la suspensión celular durante 5 min a 90 x g. Por último, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en un volumen reducido de medio completo (3-4 mL).

3.2.4. Contaje y determinación de la viabilidad celular

Para la determinación de la densidad y la viabilidad celular se usó la tinción con el colorante Azul de tripano. Este método se caracteriza porque las células muertas o con su integridad de membrana comprometida, quedan coloreadas de azul, mientras que las células viables permanecen incoloras. Se mezclaron 50 µL de cultivo celular con 50 µL de este colorante para posteriormente depositar la disolución sobre una cámara de Neubauer que se observó al microscopio óptico (Optiphot, Nikon).

El número de cuadrantes completos contados se escogió de tal modo que se intentasen, al menos, cuantificar 100 células totales.

3.2.5. Cultivos celulares en 3D. Generación de esferoides

Para generar cultivos en 3D se ha usado la técnica de la gota colgante. Consiste en la formación de gotas de medio de cultivo suplementado con metilcelulosa, un polímero hidrófilo que aumenta la densidad del medio, permitiendo así que las gotas depositadas puedan mantenerse de forma invertida, sin derramarse. Esta configuración permite que las células localizadas en el interior de la gota se aglutinen en el extremo inferior por gravedad formando un cultivo 3D denominado esferoide.

Para ello, se dispusieron en un tubo de centrífuga de 15 mL una mezcla que compuesta por un 20 % de MethocelTM (6 g de metilcelulosa (Sigma) en 500 mL de DMEM) y un 80% de medio DMEM completo que contiene el número de células adecuado para que la

densidad final sea de 30.000 cel/mL. Se homogeneizó bien la mezcla y con una pipeta multicanal se depositaron gotas de 30 μ L sobre la tapa de una placa Petri de 100 mm, quedando invertidas. El fondo de la placa se llenó con agua estéril para evitar la excesiva evaporación.

Tras 48 horas de cultivo, los esferoides estuvieron formados y se pudieron recoger para realizar los ensayos correspondientes.

3.3. Obtención y expansión de células mononucleares de sangre periférica humana

Este procedimiento se realizó con el objetivo de aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de muestras de donantes que se obtuvieron del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA).

3.3.1. Aislamiento y cultivo

La obtención de los PBMCs de la muestra sanguínea se hizo mediante separación por centrifugación en gradiente de densidad. Para ello, la sangre, previamente diluida en PBS, se añadió sobre un volumen equivalente de Ficoll-Paque (Ge Healthcare) de forma suave para evitar la mezcla de las fases. Tras esto, se centrifugó a 500 x g durante 30 min sin freno y se recogió el anillo de células creado en la interfase generada entre el Ficoll y el plasma sanguíneo. Las células aisladas se lavaron con PBS y se determinó su densidad celular. Se sembraron 3×10^6 PBMCs y 3×10^5 células estimuladoras (*o feeder*) inactivadas (proceso de inactivación descrito posteriormente) en un frasco de 25 cm² con 3 mL de medio RPMI 1640 al 10% de SFB de complementado y suplementado con 100U/mL de IL-2 y 5 ng/mL de IL-15.

Tras 7 días de cultivo, se analizó la densidad celular y se ajustó el volumen de cultivo para obtener siempre una densidad de cultivo de 10^6 cel/mL. Asimismo, se renovaron los estímulos de interleuquinas y células estimuladoras, manteniendo siempre las siguientes concentraciones/proporciones: relación 1:10 R69:PBMCs, 100 U/mL IL-2 y 5 ng/mL de IL-15. La renovación de los estímulos se realizó cada 3 días, hasta el día 21.

3.3.1.1 Proceso de inactivación de las células estimuladoras R69

La adición de estas células al medio de cultivo va a permitir la activación y expansión de la población de células NK contenida en los PBMCs aislados. En primer lugar, se aisló el número de células adecuado, dependiendo del volumen de cultivo de PBMCs, se centrifugaron a 500 x g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Seguidamente, se añadió 1 mL de medio RPMI 1640 con 50 μ L de una disolución de Mitomicina-C (Sigma) a una concentración de 0.5 mg/mL (para un número de células menor a 10^7). La eliminación total del sobrenadante en el paso previo es crucial dado que el SFB inactiva a la Mitomicina-C. Las manipulaciones se han de hacer en oscuridad porque la Mitomicina-C es fotosensible.

Tras 90-120 minutos de incubación en estufa a 37°C, las células se lavaron con 15-20 mL de medio RPMI 1640 suplementado al 10% con SFB para inactivar la Mitomicina-C. Posteriormente, se adicionaron 15-20 mL de medio RPMI completo y se incubaron de nuevo durante 40 min a 37 °C. Por último, se centrifugaron (500 x g, 5 min), se descartó el sobrenadante y se resuspendieron el volumen deseado de medio completo.

3.3.2. Separación de poblaciones celulares mediante MACS®

Para el aislamiento de la población de células CD56⁺ (células NK y NKT) se utilizaron anticuerpos específicos contra esta proteína conjugados a microesferas magnéticas. Esto permite la selección de la población celular deseada al hacerla pasar a través de columnas metálicas en el interior de un campo magnético. Tanto las columnas como los anticuerpos utilizados fueron adquiridos de Miltenyi Biotec.

Se eliminó el medio de cultivo de las células a separar por MACS y se incubaron con 20 µL de anticuerpo anti-CD56 disuelto en 80 µL de tampón MACS (Anexo 2), por cada 10⁷ células a separar, durante 15 min a 4°C. Tras esto, las células se lavaron con tampón MACS y una vez resuspendidas en 1 mL de este tampón, se pasaron a través de la columna previamente humedecida y conectada al separador. A continuación, la columna se lavó tres veces, se extrajo del separador y se hizo pasar nuevamente tampón MACS para eluir las células CD56⁺ que se habían adherido a la columna.

3.3.3. Caracterización de las poblaciones celulares

Para determinar la proporción de los tipos celulares en el cultivo de PMBCs se utilizó la citometría de flujo. Para la caracterización se hizo un marcaje de las proteínas CD3 y CD56 mediante anticuerpos específicos, de tal modo que permitió definir la proporción de células CD3⁺ CD56⁻ (linfocitos T), CD3⁻ CD56⁺ (células NK) y CD3⁺ CD56⁺ (células NKT). La pareja de anticuerpos utilizados para el marcaje fue: CD3 VioGreen y CD56 PerCP-Vio 700 ambos adquiridos en Miltenyi Biotec.

Se aislaron 150.000 células del cultivo a caracterizar, se les retiró el medio y se incubaron con 1 µL de cada anticuerpo en 50 µL de PBS al 5% SFB durante 15 min a 4°. Tras esto, se lavaron con PBS, fijaron con 150 µL de paraformaldehído (PFA) (Sigma) al 1% y se analizaron en un citómetro analizador Gallios (Beckman Coulter).

3.4. Transfección de células empaquetadoras

Estos experimentos se realizaron para probar distintos protocolos y así determinar el método de transfección de las líneas empaquetadoras. Puesto que el objetivo era valorar la eficiencia del proceso, únicamente se hizo uso de plásmidos con gen reportero.

3.4.1. Transfección mediante el método de fosfato de calcio con el tampón HBS

En placa de 6 pocillos se sembraron 300.000 células GP2-293 por pocillo en 3 mL de medio DMEM completo. Una vez las células se hubieron pegado se sustituyó el sobrenadante por

medio fresco suplementado con 7.5 μ l de cloroquina (10 mM) (Sigma). Se mezclaron 3 μ g del plásmido con YFP con 15 μ L de CaCl₂ (Panreac) 2 mM y se completó el volumen hasta 120 μ l con H₂O miliQ estéril. Posteriormente se mezcló la preparación anterior con 120 μ L de HBS (2x) burbujeando con la pipeta durante 15 s. Por último, se adicionó la mezcla sobre el cultivo gota a gota sobre la placa y tras 14 horas se cambió el medio de cultivo.

3.4.2. Transfección con el reactivo PEI

El protocolo es análogo al descrito en el punto 3.4.1 salvo por la mezcla de transfección. En este caso, a los 3 μ g de plásmido con YFP se adicionaron 10 μ L de polietilenimina (PEI) (1mg/mL) (Sigma) y 125 μ L de DMEM sin suero. Tras incubar 15 min a temperatura ambiente se añadió al cultivo gota a gota y se continuó de manera idéntica al anterior.

3.5. Transfección lentiviral para la obtención de líneas celulares estables.

3.5.1. Producción de partículas virales

En base a los resultados obtenidos con los experimentos del apartado 3.4, se seleccionó la transfección con PEI como método de referencia para la obtención de partículas virales. Para este proceso se utilizaron placas de Petri de 100 mm con el objetivo de maximizar la producción viral. Se sembraron 3.5×10^6 células 293T o GP2-293 en medio DMEM completo y se mantuvieron en cultivo hasta su completa adherencia y una confluencia del 50-60%. Tras esto, se cambió el medio de cultivo por 10 mL de medio DMEM completo sin antibióticos suplementado con 25 μ L de cloroquina (10 mM). Seguidamente se preparó la mezcla de transfección utilizando PEI en la amplia mayoría de los casos. Se mezclaron 5 μ g de psPax2, 2,5 μ g de pMD2.G con el plásmido de transferencia de interés en diferentes cantidades según su peso molecular: 5 μ g para pBABE-puro YFP y 7 μ g en el caso de pHIV-Luc-ZsGreen y pCCL-MUC1. Sobre la mezcla de plásmidos se adicionaron 40 μ L de PEI (1 mg/mL) y 500 μ L de DMEM sin suero. La preparación se agitó mediante un Vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Tras esto se adicionó gota a gota sobre la placa con las células empaquetadoras manteniéndose en cultivo durante una noche, tras lo cual se retiró el medio de transfección y se sustituyó por DMEM completo. Una vez realizado este paso, la placa se mantuvo en cultivo durante 48-72 horas en estufa.

El sobrenadante de la placa contiene las partículas lentivirales por lo que para recogerlas basta con aspirarlo. Para eliminar los restos celulares se centrifugó el sobrenadante a 500 x g durante 10-5 min y/o se filtró a través de filtros de 0.22 μ m de diámetro. Para la conservación de la suspensión de virus, en el caso de no utilizarse inmediatamente, puede mantenerse a 4°C durante no más de una semana y para tiempos superiores a -80°C.

La eficacia de la transfección se determinó mediante citometría de flujo y/o microscopía óptica de fluorescencia (Olympus IX81).

Dependiendo del uso posterior de la suspensión viral, se utilizó el concentrador Lenti-X Concentrator (Takara Bio) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Especialmente

se hizo uso de este recurso para la posterior infección de células en suspensión, ya que, de este modo, además de concentrar las partículas virales en un menor volumen, se pudo realizar la infección en el medio de cultivo óptimo para cada tipo celular.

3.5.2. Infección lentiviral de células eucariotas

Dependiendo de las características de la línea celular a infectar el método a utilizar fue diferente:

- Líneas adherentes. En placas de 24 pocillos se sembraron 100.000 células en 1 mL de medio de cultivo. Se dejaron adherirse al fondo y tras esto se adicionó la suspensión de virus suplementada con polibreno (Thermofisher) a una concentración final de 8 µg/mL
- Líneas en suspensión. Se utilizó el método de *spin infection* en placa. Para ello se sembraron entre 100.000 y 150.000 células por pocillo en una placa de 24 al igual que anteriormente. Posteriormente se añadió la suspensión viral y se suplementó la mezcla con 8 µg/mL de polibreno o protamina (Sigma), dependiendo de los casos. La placa se centrifugó a 1900 x g durante 1 hora 30 min y se mantuvo en cultivo durante una noche para posteriormente añadirles medio fresco a las células.

Los volúmenes y cantidades de células sembradas fueron susceptibles de variación en función de los experimentos a realizar. En el apartado 4 se especifican las condiciones precisas de cada uno de los procesos de infección realizados, junto con sus correspondientes resultados. La eficiencia del proceso se cuantificó mediante citometría de flujo tras 48-72 horas de cultivo.

3.5.3. Selección de líneas celulares estables mediante dilución límite

Con el objetivo de obtener una línea celular transfectada de forma estable con el gen de interés, se recurrió a la técnica de dilución límite. La utilización de este procedimiento fue necesaria porque únicamente un determinado porcentaje del cultivo celular modificado expresa el gen deseado. Para ello se utilizaron dos placas de 96 pocillos en las que se sembraron 100 µL por pocillo. Se hicieron diluciones seriadas del cultivo original transfectado hasta obtener una densidad celular de 5 cel/mL (20 ml aproximadamente). El cálculo se hizo de tal manera que únicamente pudieran caer en un pocillo ninguna o una célula, por lo que se estima que el número de células deseadas es la mitad de los pocillos a rellenar. Tras 2 semanas de cultivo en la estufa se observaron algunas colonias que se trasvasaron progresivamente a mayor volumen de cultivo hasta llegar a frascos de 25 cm².

3.6. Caracterización de la expresión superficial de la glicoproteína MUC1 en diferentes líneas celulares

El fenotipado de las líneas de cáncer colorrectal según su expresión de MUC1 se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Para ello se realizó el marcaje de las líneas celulares con dos anticuerpos específicos anti-MUC1: el clon HMPV (Miltenyi Biotec), que reconoce el epítipo del *core* de la proteína APDTR, y el clon SM3, con afinidad por el antígeno Tn de

MUC1 (Santa Cruz Biotechnology). Ambos anticuerpos son del isotipo IgG1 de ratón y conjugados a FITC. Se usó un isotipo IgG1 como control.

Para el proceso de marcaje se aislaron 120.000 células a las que se les retiró el medio de cultivo y se resuspendieron en 50 µl de PBS suplementado al 5% con SFB. Se añadió 1 µL del anticuerpo correspondiente y se incubaron las muestras 15 min en oscuridad a 4°C. Tras esto, las células se lavaron con 150 µl de PBS al 5% de SFB y, por último, se fijaron con 150 µl de una disolución de PBS con PFA al 1%.

3.7. Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de la línea NK-92 frente a diferentes líneas celulares tumorales.

3.7.1. Marcaje de la línea celular NK-92 mediante la sonda eFluor670

La realización de este marcaje previo de las células efectoras tuvo como objetivo poder diferenciarlas de la población diana en el posterior análisis por citometría de flujo.

Se aislaron entre $2-3 \times 10^6$ células NK-92 del cultivo, se retiró el medio y se resuspendieron en 1 mL de PBS al 5% de SFB sobre el que se adicionó 1 mL de la misma disolución con 1.2 µL de la sonda eFluor670 (5 mM). Las células se incubaron durante 10 min a 37°C y posteriormente 5 min a 4°C. Tras esto se centrifugaron 5 min a 500 x g para retirar la totalidad del sobrenadante. Posteriormente se lavaron con 10 mL de PBS y se dejaron en estufa durante 40 min en 12 mL de medio α MEM completo. Por último, se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en el volumen de medio deseado.

3.7.2. Citotoxicidad *in vitro* en cultivos 2D

Se determinó la actividad citotóxica de la línea celular NK-92 frente a células adherentes (HCT-116, HT29, SK-CO-1, Caco2, MCF7) y en suspensión (K-562). Las células adherentes se sembraron 24 horas antes del ensayo para permitir su fijación al plástico. Se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano, agregando un total de 20.000 células diana/pocillo en un volumen de 100 µL de medio. Antes de agregar las células NK marcadas se cuantificó la cantidad de células en los pocillos mediante tripsinizado y contaje por azul de tripano. Una vez contabilizado, se agregaron las células NK-92 correspondientes a cada pocillo en ratios (célula NK-92:diana) 9:1, 6:1, 3:1, 1:1, 0.5:1. Además se dejaron dos pocillos como control, únicamente con las células diana.

En el caso de las células en suspensión, se sembraron justo antes de comenzar el ensayo en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se procedió de manera análoga al proceso anterior.

Tras 4 horas de incubación en estufa, se recogieron los sobrenadantes de todos los pocillos y se tripsinizaron las células diana, juntándose con los sobrenadantes previamente recogidos. En el caso de las células en suspensión se procedió de forma análoga, omitiendo el proceso de tripsinizado.

Por último, se llevó a cabo al marcaje de muerte celular mediante Anexina V-FITC y 7-aminoactinomicina D (7-AAD). Para ello, a las células resultantes de cada condición, libres de sobrenadantes, se les agregaron 100 μ L de tampón de Anexina (Anexo 2) con 1,5 μ L de Anexina V-FITC y 1 μ L de 7-AAD, se incubaron 10 min y se analizaron por citometría de flujo.

3.7.3. Citotoxicidad *in vitro* en cultivos 3D

En este ensayo únicamente se utilizaron las líneas celulares HT29 y HCT-116 debido a su capacidad para generar fácilmente esferoides mediante el método de la gota colgante (apartado 3.2.5).

Una vez los esferoides estuvieron formados, se tripsinizaron al menos dos de ellos, por separado, para determinar el número de células que lo componían y, en función de este dato, se recogió el número de esferoides correspondientes para obtener entre 20.000 y 30.000 células por pocillo. Se sembraron los esferoides en una placa de 96 pocillos de fondo redondo, en un volumen de 100 μ L de medio DMEM completo. Tras comprobar por microscopía óptica que el número de esferoides era idéntico en todos los pocillos, se agregaron las células NK-92 marcadas con la sonda eFluor670 a ratios 9:1, 6:1, 3:1, 1:1 (célula NK-92:diana), dejando siempre uno o dos pocillos como control, sin células efectoras. Tras 24 horas de co-cultivo, se recogieron los sobrenadantes y se tripsinizaron los esferoides. Posteriormente se cuantificó la muerte celular mediante marcaje con anexina-FITC y 7-AAD.

De forma paralela a este ensayo, se sembraron también cultivos 2D con las mismas células diana con el objetivo de añadir sobre ellos células NK-92 a diferentes ratios (3:1, 1:1, 0.5:1 y 0.25:1 (célula NK-92:diana), para verificar la citotoxicidad de la línea y poder realizar análisis comparativos con el 3D. Este procedimiento se llevó a cabo de manera análoga al detallado en el apartado 3.7.2, salvo porque el periodo de co-incubación fue de 24 horas.

3.8. Cuantificación de la producción de TGF- β 1 en líneas celulares de cáncer colorrectal

Para la cuantificación de la producción de TGF- β 1 en las diferentes líneas celulares se utilizó el kit de ELISA *TGF- β 1 Human/Mouse Uncoated* de ThermoFisher Scientific. Con el objetivo de alcanzar una concentración en el sobrenadante del cultivo cuantificable por este método, se realizó el proceso descrito por Kuczynski *et al.*(60). Se sembraron células de las diferentes líneas en placas de Petri de 100 mm y se cultivaron en medio completo hasta alcanzar un estado de superconfluencia. En este momento, se retiró el medio de cultivo, se lavó la placa con PBS tres veces y se agregó el mínimo medio DMEM sin SFB (3.5 mL) para cubrir la placa pero evitando la dilución del TGF- β 1. Tras 48 horas de cultivo, se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 500 x g durante 5 min para eliminar los restos celulares. Las muestras de sobrenadantes se almacenaron a -80°C hasta el momento de realización del ELISA. Además, se contabilizó el número de células totales en las placas en el momento de la recogida de sobrenadantes.

La realización de la cuantificación mediante ELISA se hizo siguiendo las especificaciones del fabricante. Las muestras se trataron mediante la adición de HCl 1 N con el objetivo de activar el TGF- β 1 latente a la forma inmunorreactiva siguiendo las instrucciones del kit. Además, se utilizó una disolución de TGF- β 1 recombinante de concentración conocida como control del experimento.

4. Resultados

4.1. Amplificación y purificación de plásmidos

Con el propósito de obtener el ADN plasmídico necesario para la realización de los diferentes experimentos de transfección, se transformó la cepa de *E. coli DH10B*. El proceso de transformación fue llevado a cabo con éxito en todos los casos, obteniéndose abundantes colonias en la placa sembrada a partir del vial al cual se había añadido el ADN de interés y ninguna en el vial de control.

Se seleccionaron 4 colonias de cada uno de los plásmidos y se crecieron por separado para realizar una extracción de su ADN plasmídico para comprobar, por electroforesis en gel de agarosa, la presencia del mismo. En todos los casos, la resistencia adquirida al medio de selección fue debida a la incorporación del plásmido de interés, ya que contienen un gen de resistencia al antibiótico de selección utilizado (ampicilina). De este modo se descartó que la adquisición de un fenotipo resistente hubiera sido por el desarrollo de mutaciones espontáneas.

Tras la siembra de colonias en medio líquido, se realizaron las correspondientes extracciones de ADN plasmídico mediante kits comerciales, obteniéndose los resultados resumidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Caracterización de la extracción de ADN plasmídico. La columna Kit hace referencia a el material utilizado para la extracción: *Midi* = FavorPrep™ Plasmid Extraction Midi Kit y *Mini* = FavorPrep™ Plasmid Extraction Midi Kit.

Plásmido	Concentración (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Kit
pMD2.G	1370,4	1,87	2,28	Midi
psPAX.2	29,5	1,76	1,61	Midi
	76	1,85	2,06	Midi
	340,7	2	1,52	Mini
	447,6	1,98	1,37	Mini
pBABE-puro-YFP	1797,2	1,87	2,19	Midi
pHIV-Luc-ZsGreen	365,7	1,85	1,52	Mini
	381,4	1,83	1,46	Mini
pCCL-MUC1	208	1,88	1,2	Mini
	367,7	1,82	1,45	Mini

Para los plásmidos de menor tamaño, pMD2.G y pBABE-puro-YFP, la extracción por *Midi kit* funcionó con un buen resultado, obteniéndose una alta concentración en los 300 μL del volumen de elución. Sin embargo, cuando se procedió a la extracción del plásmido psPAX.2 con *Midi kit* se pudo observar como el rendimiento no era el esperado en ninguna de las ocasiones. En consonancia, se decidió utilizar el *Mini kit* para la obtención de los plásmidos de mayor tamaño (psPAX.2 y pCCL-MUC1) ya que, a pesar de conseguir un menor volumen por extracción (100 μL), la concentración y la pureza obtenidas eran mucho mejores.

La relación A₂₆₀/A₂₈₀ es utilizada para determinar la contaminación con ARN y/o proteínas, considerándose los valores entre 1,8 y 2 como óptimos. En el caso de que sea >2 es indicativo de una contaminación por ARN y si, por el contrario, es <1,8 señala la presencia de proteínas o fenoles. Como se puede ver en la Tabla 2, la pureza de las extracciones realizadas fue adecuada, sin contaminaciones por estos compuestos. En el caso de la relación A₂₆₀/A₂₃₀ se considera como óptimo un valor de entre 2 y 2,2, mientras que resultados menores pueden ser indicativos de la presencia de carbohidratos, fenoles, sales caotrópicas u otros compuestos que absorban a 230 nm. La Tabla 2 refleja que los resultados obtenidos con los *Midi kits* están dentro del rango óptimo ya que se eluyeron con agua miliQ. Sin embargo, en el caso de las extracciones con *Mini kits*, los valores son muy inferiores. Esto es debido a que para la elución se usó la solución “*Elution buffer*” proporcionada en el kit, cuya composición es desconocida pero probablemente contenga sales u otras moléculas que absorban a 230 nm por lo observado en estos resultados.

4.2. Evaluación de protocolos de transfección de células empaquetadoras

Con el objetivo de valorar cuál de los dos métodos de transfección analizados en este trabajo ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ o PEI) era el más adecuado para los experimentos posteriores de producción lentiviral, se realizó un ensayo comparativo para evaluar su eficacia y efectos sobre la población de células empaquetadoras. Para ello, se adicionó la misma cantidad del plásmido pBABE-puro-YFP con su correspondiente agente de transfección sobre las células empaquetadoras GP2-293 y, tras 72 horas, se analizaron los resultados por microscopía óptica de fluorescencia y citometría de flujo.

La eficiencia del proceso de transfección, según los datos obtenidos por citometría de flujo (Figura 6.A/B), es mayor utilizando $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, estableciéndose diferencias significativas entre ambos métodos. No obstante, a pesar de que el precipitado de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ está descrito como un agente para la transfección menos tóxico que el PEI, en los experimentos realizados se detectó una elevada toxicidad en todas las ocasiones.

Asimismo, también se obtuvieron imágenes por microscopía óptica de fluorescencia que corroboraron los datos obtenidos por citometría de flujo. En la Figura 6.C se puede observar como las células transfectadas con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, muestran una elevada intensidad de fluorescencia pero tienen una forma irregular y se encuentran despegadas del fondo, lo que es característico de una célula apoptótica o muerta. Este efecto citotóxico no se observa en la transfección con PEI. Además, la diferencia de densidad del cultivo es considerable, tal y como puede observarse al comparar las imágenes de la Figura 6.C, a pesar de sembrar la misma cantidad inicial de células.

En consecuencia, en base a los resultados obtenidos, se decidió seleccionar el PEI como método de transfección de referencia.

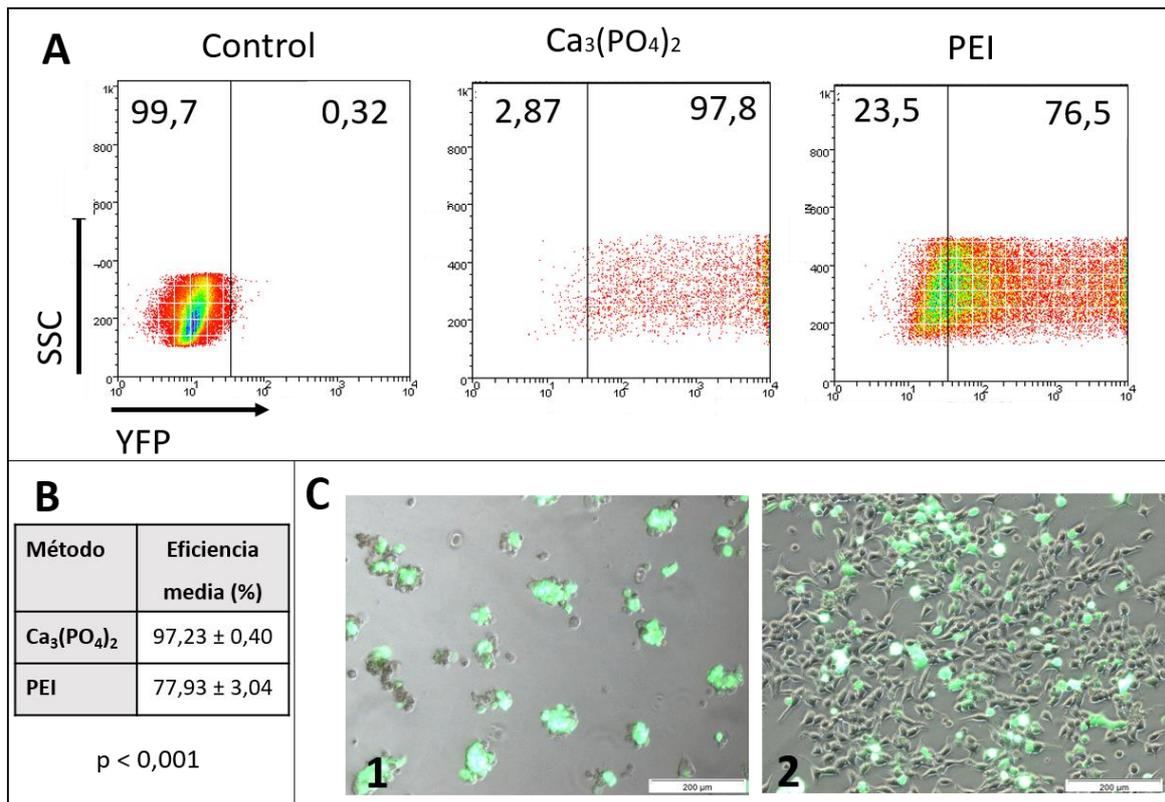


Figura 6. Eficiencia de transfección de la línea empaquetadora GP2-293 con los agentes $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y PEI. (A) Diagramas de puntos representativos de la eficiencia de cada uno de los compuestos utilizados para la transfección de pBABE-puro-YFP tras 72 horas de cultivo. (B) Valores obtenidos en los diferentes experimentos de transfección con cada uno de los métodos expresados como media \pm SEM. Se realizó el análisis estadístico test t de Student. *** $p < 0,001$ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ n=3 PEI n=3. (C) Imágenes capturadas con el microscopio óptico de fluorescencia de los cultivos transfectados con pBABE-puro-YFP. C.1: transfección con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ C.2: transfección con PEI.

4.3. Optimización de un protocolo de transfección para la generación de lentivirus

Para optimizar el protocolo de fabricación de partículas virales infectivas, se hizo uso del gen reportero de la YFP para poder seguir de modo sencillo la eficacia de cada uno de los procesos.

4.3.1. Confirmación de la selección del agente de transfección de células empaquetadoras

Para verificar que la selección del PEI como método de transfección de referencia había sido adecuada, se hizo una transfección de células empaquetadoras con todos los plásmidos necesarios para la producción de lentivirus, haciendo uso de ambos métodos ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y PEI). Las suspensiones virales obtenidas se utilizaron para infectar tanto células adherentes (GP2-293) como células en suspensión (Jurkat) y se evaluaron los resultados obtenidos.

El proceso de transfección de la línea empaquetadora funcionó con una elevada eficacia, en lo que respecta a número de células fluorescentes, en ambos casos (Figura 7.A) Sin embargo, tanto la densidad, como la viabilidad del cultivo transfectado usando $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, tal y como se esperaba, fue peor, al igual que se ha descrito en el apartado anterior. Posteriormente se utilizaron 3 ml de suspensión viral para la infección de 100.000 células

GP2-293. En esta ocasión, se hizo evidente que la transfección mediante PEI para generar partículas lentivirales infectivas es el método más adecuado (Figura 7.B). En el caso de la infección de células Jurkat, se concentraron 6 mL de suspensión viral y se realizó un protocolo de *spin infection* con polibreno. Los resultados obtenidos (Figura 7.C). están en consonancia con lo observado en la infección de las células GP2-293. Esto es debido a que, para que la producción viral sea eficaz, es necesario que las células empaquetadoras se encuentren en un estado óptimo ya que si no se ve drásticamente disminuida.

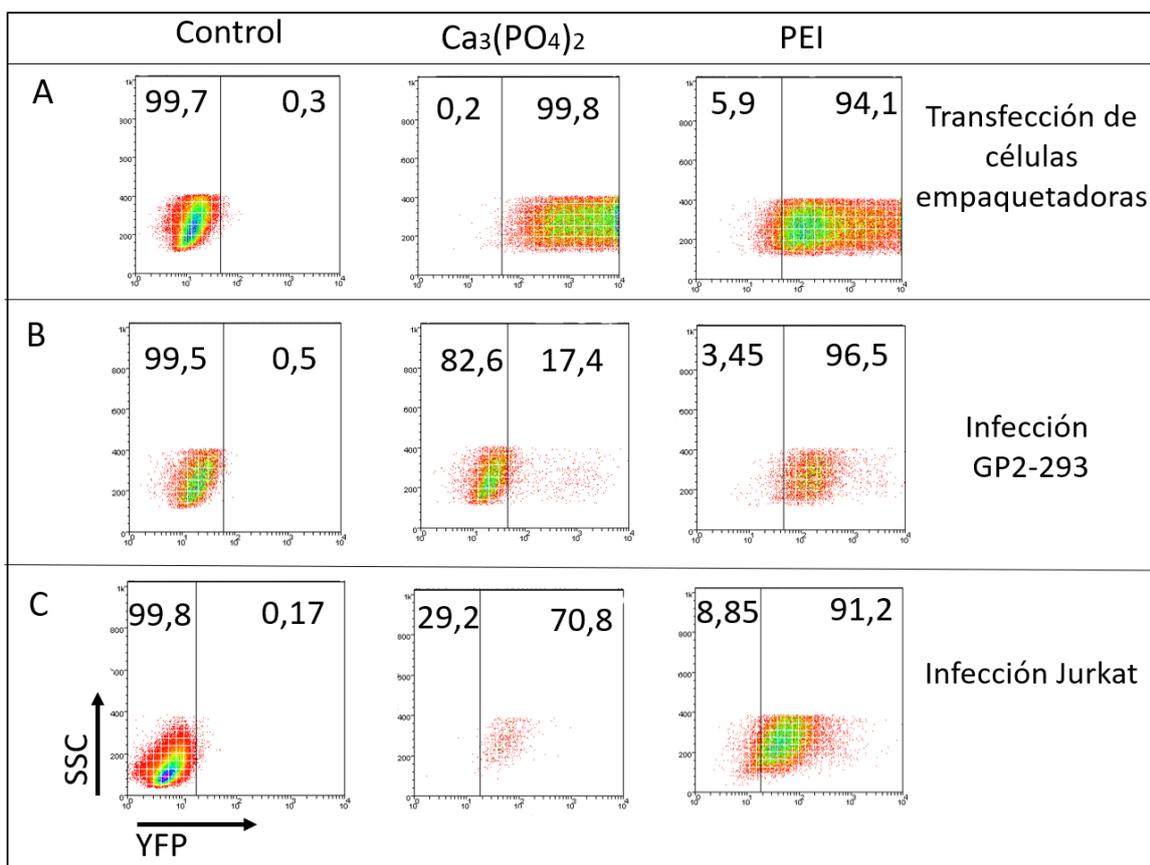


Figura 7. Eficiencia de infección de las líneas celulares GP2-293 y Jurkat con los lentivirus producidos utilizando los agentes Ca₃(PO₄)₂ y PEI para la transfección de la línea empaquetadora GP2-293. (A) Transfección de la línea empaquetadora GP2-293 con todos los plásmidos para la producción lentiviral. (B) Infección de células GP2-293 con los lentivirus obtenidos por ambos métodos. (C) Infección de células Jurkat con los lentivirus obtenidos usando ambos agentes para la transfección de la línea celular empaquetadora. n=1 en todos los casos.

4.3.2. Selección de la línea celular empaquetadora más eficaz

Debido a la disponibilidad de dos líneas celulares empaquetadoras (293T y GP2-293), se trató de identificar cuál de ellas proporcionaba una mayor efectividad. Para ello, ambas líneas se sembraron al mismo tiempo y densidad celular y se les adicionó el mismo volumen de una mezcla de transfección. Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes con las partículas virales y se utilizaron para la infección de 150.000 células Jurkat, todo en las mismas condiciones para eliminar cualquier diferencia en la eficacia en el proceso de infección que no fuera asociada a la concentración del lentivirus.

Los resultados del experimento mostraron una mayor tasa de infección de las células Jurkat por la exposición a los virus producidos en la línea GP2-293 (Figura 8). Por ello, se seleccionaron las células GP2-293 como línea celular empaquetadora de referencia para la generación de lentivirus. Estos resultados pueden ser explicados por el hecho de que, aunque ambos tipos celulares derivan de la línea celular HEK-293, las células GP2-293 poseen en su genoma los genes *gag* y *pol* integrados de forma estable, lo que hace que ya posean una copia de estos genes previa al proceso de transfección. Para la generación de lentivirus en esta línea celular únicamente sería necesario aportar los genes de la envuelta y el plásmido de transferencia con el ADN de interés. No obstante, se decidió transfectar siempre todos los genes implicados en la formación de partículas lentivirales infectivas (psPax.2 + pMD2.G + plásmido de transferencia) con el objetivo de incrementar la efectividad del proceso.

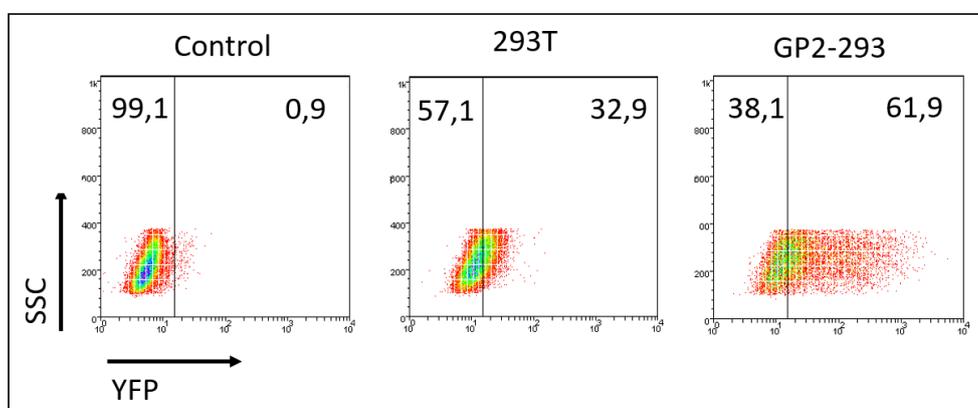


Figura 8. Expresión de YFP en la línea Jurkat tras la infección con lentivirus producidos por distintas células empaquetadoras: 293T y GP2-293. La figura recoge los diagramas de puntos obtenidos en la infección de 150.000 células Jurkat $n=1$.

4.3.3. Selección de policationes para el proceso de infección

El sulfato de protamina y el polibreno son policationes que incrementan la eficiencia del proceso de infección ya que neutralizan las repulsiones electrostáticas entre la envoltura del virión y la membrana de las células, debidas, especialmente, a la presencia de ácidos siálicos (61). Por lo tanto, permiten un mejor acercamiento entre las partículas virales y las células diana.

A partir de un mismo sobrenadante de virus, se concentró su contenido y se adicionó a partes iguales sobre cultivos con 150.000 células Jurkat. Únicamente se verificó la acción de ambos compuestos sobre células en suspensión dado que el objetivo principal del desarrollo de este trabajo es modificar células NK. Los resultados muestran (Figura 9) como el polibreno es la mejor opción, aunque el sulfato de protamina también obtiene una buena eficacia. De acuerdo con estos datos, el polibreno será el agente potenciador de la infección utilizado como método de referencia, aunque, en aquellos experimentos donde se observe elevada toxicidad derivada de su uso, el sulfato de protamina puede considerarse una buena alternativa.

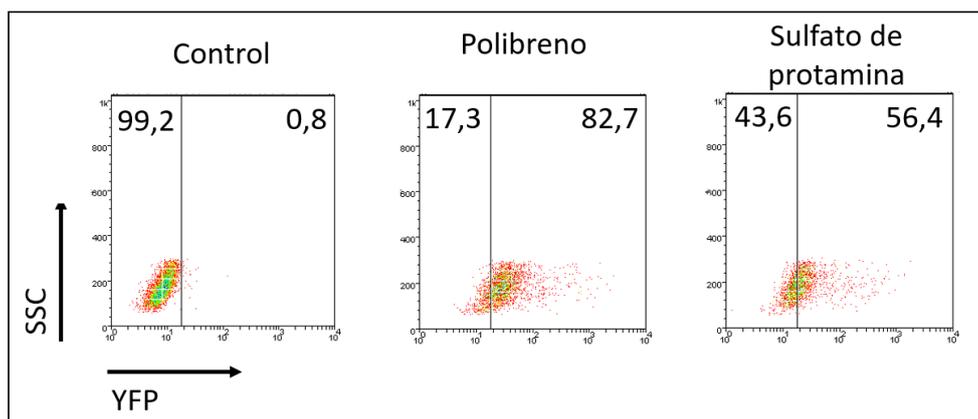


Figura 9. Expresión de YFP en células Jurkat tras un proceso de infección lentiviral. Las partículas lentivirales portadoras del plásmido pBABE-puro-YFP se emplearon para infectar 150.000 células Jurkat utilizando distintos compuestos que incrementan la eficiencia del proceso (polibreno y sulfato de protamina). $n=1$.

4.4. Infección de células NK-92

Tras haber optimizado el proceso de transfección viral tanto en células adherentes como en células en suspensión, se llevó a cabo la infección de la línea celular NK-92 con lentivirus que contenían el gen para la expresión de YFP. En este caso, se estudiaron distintas variaciones del protocolo previamente establecido en el laboratorio para los otros tipos celulares. El análisis de todos los resultados obtenidos mostró que se puede alcanzar una rendimiento en la infección del 14-19% utilizando los 10 mL de suspensión viral derivados de una placa de cultivo de células empaquetadoras transfectadas (Figura 10.A).

No obstante, el proceso de infección tiene un marcado efecto citotóxico para las células NK-92 tal como demuestra la Figura 10.B. La población seleccionada dentro de las regiones R_1 y R_2 de las Figuras 10.A y 10.B alberga las células NK-92 viables. Se puede observar como, especialmente en el caso de la infección mostrada en la Figura 10.B, el porcentaje de eventos registrados en el análisis dentro de la región descende del 25,6% del cultivo control al 0,9% en el infectado. No obstante, en el caso del experimento de la Figura 10.A esta disminución de la viabilidad no es tan acusada, detectándose una disminución de la viabilidad del 16,7% frente al 24,7% de la prueba de la Figura 10.B. La diferencia entre ambos experimentos de infección únicamente fue el número de células inicialmente sembrado, siendo 200.000 en el caso del ensayo de la Figura 10.A y 100.000 en el experimento de la Figura 10.B. Por ello, a pesar de que ambos consiguieron unas eficiencias de infección similares (Figura 10.C/D), la siembra inicial de 200.000 células resultó más adecuada.

La obtención de una mejor viabilidad tras la infección del cultivo con una mayor densidad celular quizá pueda atribuirse al modo de crecimiento de las células NK-92. Para que se encuentren en estado óptimo requieren de una densidad de cultivo que les permita fácilmente formar agregados multicelulares.

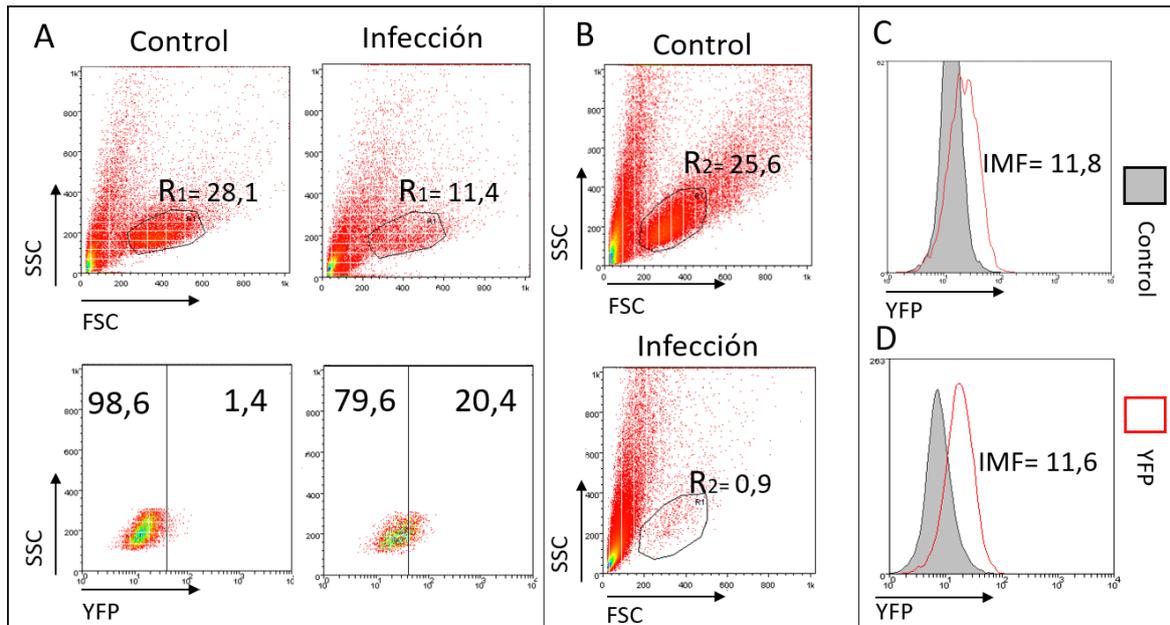


Figura 10. Expresión de YFP en la línea celular NK-92 tras la infección con lentivirus portadores de su gen. (A) Diagramas de puntos pertenecientes a un cultivo de 200.000 células NK-92 infectadas, con su respectivo control. Los diagramas de puntos de la parte inferior (YFP/SSC) están referidos a la región R₁. n=1.(B) Diagramas de puntos de la infección de 100.000 células NK-92. El porcentaje de infección de este experimento fue del 14%. R₂ contiene las células NK-92 viables. n=1 (C) Histograma tras el proceso de infección de la sección A, referido a la Región R₁.(D) Histograma relativo al experimento de la sección B y referido a las células vivas de R₂. IMF (intensidad media de fluorescencia) expresada como la resta de la IMF del cultivo transfectado mediante lentivirus con YFP menos la IMF del control, en ambos histogramas.

Se estudió otra manera de infectar las células NK-92 para intentar incrementar la eficacia del proceso con un protocolo adaptado de Miah *et al.*(62). No obstante, se obtuvieron resultados negativos tanto para las células NK-92 como para las Jurkat utilizadas como control del experimento.

4.5. Aislamiento, expansión e infección de células NK primarias

Se realizó la expansión de células NK de sangre periférica de acuerdo a las especificaciones detalladas en la sección 3.3 de *Materiales y métodos*. A día 14 se caracterizaron las poblaciones linfocitarias para verificar que el proceso se hubiera desarrollado satisfactoriamente. Como puede observarse en la Figura 11.A se produjo un incremento de la población de células NK en el cultivo como consecuencia de los estímulos aportados, aumentando del 5,7% de los PBMCs recién purificados al 28,2% a día 14. La realización de este experimento tuvo como objetivo la obtención de células primarias para, posteriormente, poderlas someter a un proceso de infección con lentivirus portadores del gen de la YFP, pudiendo así, hacer un análisis comparativo con respecto a las líneas celulares.

Para el proceso de infección se siguió siempre el mismo esquema: se sembraron 120.000 células Jurkat, PBMC totales y células NK aisladas sobre las cuales se dispensó, repartido a partes iguales, la cantidad total de virus obtenida de una misma placa previamente concentrada. La infección de células Jurkat se realizó como control interno del proceso. Para

las células primarias fue imprescindible la suplementación del medio con IL-2 e IL-15 en las cantidades anteriormente descritas.

La infección se realizó a diferentes días de la expansión (día 7, 14 y 21) de los PBMCs. En la mayoría de los casos, la evaluación del cultivo por citometría de flujo evidenció que la viabilidad del mismo se había visto drásticamente comprometida por el proceso de infección. Esto podía observarse por el hecho de que, en los diagramas de puntos FSC/SSC, la población de PBMCs o células NK aisladas desaparece de la región R_0 , determinada gracias a las células control (Figura 11.B). Por ello, a pesar de detectar un cierto desplazamiento de la fluorescencia respecto al pico control (Figura 11.C), la cantidad de células viables infectada es mínima. Además, hay que considerar que la señal detectada puede ser debida a la ganancia de autofluorescencia de las células apoptóticas. La Figura 11.C se corresponde con el histograma obtenido en la infección de PBMCs tras 14 días de expansión, donde puede observarse un leve desplazamiento del pico de fluorescencia. A pesar de realizar infecciones a días 7, 14 y 21, tanto de PBMCs, como de células NK aisladas, solamente en el experimento mostrado en la Figura 11.B/C el cultivo mantuvo una cierta viabilidad.

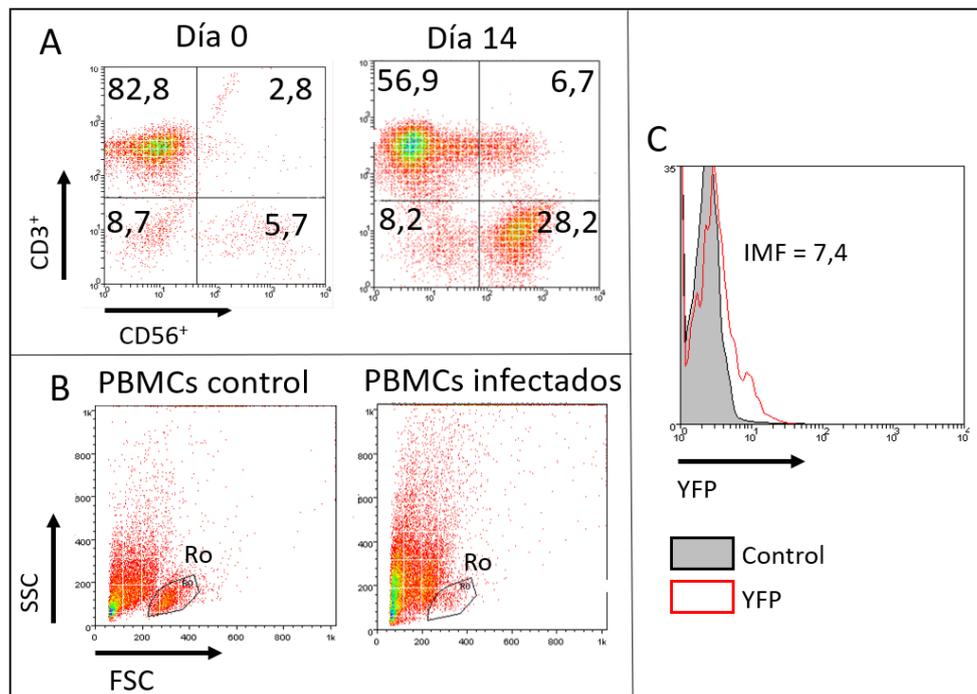


Figura 11. Expansión de PBMCs e infección con lentivirus portadores de YFP. (A) Fenotipado de los PBMCs a día 0 y 14 con anticuerpos anti-CD3 y CD56. La población $CD56^+CD3^-$ se corresponde a las células NK, $CD56^+CD3^+$ son células NKT y $CD56^-CD3^+$ linfocitos T. (B) Diagramas de puntos de PBMCs infectados a los 14 días del inicio de la expansión. La región R_0 alberga las células de interés. (C) Histograma de la infección de PBMCs mostrada en B, referido a las células vivas, localizadas en la región R_0 . IMF expresada como la resta de la IMF del cultivo transfectado mediante lentivirus con YFP menos la IMF del control. $n=1$

En definitiva, para la modificación genética de células primarias es necesaria la definición de unas nuevas condiciones de infección, dado que la mayoría de los intentos realizados han mostrado una toxicidad para el cultivo demasiado elevada. Atendiendo a los resultados

obtenidos, parece ser que el día 14 de la expansión es el momento en el que las células se muestran menos sensibles, pero, es necesaria la realización de nuevos experimentos para poder confirmarlo.

4.6. Evaluación de la transfección de pCCL-MUC1

Una vez comprobada la optimización del protocolo de transfección, mediante infección lentiviral del gen reportero YFP en las diferentes líneas celulares, se decidió analizar la transfección del plásmido que codifica el CAR frente a MUC1, pCCL-MUC1, utilizando el protocolo anteriormente optimizado.

Se realizaron diversas infecciones siguiendo el protocolo tal y como se detalla en el apartado 3.5. Para las células GP2-293 se utilizaron 2 mL de suspensión viral por cada 100.000 células. En el caso de la línea celular Jurkat, se usaron volúmenes de entre 6-10 mL de suspensión viral concentrada para el mismo número de células. Para determinar la eficiencia del proceso de infección por citometría de flujo, se utilizó el anticuerpo anti-c-myc-FITC, que reconoce este epítipo localizado en la región extracelular del CAR anti-Tn de MUC1. Los resultados obtenidos con ambas líneas siempre fueron negativos, salvo en uno de los casos, donde se detectó una infección del 4% en células Jurkat. En este experimento en particular se habían realizado dos infecciones consecutivas, con 10 mL de virus concentrados cada una de ellas y una incubación de 24 horas entre ambas (Figura 12.A/B).

Debido a esta baja infección con la construcción del CAR frente a MUC1, se estudió todo el proceso de producción de las partículas lentivirales. En primer lugar, se evaluó la expresión del plásmido pCCL-MUC1 en la línea GP2-293 al transfectarse en solitario con PEI. Los resultados mostraron una expresión muy baja, con un porcentaje promedio de eficacia de transfección de $8,91 \pm 0,2$ (Figura 12.D), lo cual es un indicador de que quizá algún factor no esté funcionando adecuadamente. Resultados similares se obtuvieron cuando se repitió este ensayo, pero transfectando con todos los plásmidos requeridos para la producción viral. No obstante, la ausencia de expresión de los genes del plásmido de transferencia en las células empaquetadoras, no excluye que éstas no sean capaces de formar partículas virales, de ahí que se realizaran sucesivas infecciones, especialmente con la línea celular Jurkat.

Debido a la ausencia de marcaje en los experimentos, se barajó la hipótesis de que quizá las células Jurkat estuvieran eficientemente infectadas pero que la construcción del CAR no fuera capaz de exponerse a la membrana citoplasmática, no pudiendo entonces detectarse a través del epítipo c-myc. Por ello, se realizó también un marcaje intracelular del cultivo en el que anteriormente se había detectado un 4% de infección. Los resultados fueron similares, no apreciándose un incremento sustancial del marcaje (Figura 12.C), por lo que se descartó que el CAR estuviera correctamente formado en el interior celular, sin poder llegar a la región extracelular.

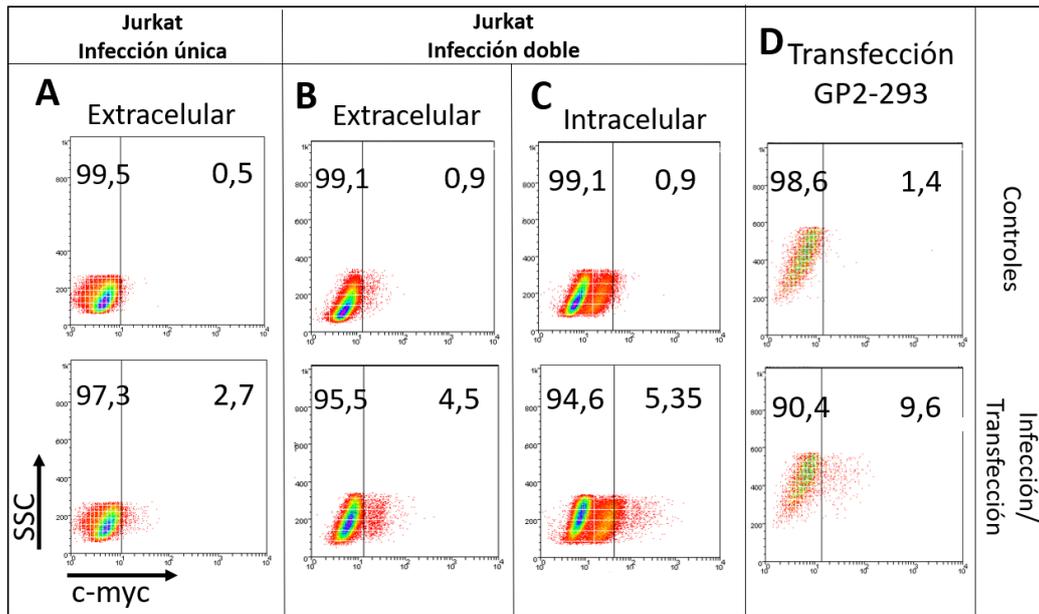


Figura 12. Expresión del CAR anti-Tn de MUC en diferentes líneas celulares. (A) Cultivo Jurkat infectado una sola vez. $n=1$ (B) El cultivo Jurkat del experimento de la sección A se re infectó con lentivirus portadores del CAR y se realizó un marcaje extracelular para su valoración con el anticuerpo anti-c-myc-FITC. $n=1$ (C) Cultivo Jurkat de la sección B marcado intracelularmente. $n=1$ (D) Transfección con PEI de pCCL-MUC1 sobre 100.000 células GP2-293 $n=3$.

4.7. Análisis de la expresión de MUC1 en diferentes líneas celulares de CCR

El análisis del fenotipo en cultivos 2D y 3D de las diferentes líneas de CCR, en cuanto a la expresión de la glicoproteína MUC1, se llevó a cabo mediante el marcaje con dos clones de anticuerpos diferentes: HMPV y SM3. Se analizaron con ambos anticuerpos las líneas: HCT-116, HT29, SK-CO-1, DLD-1, Caco2 y MCF7.

HMPV reacciona contra el *core* de la proteína MUC1. En el fenotipado de los cultivos 2D, únicamente hubo un marcaje relevante en la línea celular de referencia MCF7, definida como control interno de este anticuerpo, con una intensidad media de fluorescencia (IMF) de $184,7 \pm 56,1$ (Figura 13.2D). En cuanto a las líneas de CCR, sólo se detectó un leve desplazamiento respecto al pico del isotipo en las líneas celulares SK-CO-1 y DLD-1 en uno de los marcajes realizados. Por otro lado, en el análisis de cultivos 3D, no se observó un desplazamiento del pico del anticuerpo con respecto al isotipo en ninguna de las líneas de CCR pero sí en la línea MCF7, con un resultado de IMF de 72.2 (Figura 13.3D), inferior al detectado en 2D. Estos resultados parecen indicar que la expresión de MUC1 podría variar como consecuencia del método de cultivo. No obstante, deberían de hacerse más repeticiones del marcaje para poder asegurarlo.

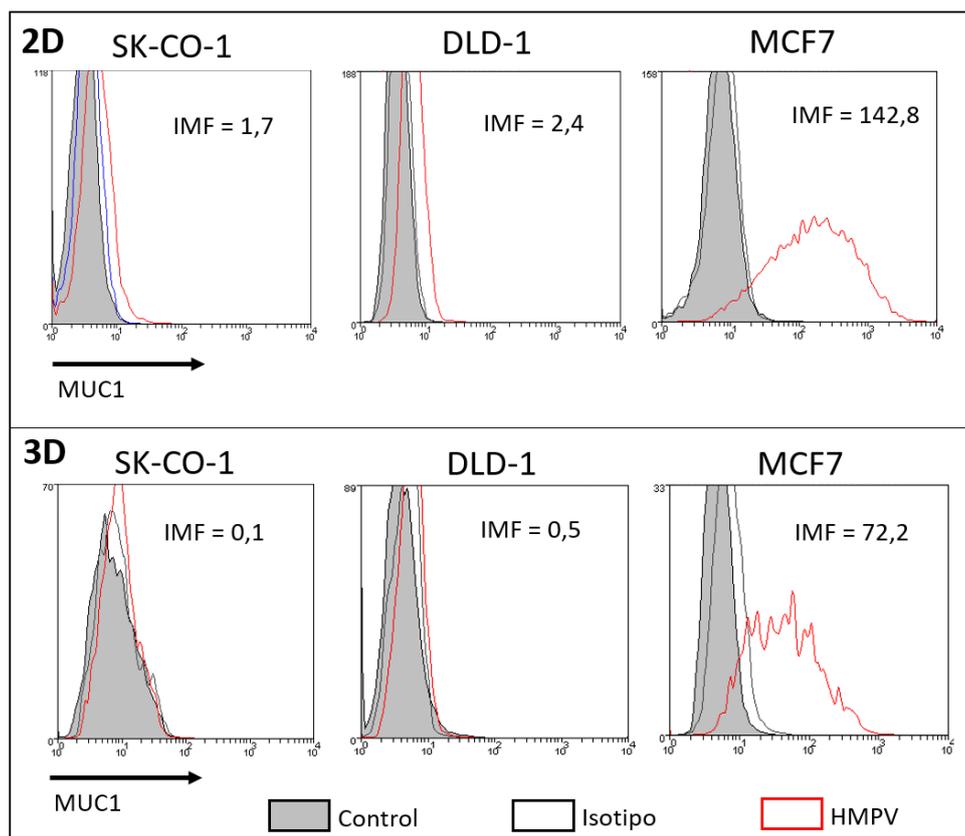


Figura 13. Expresión de MUC1 en cultivos 2D y 3D de las líneas SK-CO-1, DLD-1 y MCF7 con el anticuerpo HMPV-FITC. Las IMF fueran calculadas restando la IMF del isotipo a la IMF obtenida para el marcaje con el anticuerpo HMPV. Cultivos 2D: SK-CO-1 n=2, DLD-1 n=2 y MCF7 n=3. Cultivos 3D: SK-CO-1 n=1, DLD-1 n=1 y MCF7 n=1.

El anticuerpo SM3, que reconoce el antígeno Tn de MUC1, no resultó ser apropiado para citometría de flujo puesto que no manifestó marcaje ni siquiera con la línea MCF7, recomendada como control interno por la casa comercial.

4.8. Evaluación de la actividad citotóxica de NK-92 contra líneas de CCR

Puesto que el objetivo final de la investigación es desarrollar células CAR-NK-92 y poder realizar un estudio comparativo frente a las células NK-92 sin transfectar, se desarrollaron una serie de experimentos para determinar la actividad citotóxica de esta línea. Para ello se efectuaron co-cultivos de la línea NK-92 junto con diferentes tipos celulares, tanto en configuración 2D como en 3D. En todos los resultados de este apartado, el porcentaje de muerte celular se calculó restando la viabilidad de las células diana co-cultivadas con NK-92 del porcentaje Anexina-V y 7-AAD negativo del control (sin NK-92). En el Anexo 4 se muestra un ejemplo de cómo se realiza la evaluación de un ensayo de citotoxicidad de estas características mediante citometría de flujo.

4.8.1. Estudio de la capacidad citotóxica en cultivos 2D

Se analizó la citotoxicidad de la línea NK-92 frente a cultivos en 2D de células de CCR (HCT-116, HT29, SK-CO-1 y Caco2), la línea celular MCF7 y la línea celular en suspensión K-562. Este último tipo celular fue utilizado como control interno ya que las células K-562

son especialmente sensibles a la acción de las células NK debido a la carencia de expresión de MHC-I. Se evaluaron diferentes ratios célula efectora:célula diana y se analizó la muerte celular inducida mediante el marcaje con Anexina-V y 7-AAD en la población negativa para la sonda eFluor670. Las diferentes réplicas del experimento realizadas con cada una de las líneas se efectuaron en días diferentes, para poder descartar los efectos asociados a la condición puntual de alguno de los cultivos. Como puede observarse en la Figura 14, la línea celular NK-92 mostró una actividad citotóxica moderada tras 4 h de co-cultivo con las células diana. A ratios altos provocan la muerte de un 30-40% del cultivo celular, mientras que a ratios bajos su efectividad desciende hasta valores próximos al 10-15% en todas las líneas. La línea celular K-562 es la que muestra mayor sensibilidad a ratios altos, tal y como cabría de esperar, no obstante, esta diferencia desaparece a los ratios bajos. Por otra parte, dentro de las líneas procedentes de tumores sólidos, la línea HCT-116 resultó ser la más sensible; mientras que la línea Caco2 presenta mayor resistencia, aunque las diferencias entre líneas celulares no son significativas.

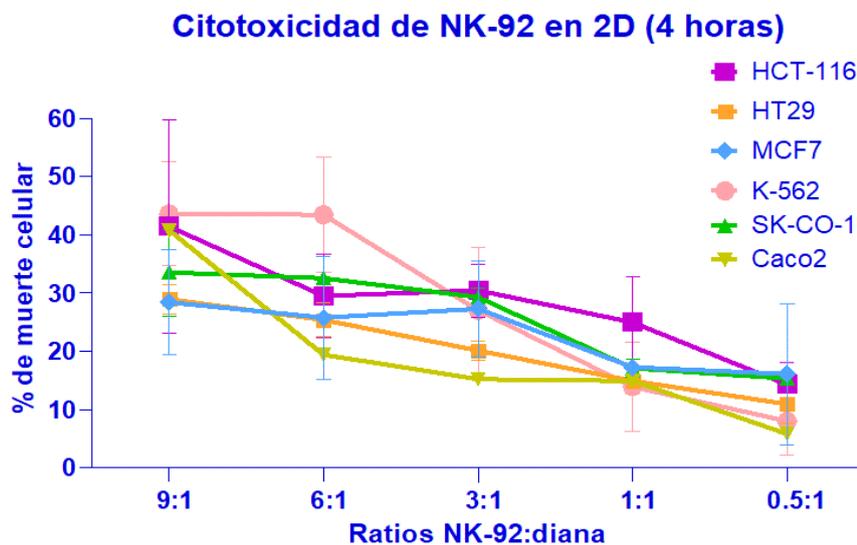


Figura 14. Citotoxicidad de las células NK-92 frente a diferentes líneas celulares en cultivo 2D. Las células NK-92 se añadieron a distintos ratios sobre cultivos de HCT-116, HT29, MCF7, K-562, SK-CO-1 y Caco2 y se mantuvieron en co-cultivo durante 4 horas. Para evaluar el porcentaje de muerte celular las células se marcaron con Anexina-V y 7-AAD para su análisis por citometría de flujo. Los datos de la gráfica se muestran como media \pm SEM. El número de experimentos independientes realizados para cada una de las líneas fueron: HCT-116 n=3, HT29 n=4, MCF7 n=2, K-562 n=3, SK-CO-1 n=2 y Caco2 n=1. Se aplicó un test estadístico ANOVA de dos factores, no encontrándose diferencias significativas entre ninguna de las líneas para los diferentes ratios $p > 0.05$ ns.

4.8.2. Determinación de la citotoxicidad de NK-92 frente a cultivos 3D de CCR

Se evaluó la capacidad citotóxica de la línea celular NK-92 frente a cultivos 3D, denominados esferoides, de líneas celulares de CCR: HCT-116 y HT29. Aplicando el protocolo de cultivo 3D, descrito en el apartado 3.2.5, se obtuvieron esferoides de un tamaño de entre 4000 y 5000 células para la línea celular HCT-116 y de aproximadamente 3000-4000 células para la línea celular HT29. Se adicionaron las células NK-92 a diferentes ratios pero, en este caso, se mantuvieron en co-cultivo durante 24 horas. Pasado el tiempo de

incubación, se analizó el porcentaje de muerte celular mediante citometría de flujo por marcaje con Anexina-V y 7-AAD.

La Figura 15 muestra una clara diferencia de sensibilidad entre las líneas celulares HCT-116 y HT29 a ratios elevados, observándose una mayor muerte celular de las células HT29. La línea celular HCT-116 presenta una elevada resistencia a la acción de las células NK-92, lo que se refleja en un porcentaje de muerte celular bajo, de aproximadamente el 10%, independientemente del ratio utilizado.

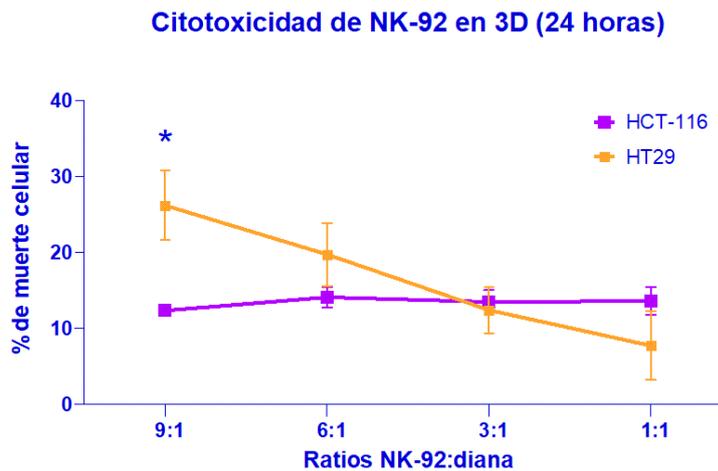


Figura 15. Citotoxicidad de las células NK-92 frente a cultivos 3D (esferoides) de las líneas celulares HCT-116 y HT29 tras de 24 horas de incubación. Los datos de la gráfica vienen representados como media \pm SEM. $n=3$ para ambas líneas celulares en experimentos independientes. Se realizó el test estadístico ANOVA de dos factores donde * $p<0.05$.

De acuerdo con los resultados recogidos en los ensayos 2D, las células de CCR parecen manifestar una mayor sensibilidad a la acción de las células NK-92 cuando crecen en forma de monocapa, probablemente debido a una mayor accesibilidad de las células diana y a la expresión diferencial de genes asociados a cada forma de crecimiento. Esta variación de la susceptibilidad asociada al modo de crecimiento se comprobó al desarrollar un ensayo en 2D de forma paralela al modelo esferoide (apartado 3.7.3), tal y como se representa en la Figura 16. Los resultados muestran como ambas líneas incrementan de forma significativa su resistencia a la citotoxicidad de las células NK-92 cuando crecen en 3D.

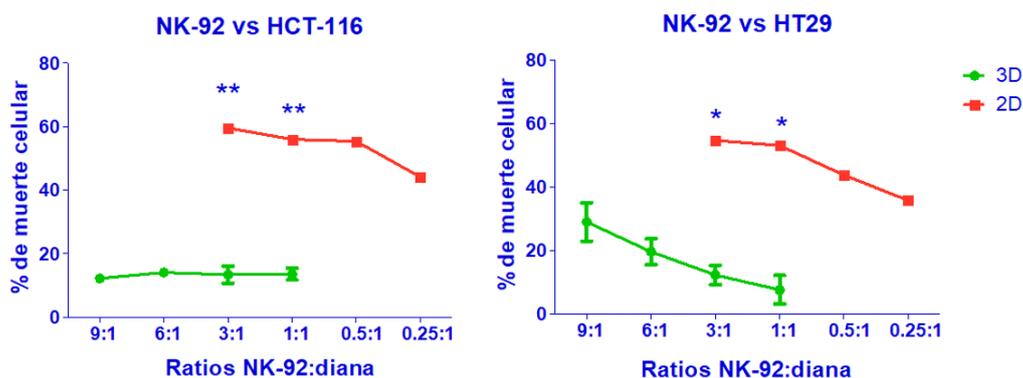


Figura 16. Citotoxicidad de la línea celular NK-92 frente a líneas de CCR en 2D y 3D tras 24 horas de co-cultivo. Se comparó la sensibilidad de las líneas (A) HCT-116 y (B) HT29 a la acción de las células NK-92 en 3D y 2D de forma paralela. Para evaluar el porcentaje de muerte celular se marcó con Anexina-V y 7-AAD para su análisis por citometría de flujo. Datos expresados como media \pm SEM. 3D n=2; 2D n=1 en ambas gráficas. Se realizó el test estadístico ANOVA de dos factores para los ratios comunes (3:1 y 1:1) donde * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

Durante la realización de todos los experimentos anteriores siempre se hizo uso del microscopio óptico para analizar cualquier cambio no deseado de los cultivos y para verificar un buen desarrollo del experimento. En los experimentos a 24 horas se detectó que había una diferencia considerable en la morfología de las células de CCR, en ambas condiciones de cultivo (3D y 2D), dependiendo de si el periodo de co-incubación se había realizado únicamente con DMEM completo o con una mezcla al 50% (v/v) de α MEM y DMEM (ambos completos). Tales diferencias no se detectaron en la citotoxicidad 2D a 4 horas, probablemente debido al corto periodo de incubación.

Por ello, se hicieron algunos experimentos con el objetivo de identificar si las diferencias morfológicas del cultivo también podrían tener un impacto en la viabilidad celular.

Uno de los ensayos realizados fue analizar por citometría de flujo la viabilidad de un cultivo de células de CCR que durante 24 horas se hubiera incubado con DMEM al 100% o una mezcla de α MEM y DMEM al 50% (v/v). En la gráfica A de la Figura 17 puede observarse como la utilización de la mezcla de medios para el cultivo de células de CCR en 2D hace disminuir su viabilidad significativamente, un 15-20%. A partir de estos resultados, también se decidió analizar el efecto del medio sobre la actividad citotóxica de las células NK-92. Para ello se hizo un ensayo de citotoxicidad 2D a 24 horas con ambas composiciones del medio. Tal y como refleja la gráfica B de la Figura 17 la actividad citotóxica de las células NK-92 sufre un fuerte descenso, especialmente a los ratios más bajos. Quizá esta disminución de la capacidad citotóxica de la línea sea provocada por el aumento de la muerte de las células NK-92 que puede verse en la citometría de flujo. También podría asociarse a cambios en el metabolismo de las células de CCR y NK-92 motivados por los cambios en la composición del medio. Algunas de las diferencias principales que podrían causar estos datos son: la mayor cantidad de glucosa del medio DMEM, el mayor enriquecimiento en aminoácidos del α MEM, la IL-2 suplementada con el medio α MEM o el suero de caballo

adicionado en el medio α MEM cuya composición en factores de crecimiento, así como en otras moléculas, como lípidos, difiere del SFB.

Por lo tanto, la consideración de los posibles efectos del medio es fundamental para la realización de ensayos de citotoxicidad puesto que puede variar los resultados obtenidos, ya sea asociado al efecto de su composición sobre la acción de las células efectoras o por la repercusión que tiene sobre la viabilidad de las células diana.

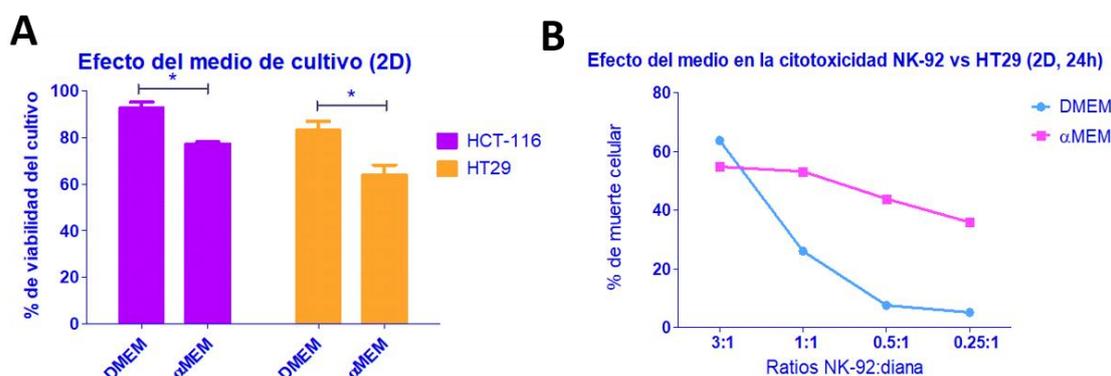


Figura 17. Efecto de la composición del medio en ensayos de citotoxicidad 2D con la línea NK-92 a 24 horas. (A) Repercusión del medio sobre la viabilidad de las líneas HCT-116 y HT29 tras su cultivo en 2D durante 24 horas con medio DMEM completo (DMEM) o una mezcla 50% (v/v) de DMEM y α MEM completos (α MEM). Los datos vienen expresados como media \pm SEM. HCT-116 n=2 HT29 n=3. Se realizó el análisis estadístico t test de Student, donde * $p < 0.05$. (B) Muerte celular causada por la línea celular NK-92 dependiendo del medio usado para la co-incubación de 24 horas con células HT29. n=1

4.9. Cuantificación de la producción de TGF- β 1 en células de CCR

Con el objetivo de valorar la producción de TGF- β 1 en las diferentes líneas tumorales, se realizó un ensayo tipo ELISA con las muestras obtenidas de sus sobrenadantes de cultivo. Para poder normalizar los resultados, se efectuó el recuento de las células totales contenidas en las placas utilizadas en la obtención del TGF- β . El ELISA se realizó con las muestras tratadas con HCl para liberar el TGF- β 1 inactivo a la forma activa, que es la única que puede detectar el kit. Asimismo, también se dispusieron al mismo tiempo los sobrenadantes sin ser tratados previamente mediante HCl para identificar la posible presencia de la forma del TGF- β 1 activo de forma fisiológica, que debido al tratamiento de acidificación es degradada. Todas las muestras se cuantificaron por duplicado.

Las muestras no activadas con HCl no mostraron absorbancia en ninguno de los casos. Sin embargo, la activación ácida sí permitió detectar la presencia del TGF- β 1, observándose diferencias significativas entre las distintas líneas. Las células HCT-116 son aquellas que muestran una mayor producción de esta citoquina, de aproximadamente 30 pg/mL por cada 10^6 células, seguida de SK-CO-1 y por último, la línea DLD-1. Por otra parte, las líneas HT29, MCF7 y Caco2 no manifestaron producción de esta citoquina en cantidades detectables, lo cual es un indicativo de la heterogeneidad fenotípica de diferentes líneas asociadas a un mismo tipo de cáncer.

Cuantificación de la producción de TGF- β 1 en diferentes líneas celulares

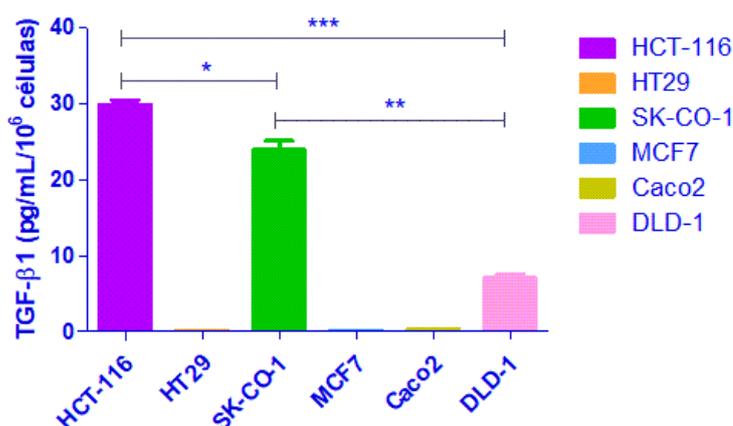


Figura 18. Cuantificación de la producción de TGF- β 1 por las líneas de CCR y MCF7. Se recogieron sobrenadantes de los medios de cultivo de las diferentes líneas celulares para realizar su cuantificación mediante un ELISA tipo sándwich. Los resultados vienen expresados como media \pm SEM. $n=2$. Se realizó el análisis estadístico *t* test de Student, donde * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, ns, no significativo. Las líneas celulares con producción de TGF- β 1 no detectada (HT29, MCF7 y Caco2) mostraron diferencias significativas de *** con respecto a las células HCT-116 y SK-CO-1 y de ** para DLD-1.

4.10. Obtención de una línea de HCT-116 que exprese de forma estable genes reporteros.

Uno de los objetivos planteados en este trabajo fue la obtención de una línea celular de HCT-116 que expresase de forma estable los genes reporteros ZsGreen y Luc2P. Para ello se generaron partículas lentivirales en la línea 293-GP2 mediante la utilización del plásmido de transferencia pHIV-Luc-ZsGreen de acuerdo al procedimiento detallado en el apartado 3.5.1. El sobrenadante con los virus producidos se centrifugó 5 min a 500 x g y posteriormente se filtró a través de un filtro de 0.22 μ m para asegurar la eliminación de todos los restos celulares de 293-GP2.

Se sembraron 300.000 células HCT-116 en un pocillo de una placa de 6 pocillos y se adicionaron 3 mL de la suspensión viral. Tras 24 horas de cultivo, se reemplazó el sobrenadante por otros 3 mL de suspensión lentiviral con el objetivo de lograr la mayor tasa de infección, sin comprometer la viabilidad del cultivo. La elección de este procedimiento se basó en un experimento previo en el que se utilizaron 9 mL de sobrenadante de virus concentrado para infectar 100.000 células, lo que desencadenó la muerte del cultivo.

Mediante citometría de flujo se analizó la eficiencia de la transfección viral tras 72 horas desde la última adición lentiviral. Los datos mostraron la expresión de ZsGreen en un 33% de las células del cultivo (Figura 19.A).

A continuación, se procedió a realizar una dilución límite del cultivo, sembrando un total de 2 placas completas de 96 pocillos. Tras 2 semanas de incubación, se observaron colonias en 25 pocillos, que se tripsinizaron y sembraron en placas de 48 pocillos con el objetivo de expandirlas y evaluarlas posteriormente por citometría de flujo. Antes de este análisis se trató de visualizar las colonias mediante microscopía de fluorescencia para hacer un cribado

más rápido. Sin embargo, debido a las interferencias de señal del medio de cultivo y a que no fue posible sustituirlo por PBS para garantizar la viabilidad de los clones, no se pudieron obtener imágenes adecuadas con este método, aunque ayudó en el proceso de selección.

Finalmente, sólo tres de los clones analizados mostraron un desplazamiento claro de su IMF. En la Figura 19.B pueden observarse los diagramas de puntos obtenidos en los tres clones elegidos: AE7, AE9 y BC4, donde se puede comprobar que AE7 es el que mayor expresión de ZsGreen presenta.

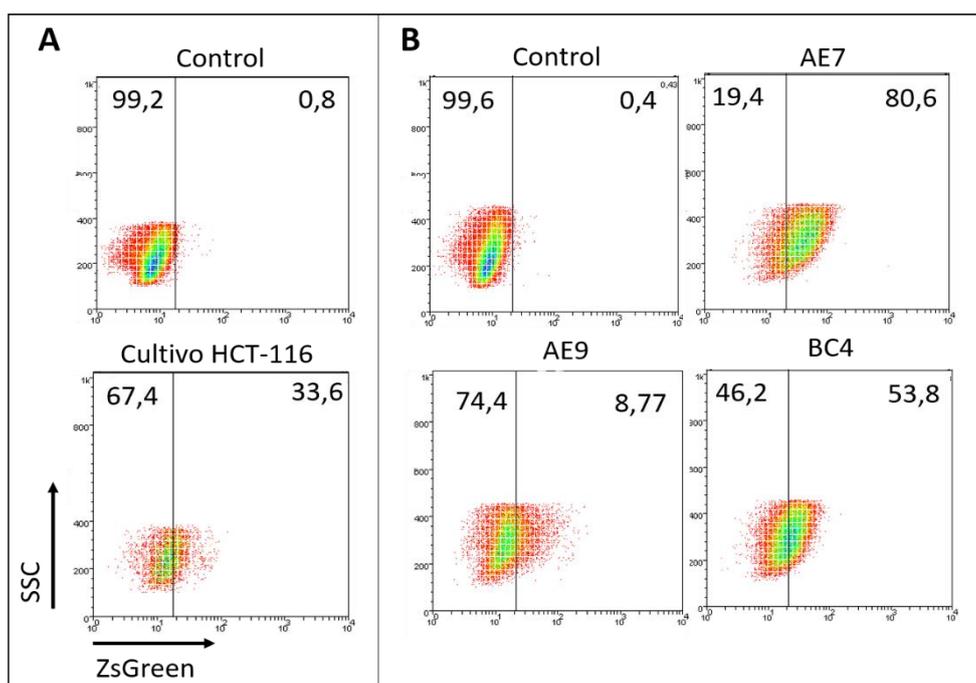


Figura 19. Expresión de ZsGreen en el cultivo y los clones transfectados de la línea HCT-116. Los diagramas de puntos mostraron un desplazamiento en la intensidad de fluorescencia acorde con la expresión de ZsGreen (A) Diagrama de puntos resultante de la infección doble del cultivo de HCT-116. (B) Evaluación por citometría de flujo de los clones (AE7, AE9 y BC4) obtenidos tras la dilución límite de la línea HCT-116 transfectada con los genes ZsGreen y Luc2P.

5. Discusión

A pesar de los avances en la investigación para la prevención, detección y tratamiento del CCR, todavía existen un gran número de personas que mueren a causa de esta enfermedad en todo el mundo (1). Especialmente importante es el desarrollo de nuevas terapias para eliminar aquellos tumores que han desarrollado resistencia a los tratamientos quimioterápicos convencionales y mecanismos de evasión del ataque del sistema inmunitario (50). En esta línea, el uso de células inmunológicas con potencial citotóxico, como las células NK, modificadas genéticamente mediante CARs y otros genes que refuercen su acción antitumoral, se ha propuesto como una buena alternativa para la solución de este problema.

El objetivo principal propuesto para este proyecto consistió en la optimización de un protocolo de transfección lentiviral de células NK para la expresión de CARs de cuarta

generación (anti-Tn de MUC1 y anti-TGF- β) que mejoren su respuesta contra el CCR. A pesar de que no se han conseguido obtener las células CAR-NK, se han logrado avances en el desarrollo de un protocolo de transfección lentiviral de este tipo celular.

Durante la primera fase del proceso de optimización, se utilizó el gen reportero de la YFP para poder realizar un seguimiento fácil de todas las etapas. Se consiguió la infección lentiviral de células, tanto adherentes (GP2-293) como en suspensión (Jurkat), con eficiencias elevadas debido a su facilidad de transfección. Sin embargo, cuando el mismo protocolo optimizado se utilizó para la infección de células NK-92, el rendimiento máximo que se pudo obtener fue de entre el 14-19%. La línea celular NK-92 ha sido objeto de estudio para su modificación genética por múltiples investigadores debido a su potencial para el desarrollo de terapias celulares adoptivas para el tratamiento del cáncer (38). La mayoría de los investigadores han seleccionado la transfección viral como método para la introducción de los genes deseados ya que permiten la incorporación del material genético exógeno de forma estable (43). Sin embargo, la administración de genes a través de vectores virales a las células NK siempre ha demostrado ser un desafío debido a que la eficacia del proceso es menor en comparación a otras células, como los linfocitos T (63). Es posible que esta resistencia a la infección viral esté relacionada con el hecho de que forman parte de los primeros elementos de respuesta del sistema inmune ante las infecciones virales. Esta función puede haber favorecido que hayan sido seleccionadas evolutivamente para tener una alta resistencia ante la acción de los virus (64). Por otro lado, la mayoría de los virus seleccionados para estos protocolos se basan en agentes con alta capacidad infectiva sobre linfocitos T, como los retrovirus o lentivirus, los cuales no está claro que infecten a las células NK con la misma efectividad (63).

Existen tantos protocolos diferentes como investigaciones se han desarrollado, no habiendo unas pautas fijas para la infección de estas células. Sin embargo, todos ellos se fundamentan en la utilización del método de *spin infection* en presencia de compuestos policatiónicos como el polibreno o el sulfato de protamina. Al igual que diversidad de métodos, también existe mucha variabilidad entre los porcentajes de células infectadas conseguidos, que varían desde el 5% hasta el 80% (62, 65, 66).

Son múltiples las estrategias que se han ido desarrollando para incrementar la eficacia de la infección viral en células NK: utilización de células estimuladoras, rondas múltiples de infección, co-cultivo con células productoras de virus, etc. Especialmente interesante es el estudio de Sutlu *et al.* donde afirman que la combinación de las interleuquinas 2 y 12 refuerza la transfección lentiviral. Además, demostraron que el uso de un inhibidor de la vía de señalización IKK ϵ /TBK1, relacionada con la respuesta inmune antiviral, llamado BX795, mejora considerablemente la eficiencia de transfección lentiviral tanto en células NK primarias humanas como en líneas celulares, como NK-92 o Jurkat (64). Por ello sería interesante, de cara a futuras investigaciones, la adición de compuestos al medio que puedan mejorar el rendimiento del proceso de infección lentiviral.

No obstante, la capacidad infectiva que se ha obtenido en este trabajo puede ser suficiente si lo que se busca es generar una línea estable que exprese los CARs diseñados. Mediante métodos de selección (citometría con separación celular, MACS, diluciones límite...) puede lograrse la obtención de un cultivo de células transfectadas, ya sea homogéneo, por la expansión clonal de una única célula; o heterogéneo, procedente de múltiples células que han integrado el material genético exógeno en diferentes puntos de su genoma. Por lo tanto, con la eficiencia de infección detectada por la expresión de YFP en el proceso de optimización en la línea celular NK-92, podría ser suficiente para el desarrollo de una investigación de estas características.

Una vez establecido un protocolo que permite una tasa de infección moderada en las células NK-92 con un gen reportero, se continuó el estudio con las partículas lentivirales portadoras de los genes de los CARs. Sin embargo, la baja expresión del CAR anti-MUC1 en líneas fácilmente transfectables como Jurkat o GP2-293, hizo que no se probara la transfección de células NK, mucho más resistentes al proceso de infección.

En base a los experimentos anteriormente realizados con el gen de la YFP es probable que la incapacidad para lograr la expresión del CAR con reconocimiento por MUC1 esté asociada con la construcción génica diseñada. El plásmido pCCL contiene el promotor EF-1 α , caracterizado por permitir una expresión fuerte y estable en múltiples tipos de líneas tumorales humanas (67). Por lo tanto, la transfección en solitario del plásmido pCCL-MUC1 con PEI sobre la línea celular GP2-293 ya debería de demostrar una elevada expresión, de forma similar a lo que ocurre con la YFP del plásmido pBABE-puro-YFP. Estos resultados hacen evidente la existencia de algún condicionante que está imposibilitando la correcta formación de la proteína del CAR. Debido a la diversidad de factores que intervienen en los procesos de transcripción, traducción y modificación postraduccional, el abanico de posibilidades que pueden impedir la correcta expresión de la construcción génica diseñada es enorme. Es posible que la secuencia contenga algún factor que esté limitando o imposibilitando la transcripción adecuada del transgén. También pueden estar dándose problemas a nivel de regulación postranscripcional debido a un ARNm inestable o su incapacidad para ser traducido eficientemente. Asimismo, el fallo puede darse también a nivel proteico ya que la construcción puede tener no alcanzar el plegamiento deseado y ser degradada rápidamente por el proteasoma, adquirir una estructura que oculte el epítipo c-myc, etc. Por ello, para intentar verificar dónde se encuentra el error sería precisa la realización de otro tipo de experimentos como por ejemplo Western blot o RT-qPCR con el fin de identificar el problema y rediseñar la secuencia con el fin de solventarlo.

Paralelamente al desarrollo de las células CAR-NK se han efectuado experimentos que permitan su posterior análisis y caracterización. En esta línea, se ha realizado el fenotipado de diferentes líneas de CCR para su expresión de MUC1, tanto en cultivo 2D como 3D. La alteración del grado y patrón de glicosilación de la glicoproteína MUC1, tanto en CCR como en otros carcinomas, ha sido ampliamente descrita (18). Las células tumorales se

caracterizan por la sobreexpresión de esta proteína junto con una disminución del grado de glicosilación, lo que facilita la exposición del *core* proteico, posibilitando su reconocimiento por múltiples anticuerpos (51). Los patrones de los oligosacáridos unidos a las proteínas pueden diferir significativamente. Esto hace que los glicopéptidos encontrados en células sanas se distingan de las células tumorales, pero siendo imposible describir un patrón único para ellas (18). En esta investigación se desea lograr la incorporación de un CAR con reconocimiento por el antígeno tumoral Tn de MUC1 en células NK. Sin embargo, debido a la heterogeneidad en los patrones de glicosilación de las células tumorales es preciso determinar la abundancia del antígeno Tn en las células de CCR en las cuales se va a evaluar la funcionalidad del CAR diseñado. Esto es importante puesto que es posible que no todas las células expresen el antígeno Tn. Por ejemplo, en el CCR se ha descrito un elevado grado de sialilación, que podría conllevar a la conversión de Tn en su forma STn, provocando su enmascaramiento (23, 24) y dificultando el reconocimiento antigénico por parte de anticuerpos dirigidos específicamente contra él. Para el reconocimiento antigénico del CAR anti-MUC1 se eligió la scFv del anticuerpo AR20.5 debido a la alta especificidad demostrada en clínica (58). Dado que se está desarrollando un CAR basado en su scFv, sería recomendable el uso previo de dicho anticuerpo para la caracterización de las líneas celulares donde se va a determinar la efectividad de las células CAR-NK. Sin embargo, la imposibilidad de disponer de dicho anticuerpo motivó la selección del clon SM3 para la caracterización de las líneas de CCR. Para ambos anticuerpos ha sido descrito su fuerte reconocimiento por el Tn de MUC1 mediante cristalografía de rayos X (57). Debido a que el clon SM3 no mostró reconocimiento ni siquiera con la línea celular de control MCF7, la opción más posible es que no sea un anticuerpo válido para citometría de flujo y deban de explorarse otras técnicas como la inmunohistoquímica para su utilización. No existe la estructura cristalográfica de ningún otro anticuerpo anti-MUC1 que reconozca la estructura del antígeno Tn, pero sí que se han descrito otros anticuerpos, mediante otros métodos, cuya afinidad por la proteína también se centra en la misma región, por lo que debería de evaluarse su estudio (56).

Por otra parte, mediante el anticuerpo HMPV no pudo detectarse ninguna diferencia en la variación de la IMF entre cultivos 2D y 3D de células de CCR, ya que el marcaje fue prácticamente nulo para todas las líneas en las dos condiciones de crecimiento. Sin embargo, en la línea celular de cáncer de mama MCF7, sí se observó una disminución de IMF en los cultivos 3D con respecto a los 2D, lo cual podría ser indicativo de que la expresión de MUC1 podría variar dependiendo de la condición de cultivo también en células de CCR. No obstante, para realizar un estudio sobre la influencia del modo de crecimiento en la expresión y/o glicosilación de MUC1 habría que utilizar otros anticuerpos anti-MUC1, así como técnicas como el Western blot, inmunohistoquímica o RT-qPCR.

Dentro del grupo de experimentos efectuados para poder analizar la actividad de las futuras CAR-NK, se realizó la evaluación de la citotoxicidad de la línea celular NK-92 contra

diferentes células de CCR tanto en cultivos 2D, como 3D. En lo referente a su actuación sobre cultivos 2D, puede decirse que su capacidad citotóxica fue moderada con respecto a células NK primarias, según estudios previos del grupo. En los ensayos realizados por Lanuza *et al.* evaluaron la actividad citotóxica de células NK primarias activadas frente a líneas de CCR (HT29, Caco2 y HCT-116). En el cultivo 2D, las NK primarias activadas manifestaron una alta citotoxicidad, con valores próximos al 50-80% dependiendo de la línea celular. También realizaron valoraciones de la actividad citotóxica de células NK primarias sin activación previa (68), cuyos valores se asemejan más a los obtenidos en este estudio con las células NK-92. Lanuza *et al.* determinaron que las células HCT-116 mostraban una mayor resistencia a ratios altos, mientras que los datos obtenidos en esta investigación sugieren lo contrario. Probablemente esta discrepancia sea debida al uso de células NK primarias frente a la línea celular NK-92.

Además, en la investigación de Lanuza *et al.* también realizaron un análisis de la actividad antitumoral de células NK primarias contra cultivos de CCR en 3D, en condiciones similares a las realizadas durante este trabajo. Detectaron que las células NK primarias activadas eran capaces de provocar valores próximos al 50% de muerte celular tras 24 horas de co-incubación con los cultivos 3D (68). Los resultados de los experimentos de citotoxicidad realizados en este trabajo, con la línea celular NK-92, muestran un 25% de muerte celular para la línea celular HT29 y de un 10% para HCT-116, con el ratio más alto (9:1), lo que supone unos valores drásticamente inferiores en comparación a las células NK primarias. Únicamente a ratios bajos parece no haber diferencias tan notables entre la acción de las células NK-92 y las primarias. Por lo tanto, a pesar de que el uso de líneas celulares establecidas y aprobadas para su uso en clínica, como las células NK-92, presenta múltiples ventajas con respecto a los tratamientos basados en células NK primarias, tienen el inconveniente de que presentan una menor capacidad citotóxica contra las células de CCR. Por ello es necesario el desarrollo de estrategias que permitan reforzar su actividad citotóxica, como por ejemplo su modificación genética mediante CARs. Especialmente acusada ha sido la disminución de su actividad ante cultivos 3D, por ello, la construcción génica del CAR de 4ª generación anti-TGF- β que co-expresa el gen de la hialuronidasa, proteína que degrada la matriz extracelular, podría resultar un fuerte potenciador de su capacidad facilitando la infiltración tumoral.

La modificación genética con CARs anti-MUC1 se ha llevado a cabo con éxito en linfocitos T para el tratamiento de tumores sólidos (52-55). Por lo tanto, esto hace pensar que el desarrollo de células CAR-NK anti-MUC1 también favorecerá su actividad antitumoral. Sin embargo, en este trabajo no ha podido desarrollarse un estudio comparativo debido a la imposibilidad de lograr la introducción del CAR anti-MUC1 diseñado en las células NK.

Por otro lado, existen muchas investigaciones que han destacado la importancia del TGF- β en el desarrollo de tumores sólidos como el CCR (11). El TGF- β tiene un efecto inmunosupresor sobre las células NK, por ello se diseñó un CAR con reconocimiento

antigénico de esta citoquina, con el objetivo de convertirla en una señal activadora para las células NK modificadas. Para poder evaluar con posterioridad si las células transfectadas con la segunda construcción génica portadora del CAR anti-TGF- β y la hialuronidasa ve reforzada su acción por la presencia de esta citoquina en el medio, se realizó la cuantificación de su producción en diferentes líneas de CCR. Los datos obtenidos guardan relación con los obtenidos por Kuczynski *et al.* en lo que respecta a las células HCT-116 y DLD-1 (60), mostrando una clara heterogeneidad entre líneas. Existen estudios previos en los que se ha modificado genéticamente las células NK-92 para contrarrestar el efecto inmunosupresor del TGF- β . Por ejemplo, Wang *et al.* desarrollaron una construcción basada en la fracción extracelular del receptor de TGF- β II fusionada con la región transmembrana e intracelular del receptor activador NKG2D consiguiendo así que el TGF- β se convierta en una señal estimuladora, incrementando la citotoxicidad y la migración de las células NK-92 en presencia de esta citoquina (65). Por ello, es posible que, si el CAR anti-TGF- β diseñado consigue transfectarse de forma eficiente en las células NK probablemente genere una mejora de su capacidad antitumoral.

Por último, para el estudio de la capacidad citotóxica de un tratamiento, ya sea mediante células NK u de otro tipo, es importante disponer de líneas celulares que expresen de forma estable genes reporteros para facilitar su uso tanto *in vivo* como *in vitro*. En este ámbito, durante el desarrollo de este proyecto se ha realizado, mediante infección lentiviral, la modificación genética de células HCT-116 para que expresen el gen ZsGreen. Deberán de realizarse experimentos posteriores que confirmen la estabilidad de la transfección así como las características de la nueva línea celular para posteriormente poder ser utilizada para la realización de ensayos de citotoxicidad.

En definitiva, el desarrollo de inmunoterapias mediante células CAR-NK ofrece múltiples ventajas frente a los linfocitos CAR-T. La utilización de líneas celulares establecidas además proporciona beneficios adicionales en lo que respecta a su crecimiento y seguridad. A pesar de que la línea celular NK-92 muestra una elevada citotoxicidad contra neoplasias malignas hematológicas, su efectividad para el tratamiento de tumores sólidos es reducida. Por eso, en la actualidad, los estudios centrados en la utilización de esta línea celular para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, son realizados mediante células CAR-NK-92. No obstante, el desarrollo de una línea modificada no implica únicamente el propio proceso de transfección génica, sino que es preciso desarrollar un conjunto de ensayos y procedimientos que permitan realizar estudios comparativos con el fin de verificar si el producto celular final obtenido ha incrementado su efectividad para la eliminación de células tumorales.

6. Conclusiones

Sintetizando la información obtenida en los múltiples ensayos desarrollados durante esta investigación, las conclusiones que pueden realizarse son las siguientes:

- Se ha optimizado un protocolo de producción e infección lentiviral tanto para células adherentes como en suspensión. No obstante, para lograr mayores eficiencias en células NK la adición de compuestos como citoquinas (IL-2, IL-12), entre otros, podría suponer una mejora del proceso.
- A pesar de conseguir la expansión eficiente de células NK primarias, no se ha logrado su infección, debido probablemente, a su elevada sensibilidad. Por ello, la aplicación de un protocolo con condiciones más suaves y basado en la adición de otros agentes estimulantes de la infección, además de los policationes, podría ser una buena alternativa.
- No se ha conseguido la expresión del CAR de cuarta generación anti-MUC1, tras su transfección. Esto podría ser debido a la existencia de algún condicionante en el diseño de la secuencia génica que imposibilita la detección de la proteína final a través del epítipo c-myc.
- El anticuerpo SM3 no parece ser útil para la detección de MUC1 mediante citometría de flujo.
- Al contrario que la línea celular de cáncer de mama MCF7, las líneas celulares de CCR apenas expresan el epítipo de MUC1 reconocido por el anticuerpo HMPV.
- Los estudios de citotoxicidad de la línea celular NK-92 frente a diferentes células de CCR en cultivos 2D y 3D, han revelado una citotoxicidad moderada contra células en crecimiento 2D y baja para cultivos 3D en comparación con células NK primarias activadas.
- Existe heterogeneidad en la producción de TGF- β por parte de las líneas de CCR.

Conclusions

Synthesizing the information achieved in the multiple experiments developed during this investigation, we can draw the following conclusions:

- A lentiviral production and infection protocol has been optimized for adherent and suspension cells. However, aiming to achieve greater efficiency in NK cell infection rates, the addition of some compounds such as cytokines (IL-2,IL-12), among others, could mean an improvement of the process.
- In spite of achieving an efficient expansion of primary NK cells, their infection was unsuccessful, probably due to their high sensitivity. Therefore, applying a smoother protocol, maybe based on the addition of other agents which stimulate the infection, as well as polycations, could be a good alternative.
- Fourth-generation anti-MUC1 CAR expression has not been achieved after its transfection. It could be due to the existence of some condition in the design of its gene sequence that makes impossible the detection of the final protein through the c-myc epitope.
- SM3 antibody does not appear to be useful for MUC1 phenotyping by flow cytometry.
- In contrast to MCF7 breast cancer cell line, CRC cell lines barely express the MUC1 epitope which was recognized by the HMPV antibody.
- NK-92 cell line cytotoxicity assays against different CCR cells in 2D and 3D cultures, have revealed moderate activity against cells in 2D growth and low cytotoxicity 3D cultures in comparison with activated primary NK cells.
- The production of TGF- β by the CRC lines is heterogeneous.

7. Bibliografía

1. Organization IAfRoC-WH. Cáncer Today Lyon2018 [Available from: <https://gco.iarc.fr/today/home>].
2. Favoriti P, Carbone G, Greco M, Pirozzi F, Pirozzi RE, Corcione F. Worldwide burden of colorectal cancer: a review. *Updates Surg.* 2016;68(1):7-11.
3. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15065.
4. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988;319(9):525-32.
5. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1).
6. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(10):919-32.
7. Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2101-14.e5.
8. Koliaraki V, Pallangyo CK, Greten FR, Kollias G. Mesenchymal Cells in Colon Cancer. *Gastroenterology.* 2017;152(5):964-79.
9. Markman JL, Shiao SL. Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol.* 2015;6(2):208-23.
10. Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D, Castiglioni A, Yuen K, Wang Y, et al. TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature.* 2018;554(7693):544-8.
11. Langenskiöld M, Holmdahl L, Falk P, Angenete E, Ivarsson ML. Increased TGF-beta 1 protein expression in patients with advanced colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 2008;97(5):409-15.
12. Bellomo C, Caja L, Moustakas A. Transforming growth factor β as regulator of cancer stemness and metastasis. *Br J Cancer.* 2016;115(7):761-9.
13. Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llergo A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, et al. TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature.* 2018;554(7693):538-43.
14. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004;21(2):137-48.
15. Colangelo T, Polcaro G, Muccillo L, D'Agostino G, Rosato V, Ziccardi P, et al. Friend or foe? The tumour microenvironment dilemma in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2017;1867(1):1-18.
16. Weidle UH, Georges G, Tiefenthaler G. TCR-MHC/peptide interaction: prospects for new anti-tumoral agents. *Cancer Genomics Proteomics.* 2014;11(6):267-77.
17. Vajaria BN, Patel PS. Glycosylation: a hallmark of cancer? *Glycoconj J.* 2017;34(2):147-56.
18. Baldus SE, Engelmann K, Hanisch FG. MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2004;41(2):189-231.
19. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(12):874-85.
20. Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med.* 2014;20(6):332-42.
21. Sousa AM, Grandgenett PM, David L, Almeida R, Hollingsworth MA, Santos-Silva F. Reflections on MUC1 glycoprotein: the hidden potential of isoforms in carcinogenesis. *APMIS.* 2016;124(11):913-24.
22. Kudelka MR, Ju T, Heimburg-Molinaro J, Cummings RD. Simple sugars to complex disease--mucin-type O-glycans in cancer. *Adv Cancer Res.* 2015;126:53-135.
23. Burdick MD, Harris A, Reid CJ, Iwamura T, Hollingsworth MA. Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines. *J Biol Chem.* 1997;272(39):24198-202.

24. Brockhausen I. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep.* 2006;7(6):599-604.
25. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol.* 1975;5(2):112-7.
26. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001;22(11):633-40.
27. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol.* 2008;9(5):495-502.
28. Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(2):216-24.
29. Martínez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res.* 2015;21(22):5047-56.
30. Gras Navarro A, Björklund AT, Chekenya M. Therapeutic potential and challenges of natural killer cells in treatment of solid tumors. *Front Immunol.* 2015;6:202.
31. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood.* 2005;105(8):3051-7.
32. Bassani B, Baci D, Gallazzi M, Poggi A, Bruno A, Mortara L. Natural Killer Cells as Key Players of Tumor Progression and Angiogenesis: Old and Novel Tools to Divert Their Pro-Tumor Activities into Potent Anti-Tumor Effects. *Cancers (Basel).* 2019;11(4).
33. Geller MA, Miller JS. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy. *Immunotherapy.* 2011;3(12):1445-59.
34. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, et al. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2010;28(6):955-9.
35. Rubnitz JE, Inaba H, Kang G, Gan K, Hartford C, Triplett BM, et al. Natural killer cell therapy in children with relapsed leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62(8):1468-72.
36. Curti A, Ruggeri L, Parisi S, Bontadini A, Dan E, Motta MR, et al. Larger Size of Donor Alloreactive NK Cell Repertoire Correlates with Better Response to NK Cell Immunotherapy in Elderly Acute Myeloid Leukemia Patients. *Clin Cancer Res.* 2016;22(8):1914-21.
37. Paul S, Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2017;8:1124.
38. Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol.* 2013;10(3):230-52.
39. Wang CM, Wu ZQ, Wang Y, Guo YL, Dai HR, Wang XH, et al. Autologous T Cells Expressing CD30 Chimeric Antigen Receptors for Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma: An Open-Label Phase I Trial. *Clin Cancer Res.* 2017;23(5):1156-66.
40. Zhang WY, Wang Y, Guo YL, Dai HR, Yang QM, Zhang YJ, et al. Treatment of CD20-directed Chimeric Antigen Receptor-modified T cells in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: an early phase IIa trial report. *Signal Transduct Target Ther.* 2016;1:16002.
41. Zhang C, Wang Z, Yang Z, Wang M, Li S, Li Y, et al. Phase I Escalating-Dose Trial of CAR-T Therapy Targeting CEA. *Mol Ther.* 2017;25(5):1248-58.
42. Yong CSM, Dardalhon V, Devaud C, Taylor N, Darcy PK, Kershaw MH. CAR T-cell therapy of solid tumors. *Immunol Cell Biol.* 2017;95(4):356-63.
43. Guedan S, Calderon H, Posey AD, Maus MV. Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019;12:145-56.
44. Oberschmidt O, Kloess S, Koehl U. Redirected Primary Human Chimeric Antigen Receptor Natural Killer Cells As an "Off-the-Shelf Immunotherapy" for Improvement in Cancer Treatment. *Front Immunol.* 2017;8:654.

45. Kosti P, Maher J, Arnold JN. Perspectives on Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy for Solid Tumors. *Front Immunol.* 2018;9:1104.
46. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science.* 2018;359(6382):1361-5.
47. Mehta RS, Rezvani K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol.* 2018;9:283.
48. Hu Y, Tian ZG, Zhang C. Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy. *Acta Pharmacol Sin.* 2018;39(2):167-76.
49. Rezvani K, Rouce R, Liu E, Shpall E. Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther.* 2017;25(8):1769-81.
50. de Vries NL, Swets M, Vahrmeijer AL, Hokland M, Kuppen PJ. The Immunogenicity of Colorectal Cancer in Relation to Tumor Development and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7).
51. Price MR, Rye PD, Petrakou E, Murray A, Brady K, Imai S, et al. Summary report on the ISOBM TD-4 Workshop: analysis of 56 monoclonal antibodies against the MUC1 mucin. San Diego, Calif., November 17-23, 1996. *Tumour Biol.* 1998;19 Suppl 1:1-20.
52. Wilkie S, Picco G, Foster J, Davies DM, Julien S, Cooper L, et al. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *J Immunol.* 2008;180(7):4901-9.
53. You F, Jiang L, Zhang B, Lu Q, Zhou Q, Liao X, et al. Phase 1 clinical trial demonstrated that MUC1 positive metastatic seminal vesicle cancer can be effectively eradicated by modified Anti-MUC1 chimeric antigen receptor transduced T cells. *Sci China Life Sci.* 2016;59(4):386-97.
54. Posey AD, Schwab RD, Boesteanu AC, Steentoft C, Mandel U, Engels B, et al. Engineered CAR T Cells Targeting the Cancer-Associated Tn-Glycoform of the Membrane Mucin MUC1 Control Adenocarcinoma. *Immunity.* 2016;44(6):1444-54.
55. Zhou R, Yazdanifar M, Roy LD, Whilding LM, Gavrill A, Maher J, et al. CAR T Cells Targeting the Tumor MUC1 Glycoprotein Reduce Triple-Negative Breast Cancer Growth. *Front Immunol.* 2019;10:1149.
56. Qi W, Schultes BC, Liu D, Kuzma M, Decker W, Madiyalakan R. Characterization of an anti-MUC1 monoclonal antibody with potential as a cancer vaccine. *Hybrid Hybridomics.* 2001;20(5-6):313-24.
57. Movahedin M, Brooks TM, Supekar NT, Gokanapudi N, Boons GJ, Brooks CL. Glycosylation of MUC1 influences the binding of a therapeutic antibody by altering the conformational equilibrium of the antigen. *Glycobiology.* 2017;27(7):677-87.
58. de Bono JS, Rha SY, Stephenson J, Schultes BC, Monroe P, Eckhardt GS, et al. Phase I trial of a murine antibody to MUC1 in patients with metastatic cancer: evidence for the activation of humoral and cellular antitumor immunity. *Ann Oncol.* 2004;15(12):1825-33.
59. Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G, Burland V, Mau B, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol.* 2008;190(7):2597-606.
60. Kuczynski EA, Vilorio-Petit AM, Coomber BL. Colorectal carcinoma cell production of transforming growth factor beta decreases expression of endothelial cell vascular endothelial growth factor receptor 2. *Cancer.* 2011;117(24):5601-11.
61. Seitz B, Baktanian E, Gordon EM, Anderson WF, LaBree L, McDonnell PJ. Retroviral vector-mediated gene transfer into keratocytes: in vitro effects of polybrene and protamine sulfate. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1998;36(8):602-12.
62. Miah SM, Campbell KS. Expression of cDNAs in human Natural Killer cell lines by retroviral transduction. *Methods Mol Biol.* 2010;612:199-208.
63. Carlsten M, Childs RW. Genetic Manipulation of NK Cells for Cancer Immunotherapy: Techniques and Clinical Implications. *Front Immunol.* 2015;6:266.
64. Sutlu T, Nyström S, Gilljam M, Stellan B, Applequist SE, Alici E. Inhibition of intracellular antiviral defense mechanisms augments lentiviral transduction of human natural killer cells: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2012;23(10):1090-100.

65. Wang Z, Guo L, Song Y, Zhang Y, Lin D, Hu B, et al. Augmented anti-tumor activity of NK-92 cells expressing chimeric receptors of TGF- β R II and NKG2D. *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66(4):537-48.
66. Boissel L, Betancur M, Lu W, Wels WS, Marino T, Van Etten RA, et al. Comparison of mRNA and lentiviral based transfection of natural killer cells with chimeric antigen receptors recognizing lymphoid antigens. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(5):958-65.
67. Gopalkrishnan RV, Christiansen KA, Goldstein NI, DePinho RA, Fisher PB. Use of the human EF-1alpha promoter for expression can significantly increase success in establishing stable cell lines with consistent expression: a study using the tetracycline-inducible system in human cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(24):4775-82.
68. Lanuza PM, Viguera A, Oliván S, Prats AC, Costas S, Llamazares G, et al. Activated human primary NK cells efficiently kill colorectal cancer cells in 3D spheroid cultures irrespectively of the level of PD-L1 expression. *Oncoimmunology.* 2018;7(4):e1395123.

Anexos

Anexo 1 - Materiales y aparatos

APARATOS

Equipo	Casa comercial
Centrífuga Allegra x-12r	Beckman Coulter
Microfuga	Beckman Coulter
Microscopio óptico invertido Eclipse	Nikon
Microscopio óptico de fluorescencia invertido	Olympus IX81
Microscopio óptico Optiphot,	Nikon
Baño termostático	Selecta
Campana de flujo laminar vertical	Telstar Bio All
Autoclave Autester, Mod	Selecta
Citómetro GALLIOS	Beckman coulter
Dispositivo de electroforesis Mini-Sub® cell GT cell	Biorad
Transiluminador Gel Doc Xr	Biorad

MATERIALES

FUNGIBLES

Material	Casa comercial
Frascos de cultivo de 75 y 25 cm ²	Deltalab
Puntas desechables de pipeta	Deltalab
Tubos Eppendorf	Deltalab
Filtro 0,22µm	Deltalab
Criotubos	Nunc
Placas de cultivo (Petri y multipocillo)	Deltalab
Parafilm®	Parafilm®

REACTIVOS

Material	Casa comercial
Metilcelulosa	Sigma
Extracto de levadura	Panreac
NaCl	Merk
NaOH	Panreac
HCl	Panreac
Triptona	Panreac
DMSO	Sigma
Agarosa	Schelaru
Tampón de carga 10X	Promega
Lumiprobe dsGreen	Lumiprobe
Ficoll-Paque	Ge Healthcare
Mitomicina-C	Sigma
eFluor670	Thermofisher
Paraformaldehído	Sigma
Cloroquina	Sigma
CaCl ₂	Panreac
PEI	Sigma
Polibreno	Thermofisher
Sulfato de protamina	Sigma

CULTIVO CELULAR

Material	Casa comercial
DMEM high glucosa	Gibco
RPMI 1640	Gibco
α MEM	Gibco
GlutaMax 2 mM	Sigma
SFB	Sigma
Suero de caballo	Sigma
Tripsina/EDTA	Sigma
Antibióticos (penicilina, estreptomicina y ampicilina)	Sigma
IL-2	Sigma
IL-15	Sigma

ANTICUERPOS

Material	Casa comercial
Anti-CD56 PerCP Vio 700	Miltenyi Biotec
Anti CD3 VioGreen	Miltenyi Biotec
Anti-c-myc FITC	Miltenyi Biotec
Anti-CD56 microbeads	Miltenyi Biotec
Isotipo IgG1 FITC	Miltenyi Biotec
Anti-MUC1 FITC clon HMPV	Miltenyi Biotec
Anti-MUC1 FITC clon SM3	Santa Cruz Biotechnology

OTROS

Material	Casa comercial
psPAx2, pMD2.G, pBABE-puro pHIV-Luc-ZsGreen	Addgene
pCCL-MUC1 pCCL-TGF- β	Thermofisher
<i>FavorPrepTM Plasmid Extraction Mini Kit</i>	Favorgen Biotech
<i>FavorPrepTM Plasmid Extraction Midi Kit</i>	Favorgen Biotech
<i>Lenti X Concentrator</i>	Takara Bio
Anexina V-FITC	Thermofisher
7-AAD	Thermofisher
ELISA TGF- β 1 Human/Mouse Uncoated	Thermofisher

Anexo 2 - Tampones

Tampón de trituración:

CaCl ₂ (Merck)	100 mM	4.41 g	pH	5.5
MgCl ₂ (Merck)	70 mM	4.269 g	Almacenamiento	4°C
NaAc·3H ₂ O (Panreac)	40 mM	1.632 g	Cantidad	300 mL (agua destilada)

Tampón de conservación:

CaCl ₂	100 mM	1.47 g	en 85 mL de H ₂ O destilada	
Glicerol	15 %	15 mL	Almacenamiento	4°C

Tampón TBE (Tris-Borato-EDTA)

45 mM Tris	pH	8.3
45mM ácido bórico		
1 mM de EDTA	Almacenamiento:	temperatura ambiente

Tampón MACS

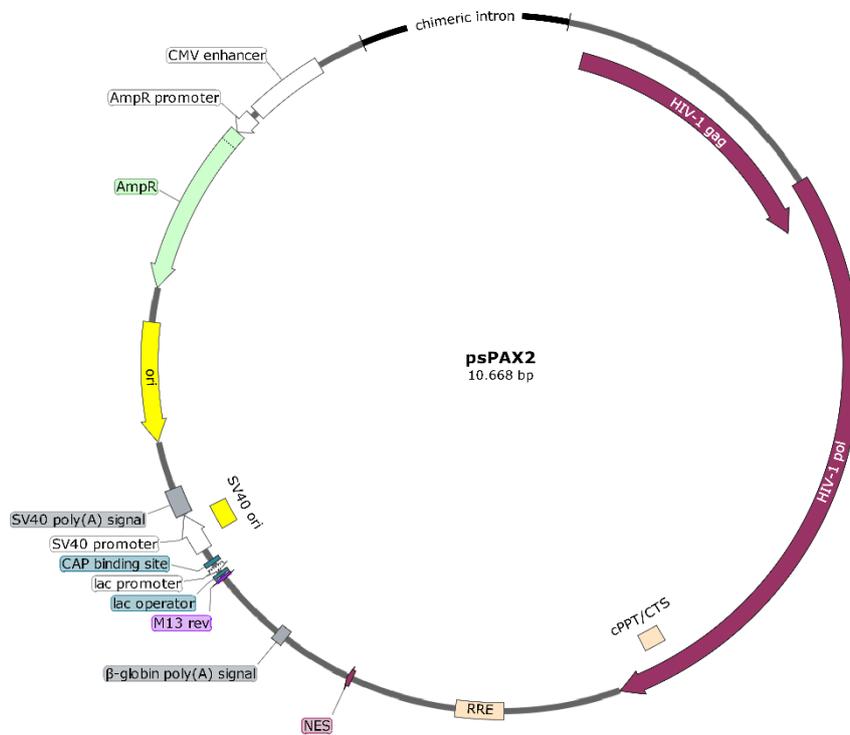
2 mM EDTA		
0.5% (v/v) SFB	Almacenamiento	4°C

Tampón de anexina

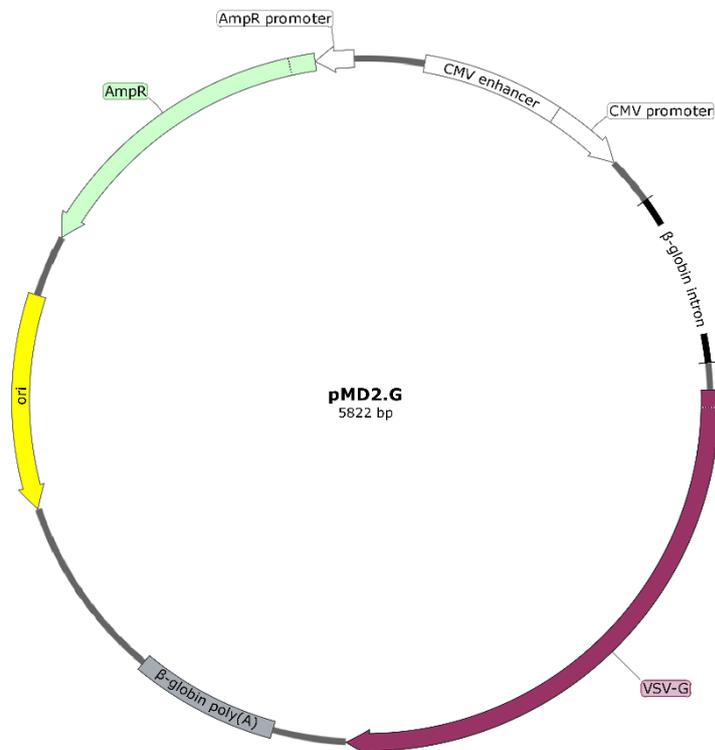
1 mM Hepes/NaOH	pH	7.4
14 mM NaCl		
0.25 mM CaCl ₂ .	Almacenamiento	4°C

Anexo 3 - Plásmidos

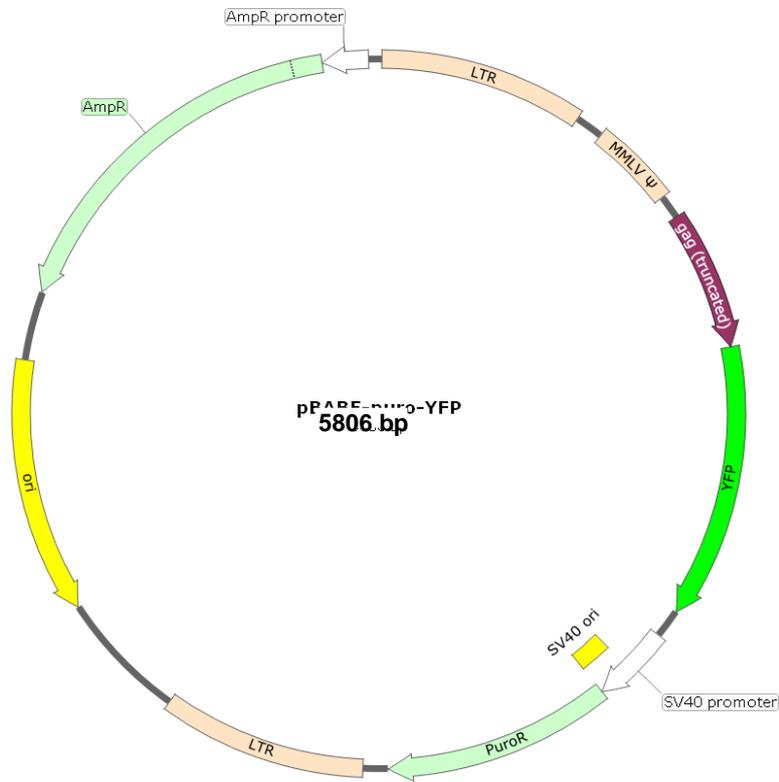
Plásmido de empaquetamiento: psPAX2



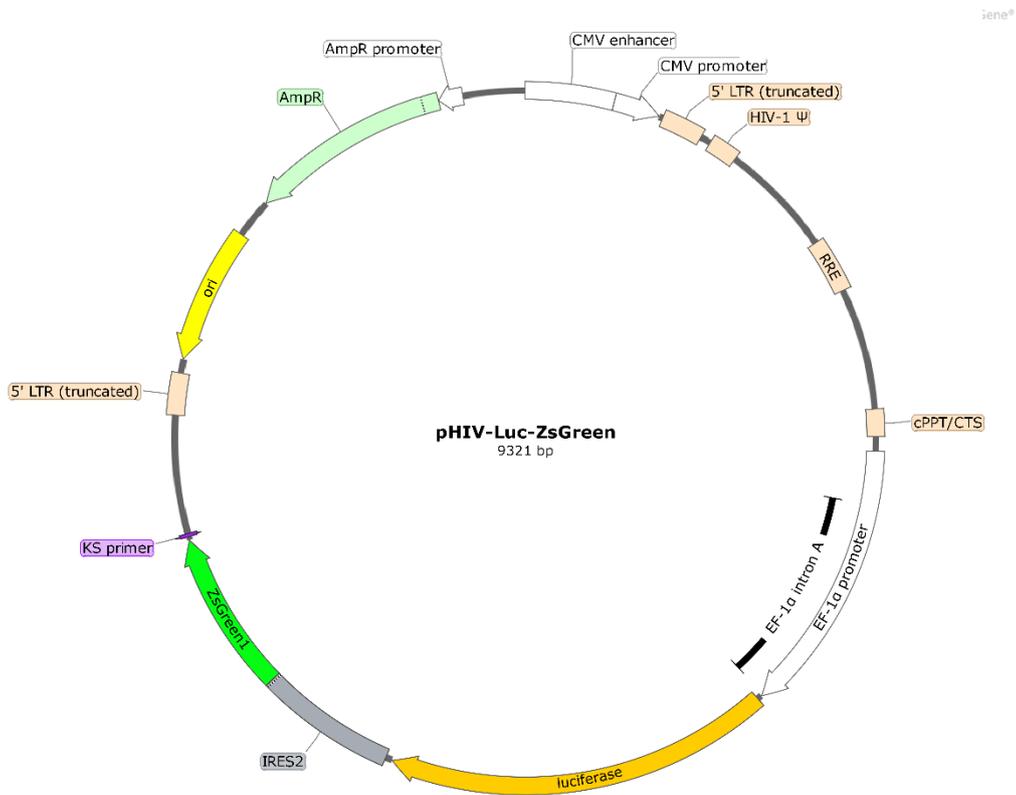
Plásmido de envuelta: pMD2.G



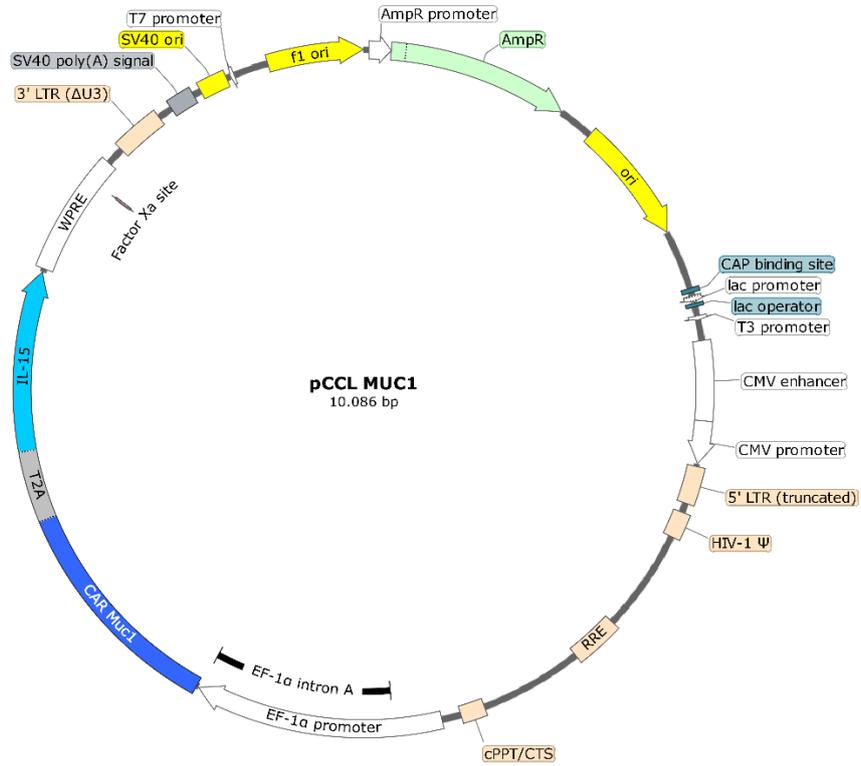
Plásmido de transferencia: pBABE-puro-YFP



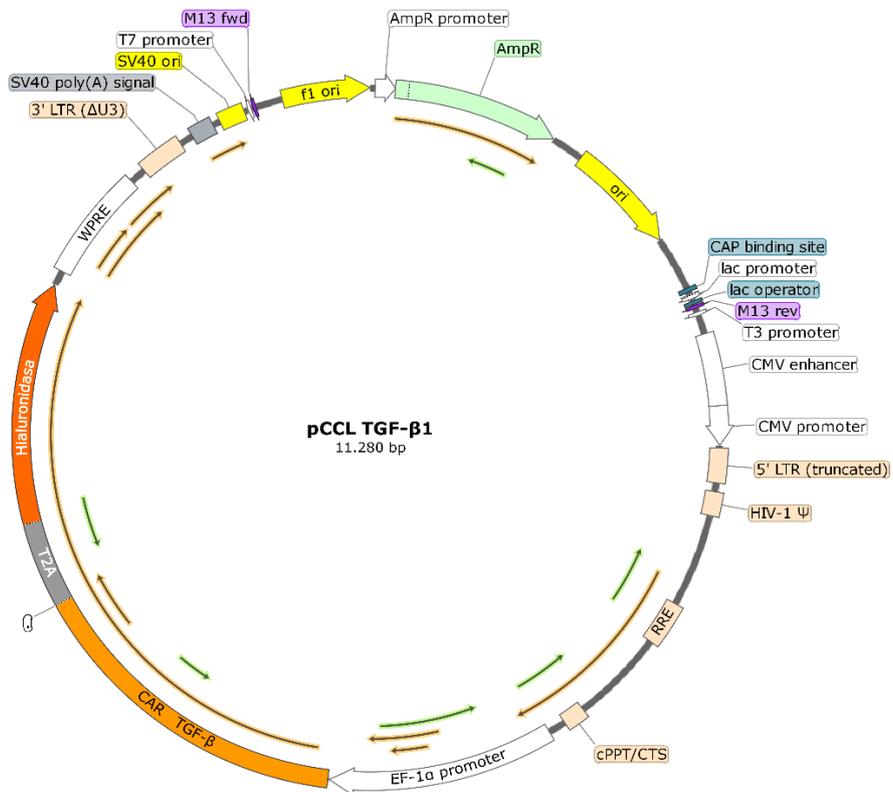
Plásmido de transferencia: pHIV-Luc-ZsGreen



Plásmido de transferencia: pCCL-MUC1



Plásmido de transferencia: pCCL-MUC1



Anexo 4 – Evaluación de la citotoxicidad por citometría de flujo

