



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO *IN VITRO*
DE CULTIVO CELULAR 3D DE
NEUROBLASTOMA PARA EL ESTUDIO DE
INMUNOTERAPIA CON CÉLULAS NK

IN VITRO 3D NEUROBLASTOMA CELULAR
MODEL CHARACTERIZATION FOR THE STUDY
OF IMMUNOTHERAPY WITH NK CELLS

Autora

Cecilia Pesini Martín

Directores

Julián Pardo Jimeno

Ariel Ramírez Labrada

ABREVIATURAS

13cis RA: ácido retinoico con enlace en posición *cis* entre los carbonos 13 y 14
2D: dos dimensiones
3D: tres dimensiones
ABB: tampón de unión de Anexina
CAR: receptor quimérico de antígeno
CEACAM-1: molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno del carcinoma embrionario 1
DNA: ácido desoxirribonucleico
DMEM: medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco
DMSO: dimetilsulfóxido
GD2: gangliósido GD2
GFP: proteína fluorescente verde
GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HLA-I: antígeno leucocitario humano de clase 1
HLA-II: antígeno leucocitario humano de clase 2
IACS: Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud
ICAM-1: molécula de adhesión celular 1
IL2: interleucina 2
IL15: interleucina 15
INGR: Grupo internacional de riesgo del neuroblastoma
KIR: receptor de inhibición de células asesinas naturales
MHC-I: complejo mayor de histocompatibilidad de clase 1
NCR: receptor citotóxico de células NK
NB: neuroblastoma
NK: “natural killer” o asesina natural
PBMC: célula mononuclear de sangre periférica
PBS: tampón fosfato salino
PEI: polietilenimina
PI: yoduro de propidio
PD1: proteína de muerte celular programada 1
PDL1: ligando 1 de muerte celular programada
RNA: ácido ribonucleico
RPMI: medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
SFB: suero fetal bovino
TMA: microambiente tumoral
TAA: antígeno asociado a tumor
TSA: antígeno específico de tumor

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES..... | 1 |
| 2.1. El cáncer..... | 1 |
| 2.2. Cáncer y sistema inmune..... | 2 |
| 2.3. El neuroblastoma..... | 2 |
| 2.3.1. Tratamiento..... | 3 |
| 2.4. Inmunoterapias..... | 3 |
| 2.4.1. Inmunoterapias con células asesinas naturales..... | 4 |
| 2.4.2. Inmunoterapias para el tratamiento del neuroblastoma..... | 5 |
| 2.5. Cultivo celular en 3 dimensiones..... | 5 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 6 |
| 4. OBJETIVOS..... | 6 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 7 |
| 5.1. Cultivo celular..... | 7 |
| 5.1.1. Líneas celulares..... | 7 |
| 5.1.2. Mantenimiento y manipulación de los cultivos de líneas celulares..... | 7 |
| 5.1.3. Recuento y viabilidad celular..... | 7 |
| 5.1.4. Congelación y descongelación de líneas celulares..... | 7 |
| 5.1.5. Cultivo celular 3D por método de gota colgante..... | 8 |
| 5.1.6. Disgregación de esferoides..... | 8 |
| 5.2. Caracterización de líneas celulares..... | 8 |
| 5.2.1. Marcaje extracelular..... | 8 |
| 5.2.2. Marcaje intracelular..... | 8 |
| 5.2.3. Análisis de resultados..... | 8 |
| 5.3. Caracterización de la sensibilidad a drogas usadas en quimioterapia en cultivos 2D y 3D para la línea celular SH-SY5Y | 9 |
| 5.3.1. Estudio de la proliferación mediante Presto Blue..... | 9 |
| 5.3.2. Estudio de muerte celular por Anexina V | 9 |
| 5.4. Expansión de células NK de donantes sanos..... | 10 |
| 5.4.1. Aislamiento de PBMCs..... | 10 |
| 5.4.2. Expansión de células NK..... | 10 |
| 5.4.3. Seguimiento de la expansión..... | 10 |
| 5.5. Citotoxicidad de células NK expandidas sobre células SH-SY5Y GFP..... | 10 |

| | | |
|--------|--|----|
| 5.5.1. | Puesta a punto del uso de células GFP positivas como valor representativo de células viables. | 10 |
| 5.5.2. | Purificación de células NK..... | 10 |
| 5.6. | Visualización celular por microscopía | 11 |
| 5.6.1. | Determinación de la morfología de esferoides por microscopia óptica | 11 |
| 5.6.2. | Microscopia de fluorescencia. | 11 |
| 5.6.3. | Microscopía confocal | 11 |
| 5.6.4. | Preparación de muestras de esferoides para su observación. | 11 |
| 5.7. | Estudio de la estructura de esferoides de la línea celular S-SY5Y por anatomía patológica. | 11 |
| 5.8. | Generación de línea celular SH-SY5Y + GFP-Luciferasa. | 11 |
| 5.8.1. | Obtención de lentivirus e infección de células SH-SY5Y..... | 11 |
| 5.8.2. | Aislamiento de células transformadas | 12 |
| 5.9. | Análisis estadístico | 12 |
| 6. | RESULTADOS | 12 |
| 6.1. | Estudio de la morfología de los esferoides..... | 12 |
| 6.2. | Caracterización de las líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-BE(2)-C en función de su expresión de ligandos de células NK: HLA-I, HLA-II, CEACAM-1, ICAM-1, PDL1, galectina-9 y los TAAs del NB calreticulina y CD47, en modelos 2D y 3D. | 14 |
| 6.3. | Comparación de la sensibilidad de los cultivos 2D y 3D de la línea celular SH-SY5Y a los fármacos usados en clínica. | 15 |
| 6.4. | Comparación de la sensibilidad de los cultivos 2D y 3D de la línea celular SH-SY5Y a células NK activadas. | 18 |
| 6.5. | Expresión de las proteínas GFP y luciferasa en células SH-SY5Y. | 19 |
| 7. | DISCUSIÓN DE RESULTADOS. | 20 |
| 8. | CONCLUSIONES..... | 22 |
| | CONCLUSIONS | 23 |
| 9. | BIBLIOGRAFÍA..... | 24 |

1. RESUMEN

La inmunoterapia se presenta como un nuevo y prometedor tratamiento contra cánceres infantiles como el neuroblastoma (NB). Una de estas nuevas terapias en desarrollo es el uso de células asesinas naturales (NK) modificadas genéticamente para la expresión de receptores de antígenos quiméricos (NK-CAR). En concreto, en nuestro grupo de investigación se está desarrollando un NK-CAR frente a las proteínas CD47 y calreticulina, las cuales son sobreexpresadas en NB. Para el desarrollo de esta terapia, se estudió como paso inicial un modelo de la línea celular SH-SY5Y cultivado en tres dimensiones (3D). Mediante cultivo en 3D se generaron agregados celulares compactos, llamados esferoides, que mimetizan de forma más exacta la arquitectura de un tumor real. Los esferoides de la línea celular SH-SY5Y presentaron diferencias respecto al cultivo tradicional en dos dimensiones en cuanto a sus características fenotípicas y la resistencia frente a los tratamientos estudiados. Se aplicaron las quimioterapias usadas normalmente contra el NB y el tratamiento con células NK activadas para usarlos como referencia para en un futuro evaluar el nivel de actividad de las células NK-CAR desarrolladas. La importancia del modelo celular seleccionado quedó patente en los resultados, y se aceptó el modelo de cultivo de la línea celular SH-SY5Y en 3D como modelo adecuado para el desarrollo de la terapia con células NK-CAR.

ABSTRACT

Immunotherapy is a new and promising therapy against childhood cancer as neuroblastoma (NB). One of these new therapies is a chimeric antigen receptor modified natural killer (NK) cell (NK-CAR). Our laboratory is developing an NK-CAR against CD47 and calreticulin proteins, which are over-expressed in NB. Three-dimension (3D) culture of SH-SY5Y cellular line has been studied for the initial development of this immunotherapy. This culture technique generates high density cellular aggregates, called spheroids, which mimic tumors in a more faithful way. SH-SY5Y spheroids showed phenotypic differences and resistances against treatments compared with traditional two dimensions cell cultures. Regularly used chemotherapy drugs for NB and activated NK cells were tested independently to use them to evaluate the activity of NK-CAR therapy in the future. The results showed the relevance of the chosen cellular culture model. Additionally, SH-SY5Y spheroid model was accepted for the study of the NK-CAR therapy.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1.El cáncer.

Se denomina cáncer a un gran grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento celular desproporcionado y se clasifican en función del tejido en el que se da la transformación maligna (e. g. cáncer de páncreas). El cáncer es la segunda causa de muerte mundial, produciendo más de nueve millones de muerte en 2018¹, y la primera causa de muerte infantil por enfermedad en los países desarrollados, diagnosticándose más de mil casos cada año en España². Los cánceres infantiles más comunes son las leucemias y cánceres del sistema nervioso central. Los nuevos tratamientos han aumentado la supervivencia a los 5 años para aproximadamente un 80% de los pacientes, pese a que las terapias en infantes no han aumentado a la par que en adultos. El cáncer, y en concreto el cáncer infantil, genera un gran impacto social, sobre todo por la vulnerabilidad de la población afectada. Para reducir la morbilidad, el sufrimiento y las muertes por cáncer es necesario el desarrollo de nuevos tratamientos paliativos y terapias por lo que continuar su estudio y comprensión es necesario^{1,3,4}. En el año 2000, D. Hanahan y A. Weinberg definieron seis marcas distintivas (conocidas como “hallmarks”) o puntos claves en el desarrollo del cáncer⁵. El número de *hallmarks* descritos ha

aumentado hasta diez siendo actualmente los siguientes: i) suministro de señales proliferativas, ii) evasión de supresores del crecimiento, iii) establecimiento de inmortalidad por replicación, iv) activación de invasión y metástasis, v) inducción de la angiogénesis, vi) inestabilidad genómica y mutaciones, vii) resistencia a la muerte celular, viii) disregulación del metabolismo energético, ix) evasión del ataque del sistema inmune y x) promoción de la inflamación⁶. De los 10 *hallmarks* definidos se conocen implicaciones de células no tumorales en todos ellos, exceptuando el desarrollo de inmortalidad y la modificación del metabolismo. Los tipos celulares no tumorales que se ven implicados en estos procesos son principalmente: células tipo fibroblastos, células madre mesenquimales relacionadas con las angiogénesis y células del sistema inmune. El conjunto de esas interacciones celulares y las condiciones ambientales amplían la visión de tumor como un cúmulo de células cancerosas y aparece el concepto de microambiente tumoral (TMA), en el que el sistema inmune participa de diversas formas⁷.

2.2.Cáncer y sistema inmune.

El sistema inmune ejerce un papel imprescindible como barrera primaria contra el cáncer, eliminando selectivamente aquellas células que sufren una transformación tumoral. Pese a esto, la generación de tumores y la progresión del cáncer no son siempre controladas, e incluso se tiende a pensar en la posible implicación del sistema inmune en su evolución. Este modelo recibe el nombre de inmunoeedición del cáncer y describe el papel dual del sistema inmune frente a los tumores, estando implicado tanto en la supresión del desarrollo, como en la progresión del cáncer⁶.

El papel protumoral del sistema inmune se debe a dos mecanismos: selección de las células cancerígenas resistentes y generación de un TMA que favorezca su crecimiento⁸. El origen de la resistencia de algunas células tumorales se debe a su expresión alterada de proteínas de membrana, teniendo aumentada la exposición de inhibidores del sistema inmune y disminuida la de aquellas proteínas que son una señal de activación. Las células tumorales usan los mecanismos fisiológicos de inhibición del sistema inmune que evitan una acción desmesurada, para protegerse de su ataque, siendo uno de los más relevantes el sistema PD-1/PDL1¹⁰. La sobreexpresión de estas proteínas las convierte en antígenos asociados a tumores (TAAs), siendo marcadores de células malignas con distintos niveles de selectividad⁸.

2.3.El neuroblastoma.

El neuroblastoma (NB) es un tumor sólido originario de neuroblastos de la cresta neural periférica en desarrollo, que migran para formar el sistema nervioso simpático. Sus homólogas no tumorales continúan con su diferenciación a neuronas adrenérgicas, formando las fibras nerviosas postganglionares del sistema nervioso simpático¹¹⁻¹³.

El NB supone el 8% de los cánceres infantiles y el principal tumor sólido extracraneal¹³. Se detecta en su mayoría durante el primer año de vida y suele localizarse en torno a la glándula suprarrenal (65%) o a lo largo del sistema simpático, en torso o abdomen¹³. Es un tumor de rápido crecimiento y suele presentar zonas de necrosis. En torno al 50% de los casos son considerados de bajo riesgo, los cuales responden al tratamiento, son susceptibles a eventos de regresión espontánea o de diferenciación benigna. La supervivencia para pacientes con tumores de bajo riesgo es de más de un 90%. En la otra mitad de casos, considerados de alto riesgo, el porcentaje de supervivencia pese a tratamientos intensivos y combinados disminuye hasta el 50%. Debido a esto, el neuroblastoma es responsable del 15% de la mortalidad infantil asociada al cáncer¹¹.

La clasificación pretratamiento del grupo internacional de riesgo del neuroblastoma (INGR, por su sigla en inglés)¹⁴ se hace en función de la edad, factores genéticos, estado del cáncer y grado de diferenciación celular. Los tumores localizados y/o que no presentan factores genéticos desfavorables, son por lo general considerados de bajo riesgo, mientras que aquellos tumores originados más tardíamente (más de 18 meses) y/o con factores genéticos como la ampliación del proto-oncogén

MYCN o la aberración 11q (extremo distal del brazo largo del cromosoma 11), son considerados de alto riesgo, al estar relacionados con pronósticos más desfavorables¹⁴.

El INGR define las bases para la determinación del estadio del NB pretratamiento mediante métodos de imagen, generando cuatro estadios. El estadio L1 y L2 corresponden a tumores localizados, diferenciándose en la observación de factores de riesgo definidos por imagen (IDRFs) en el caso L2. Estos factores de riesgo se relacionan con la posibilidad de la extirpación total o parcial del tumor debida a su localización anatómica (e. g. crecimiento entorno a vena cava y/o aorta). El estadio M implica la presencia de metástasis, excluyendo los casos del estadio MS. En el estadio MS la metástasis se localiza en piel, hígado y/o médula ósea y se da en pacientes menores a 18 meses⁽¹⁸⁾.

El diagnóstico del NB se hace mediante biopsias del tumor o por detección en orina de una alta concentración de compuestos generados en la degradación de catecolaminas (neurotransmisores empleados por el sistema nervioso simpático), los cuales están presentes en el 85% de los casos^{11,12}.

2.3.1. Tratamiento.

El tratamiento contra el cáncer difiere tanto en función del tipo de cáncer a tratar como de su estadio. Los tratamientos más comúnmente utilizados son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Hasta ahora han sido estas terapias, y sus combinaciones, las que han mostrado mayores eficacias. Su uso se ha extendido debido a la gran necesidad de actuación frente al cáncer, pero estas terapias presentan varias deficiencias susceptibles de mejoras. La extirpación quirúrgica está limitada a tumores localizados y la aplicación de radioterapias y quimioterapias está limitada por su alta citotoxicidad⁴.

La selección de terapias a aplicar en cada cáncer se determina generalmente por el estadio del cáncer, pero en el caso del NB se hace en función al nivel de riesgo asignado a cada caso¹³. En NB de bajo riesgo la extirpación quirúrgica se recomienda como tratamiento único, abogándose cada vez más al control periódico del tumor, esperando su neutralización de forma autónoma. En NB de riesgo intermedio, en los que una vez extirpado el tumor se detecta alguna condición de mal pronóstico, se les aplica quimioterapia neoadyuvante, radioterapia y ácido retinoico (13cis RA). El 13cis RA induce la maduración de los neuroblastos, ayudando a la diferenciación de estos hacia neuronas. Los pacientes con NB de alto riesgo reciben un tratamiento combinado: en un primer paso quimioterapia de alta intensidad, con compuestos como el Cisplatino, Etopósido o Doxorubicina, para reducir el tumor como paso previo a la extirpación quirúrgica. Posteriormente el trasplante de progenitores hematopoyéticos y radioterapia. Finalmente, como terapia de mantenimiento se aplica inmunoterapia y 13cis RA. Las nuevas líneas de tratamiento contra el NB se centran en la administración dirigida de fármacos, nuevas radioterapias e inmunoterapias, en las que se centra este trabajo^{12,13,15}.

2.4. Inmunoterapias.

Las inmunoterapias surgen como una alternativa novedosa y eficaz al tratamiento del cáncer, cuyas aplicaciones se han incorporado rápidamente a la clínica. Los resultados obtenidos son más favorables en el caso de cánceres hematológicos, es decir, aquellos de células circulantes en el torrente sanguíneo, más accesibles al sistema inmune, que frente a tumores sólidos. Esto es debido principalmente a las características del microambiente de los tumores sólidos y las barreras que este supone en la migración y actuación normal de las células efectoras. Una de las líneas de trabajo de las inmunoterapias contra cánceres sólidos se centra en modular la respuesta del sistema inmune frente los TAAs o antígenos específicos de tumores (TSAs) (estudiados en cánceres desencadenados por infecciones víricas), eliminando su tolerancia y proporcionando tanto una respuesta inmediata como a largo plazo. Ejemplo de estas terapias son el suministro de anticuerpos monoclonales o células inmunes modificadas (propias o alogénicas) que atacan directamente el tumor al reconocer TSAs o TAAs^{8,16}. Dentro de estos tratamientos, las inmunoterapias con células asesinas naturales (NK) recientemente han demostrado eficacias relevantes, no solo frente a leucemias, un tumor hematológico, si no también frente a tumores sólidos como el carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) y

cáncer colorrectal (CCR) en diferentes estudios *in vitro*¹⁷⁻¹⁹. Además, en el caso de algunos tipos de leucemia, han demostrado buena eficacia también en ensayos clínicos²⁰.

2.4.1. Inmunoterapias con células asesinas naturales.

Las células NK, pertenecientes al sistema inmune innato, tienen la capacidad de acabar con células tumorales activándose por diversos mecanismos. Uno de ellos es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que se desencadena durante el reconocimiento de la región no variable (Fc) de determinados isotipos de inmunoglobulinas unidas a su antígeno específico, es decir la célula responde ante un objetivo previamente señalado por el sistema inmune⁸. Otra vía de activación es por ausencia de complejo mayor de histocompatibilidad de clase 1 (MHC-I, o HLA-I en humanos). Esta molécula está presente en prácticamente la totalidad de las células en estado fisiológico y su falta se relaciona a infección vírica, estrés celular o transformación tumoral. La activación por ausencia se explica como la descompensación del equilibrio activación-inhibición en el que se encuentran las células NK (Figura 1). Los receptores de inhibición de células NK (KIRs) reconocen la proteína HLA-1, unión que favorece la latencia. En el caso contrario, la unión a sus ligandos de los receptores citotóxicos de células NK (NCRs) o la proteína NKG2D promueve la activación. Los ligandos de estos receptores son proteínas de expresión constitutiva en la membrana celular, por lo que en el caso de no estar contrarrestados con suficientes señales de inhibición, se produce la activación de las células NK⁸.

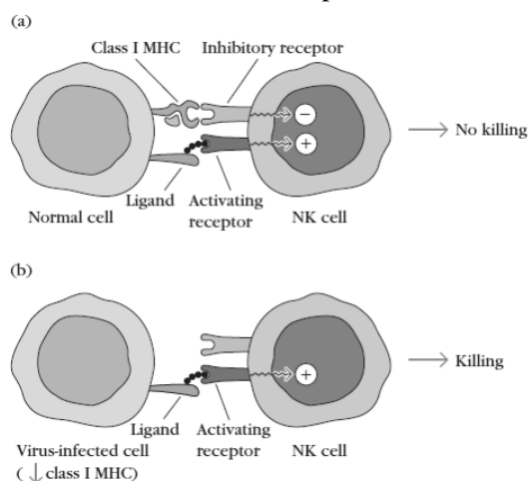


Figura 1. Modelo de la actividad citotóxica de las células NK frente a células propias alteradas⁸. (a) Contacto entre una célula sana y una célula NK. Las señales de inhibición y activación en la célula NK generadas por la interacción de los distintos ligandos se compensan, dando un balance global de señales que no induce la activación de la célula NK. La célula NK reconoce la célula propia como sana y no la elimina. (b) Contacto entre una célula NK y una célula infectada por un virus (como ejemplo de situación de estrés) cuya expresión de MHC-I en membrana está reducida. La interacción de ligandos genera señales de activación en la célula NK, las cuales no se ven compensadas por las de inhibición, por lo que se desencadena su actividad citotóxica. La célula NK reconoce la célula alterada y la elimina. En los casos de células alteradas que no disminuyen la expresión en membrana de la proteína MHC-1, el balance entre la intensidad de las señales de activación e inhibición regulará la eliminación de la célula diana.

La posibilidad de activación de las células NK de forma independiente a la presencia de antígenos específicos, aporta una gran relevancia de estas células ante tumores, incluyendo aquellos de baja inmunogenicidad, es decir, que presentan pocas mutaciones²¹. Para su uso en inmunoterapia se suministran células NK activadas *in vitro* originarias del propio paciente (terapia autóloga) o alogénicas, procedentes de donantes sanos²². Además de activarlas, también es posible modificarlas genéticamente, aumentando la expresión de receptores de activación o receptores quiméricos frente a antígenos tumorales (CAR). De esta forma se potencia el desplazamiento del equilibrio hacia la estimulación de las células NK, a la vez que se aumenta su especificidad antitumoral, al determinar el

antígeno ante el cual actuaran. Las células NK modificadas reciben el nombre de células NK-CAR. Se diseña e integra en las células una proteína con un dominio extracelular que reconoce un TAA del tumor de interés y un dominio intracelular de señalización, que desencadena la actividad efectora. Además, la posibilidad de hacer una expresión combinada con receptores frente a varios antígenos permite crear sistemas de doble regulación, lo que reduce significativamente la posible toxicidad de estas terapias²¹.

2.4.2. Inmunoterapias para el tratamiento del neuroblastoma.

Actualmente las inmunoterapias para NB se administran únicamente a pacientes con tumores de alto riesgo como tratamiento de mantenimiento tras observar su respuesta a las terapias previas. Se aplica por su alto potencial de búsqueda y selectividad a la hora de acabar con aquellas células tumorales no eliminadas con los tratamientos convencionales. El tratamiento actual aplicado en NB se basa en la activación del sistema inmune suministrando anticuerpos anti-GD2 junto con otros compuestos. El gangliósido GD2 (GD2) es expresado en la membrana de varios tipos de células malignas, entre ellas las del NB. La unión específica de los anticuerpos monoclonales anti-GD2 sobre las células del tumor lo marcan ante el sistema inmune como diana a eliminar mediante ADCC²³. El fármaco con anticuerpos anti-GD2 más ampliamente usado recibe el nombre de Unituxin y fue autorizado para su uso en Europa y Estados Unidos en 2015^{24,25}. El Unituxin combina anticuerpos anti-GD2 con 13cis RA, interleucina 2 (la cual estimula la proliferación y activación de células NK) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Los aspectos negativos de esta terapia son el dolor como efecto secundario al afectar a nervios sensitivos o el hecho de que no todos los casos de NB presentan una expresión de GD2 suficientemente alta para poder ser eliminados de forma efectiva²⁶.

Los avances en el entendimiento del desarrollo del cáncer y el sistema inmune generan múltiples enfoques para nuevas inmunoterapias contra NB pasando por la determinación de TAAs para NB. Dos antígenos ya asociados a NB son las proteínas de membrana calreticulina y CD47^{27,28}. Esta observación ha inducido un nuevo proyecto de terapia contra el NB. Ambas proteínas se han seleccionado para su inserción en un nuevo NK-CAR específico para este cáncer. Mientras que la proteína calreticulina se expresa únicamente en membranas de células tumorales, la proteína CD47 también se encuentra en células sanas del cerebro. Por ello, el proyecto propone la modificación de células NK para la expresión combinada de ambas. La unión entre CD47 y el receptor de CD47 expresado de forma constitutiva en células NK desencadena la expresión en membrana de un segundo receptor anti-calreticulina, el cual al contactar con su diana promueve la activación de la célula inmune³.

2.5. Cultivo celular en 3 dimensiones.

Para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer más eficaces, no solo tiene peso la investigación de nuevas formas de eliminar las células tumorales, si no disponer de modelos de estudio que mimeticen las condiciones fisiológicas en las que se desarrolla esta patología. Los modelos celulares *in vitro* son un paso previo lógico y necesario a los modelos animales debido a sus múltiples ventajas en cuanto a la facilidad de trabajo, dinamismo, ética²⁹ y menor coste económico. Su limitación principal es su bajo potencial de predicción de la respuesta celular en un sistema fisiológico completo. Debido a esto, es común que al realizar estudios *in vivo* los resultados obtenidos varíen con respecto a los estudios *in vitro* previos. Un modelo más fiel permitiría optimizar y seleccionar las nuevas terapias en función de su actividad en condiciones más similares a las fisiológicas, consiguiendo una mayor reproducibilidad de los resultados al aplicarlos en modelos *in vivo*. Esto se traduciría a su vez en una reducción de los tiempos y costes de desarrollo de nuevas terapias efectivas^{30,31}.

Los modelos celulares se definen según dos factores: la línea celular escogida y el método de cultivo empleado. El reservorio de líneas celulares es amplio y variado y en el caso del NB se disponen de

numerosas líneas celulares con las que trabajar. Por otra parte, la búsqueda de modelos celulares con mayor mimetismo ha generado un gran interés por nuevos métodos de cultivo, destacando el cultivo en tres dimensiones (3D). Los modelos de cultivo en 3D recrean características más similares a un sistema fisiológico y por ello, se obtienen resultados con mayor reproducibilidad *in vivo*. Estos modelos permiten mayor interacción célula-célula, generan oposición a la difusión y reducen el estrés creado por el crecimiento de las células en condiciones tan distantes a las fisiológicas³¹. Los modelos 3D se usan ampliamente en el estudio de la citotoxicidad de drogas al mimetizar de forma más fiel la compleja arquitectura multicelular, la barrera al transporte masivo y la difusión a través de la matriz extracelular. En el caso de modelos 3D para el estudio de tumores sólidos como el NB, la disposición de las células se asemeja en mayor medida a la anatomía tumoral³², posibilitando características como la plasticidad metabólica, el TMA o la presencia de núcleo necrótico. Actualmente se han desarrollado numerosos métodos de cultivo 3D, como el crecimiento de células sobre soportes, embebidas en geles o en agregados celulares denominados esferoides. Dentro de las numerosas opciones de cultivo en 3D, los esferoides confieren una alta relevancia clínica a los resultados obtenidos al crecer libres de contacto con agentes externos. Con esta forma de cultivo se forman agregados de células donde se permiten su interacción y su crecimiento en la matriz extracelular^{30,33}.

3. HIPÓTESIS.

Según los antecedentes expuestos se planteó la hipótesis de que el desarrollo inicial de una inmunoterapia con la tecnología de células NK-CAR con receptores frente a las proteínas CD47 y calreticulina en modelos celulares de NB obtendría distintos resultados en función del modelo de estudio seleccionado. En este trabajo se estudiaron las hipótesis iniciales para la puesta a punto del modelo, siendo las siguientes:

1. La fisiología celular de los modelos en 3D de NB se diferenciará de la presente en los modelos en 2D.
2. Los resultados de un mismo tratamiento en modelos de cultivo en 2D y 3D diferirán, siendo más resistentes los modelos en 3D.
3. El modelo celular de la línea SH-SY5Y en esferoides se adecua para el estudio de la terapia con células NK-CAR con receptores frente a las proteínas CD47 y calreticulina.

4. OBJETIVOS.

El objetivo principal de este trabajo fue el desarrollo y estudio de un modelo de cultivo celular 3D de NB, como fase inicial para el desarrollo de una inmunoterapia con la tecnología NK-CAR.

Para ello, se establecieron los siguientes objetivos intermedios:

1. Optimización de un modelo de cultivo 3D para NB.
2. Caracterización de líneas celulares de NB en función de su expresión de ligandos de células NK: HLA-I, HLA-II, CEACAM-1, ICAM-1, PDL1, galectina-9, tanto en modelos 2D como 3D.
3. Caracterización de líneas de NB en función de la expresión de las dianas del NK-CAR en desarrollo: CD47 y calreticulina.
4. Análisis de la sensibilidad de líneas de NB a los fármacos habituales en quimioterapia: Cisplatino, Etopósido y Doxorrubicina, comparando cultivos en 2D y 3D.
5. Análisis la actividad citotóxica de células NK expandidas sobre cultivos en 2D y 3D.
6. Generación de líneas celulares de NB que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) y luciferasa para el posterior estudio en modelos *in vivo* de la terapia con células NK-CAR.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivo celular.

5.1.1. Líneas celulares.

En este trabajo se emplearon las líneas celulares humanas SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y, SH-SY5Y modificadas para la expresión de la proteína GFP (SH-SY5Y GFP), HepG2, K562 y HEK 293T. Las células SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y, SH-SY5Y GFP son líneas celulares derivadas de NB humano y fueron usadas como modelo de NB. Fueron cedidas por el Dr. Eduardo Ruiz. La línea celular HepG2, procedente de hepatocitos, fue usada como control de la generación y desarrollo de los esferoides³⁴, línea cedida por el grupo del Dr. Pedro Baptista. Las células K562, derivadas de leucemia mielógena se emplearon en el protocolo de expansión de células NK, por su propiedad de activar a estas últimas, detallado posteriormente. Se hizo uso de las células embrionaria de riñón humano HEK 293T para la generación de partículas lentivirales. Las líneas celulares K562 y HEK 293T son propias del laboratorio.

En este trabajo también se dispuso de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) extraídas de muestras proporcionadas por el Banco de Sangre y Tejidos de Aragón.

5.1.2. Mantenimiento y manipulación de los cultivos de líneas celulares.

Se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm² (Corning) usando medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) (Sigma) a excepción de la línea celular K562 y las PBMCs, con las que se usó medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma). Ambos medios de cultivos se suplementaron al 10% con suero fetal bovino (SFB) (Sigma), penicilina (100U/ml)/estreptomicina (100ug/ml) (Sigma-Aldrich) y 2 mM Glutamax (Lonza). Los medios fueron atemperados a 37°C en baño termostatzado previamente a su uso. Para su disociación se utilizó Tripsina-EDTA (Sigma) permitiendo su actuación durante 1 minuto a 37°C, tras lavar con tampón fosfato salino (PBS) para evitar la inactivación de la Tripsina por el suero. El EDTA es un quelante de calcio que favorece la disgregación celular. Las células se mantuvieron en incubador termostatzado a 37°C, 5% de CO₂ y saturado de humedad (Panasonic), realizando cultivos frescos cada dos o tres días dependiendo tanto de su crecimiento como su uso.

La manipulación de los cultivos se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar (Teslar Bio All).

5.1.3. Recuento y viabilidad celular.

Los recuentos se realizaron con el colorante selectivo Azul de Tripano (Sigma) en dilución 1:1 con la suspensión celular a evaluar, haciendo uso de la cámara de Neubauer y un microscopio óptico (Nikon). El Azul de Tripano penetra únicamente en células que han perdido la integridad de la membrana plasmática, por lo que las células muertas adquirirán una coloración azul mientras que las células vivas y las apoptóticas, al mantener su membrana intacta, no se teñirán.

5.1.4. Congelación y descongelación de líneas celulares.

Para reducir el número de pases de las células se congelaron varios viales al comienzo de su cultivo. Se almacenaron en un ultracongelador a -80°C en viales estériles para congelación (Thermo Scientific Nunc) y posteriormente almacenadas en nitrógeno líquido. La suspensión celular se centrifugó suavemente (335g, 5 min.) para conseguir la precipitación de las células viables. El pellet se resuspendió en SFB al 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) y trasladado al vial. El DMSO es un agente criopreservante que evita la formación de cristales de hielo en el interior celular, evitando daños en la célula, pero es altamente tóxico en células con metabolismo activo, es decir a temperaturas fisiológicas, por lo que se debe trabajar manteniendo el vial en hielo.

Para la descongelación de los viales, se resuspendió la disolución de células en 5 ml de medio atemperado y se centrifugó (335g, 5 min.). El pellet celular se resuspendió en medio completo.

5.1.5. Cultivo celular 3D por método de gota colgante.

La formación de esferoides de las líneas celulares de NB y HepG2 se realizó por el método de la gota colgante. A partir de células cultivadas en placa (2D) se dispone una suspensión celular de la concentración deseada en gotas invertidas. Las células se resuspendieron en medio DMEM completo con un 20% de metilcelulosa (Methocell, Sigma) para aumentar su tensión superficial. Gotas de 20-30 μ l se dispusieron en la tapa de placas Petri o de placa de 96 pocillos (Thermo Scientific Nunc), quedando suspendidas al voltear la tapa. El fondo de las placas se mantuvo cubierto con agua miliQ para mantener una alta humedad y evitar el secado de las gotas.

5.1.6. Disgregación de esferoides.

Para aquellos ensayos en los que fue necesario el estudio de las células que conformaban los esferoides de forma individual, estos fueron disgregados de la forma descrita para 2D (apartado 5.1.2) aumentando el tiempo de actuación de la solución Tripsina-EDTA a 5 minutos. Tras la incubación, se realizó una rápida resuspensión mecánica.

5.2. **Caracterización de líneas celulares.**

5.2.1. Marcaje extracelular.

Se analizó la expresión en membrana de distintas proteínas en las líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-BE(2)-C mediante citometría de flujo. Este equipo permite analizar individualmente cada célula de una muestra dada. El citómetro empleado fue el Citómetro analizador Gallios (Beckman Coulter), el cual dispone de tres láseres (488, 630, 405nm), y 10 detectores de fluorescencia además de dos detectores que nos permiten analizar el tamaño y la complejidad celular (FSC o *Forward Scatter* y SSC o *Side Scatter*). Se utilizaron para el marcaje los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con fluoróforos: i) anti-HLA-I FITC (Invitrogen), ii) anti-HLA-II APC-VIO770 (Miltenyi Biotec), iii) anti-Calreticulina PE (abcam), iv) anti-ICAM-1 APC (BD Biosciences), v) anti-CEACAM-1 PE-VIO770 (Miltenyi Biotec), vi) anti-PDL1 APC (Biolegend) y vii) anti-CD47 V450 (BD Biosciences). El marcaje se realizó con una dilución del anticuerpo 1:50 en PBS 5% SFB 0.5 μ M EDTA durante 20 minutos a 4°C para un marcaje más específico y en oscuridad para no afectar a la fluorescencia de los fluoróforos. El suero se añadió para favorecer el mantenimiento de la viabilidad celular durante el proceso. Con el fin de reducir las uniones inespecíficas, se usó un anticuerpo bloqueante frente a los receptores de la región constante (Fc) de los anticuerpos (CD16 y CD32). También se usaron como controles el isotipo correspondiente de la inmunoglobulina con el fluoróforo. El isotipo no se une a ninguna diana de forma específica al no reconocer ninguna proteína en su región variable, pero conserva las características inespecíficas de la Fc de la inmunoglobulina usada en el experimento. Tanto para los marcajes en cultivos 2D como 3D se siguió el mismo protocolo, variando el paso previo de disgregación de los esferoides, explicado en el apartado 5.1.6.

5.2.2. Marcaje intracelular.

Se analizó la expresión intracelular de la galectina-9 en las líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-BE(2)-C mediante citometría de flujo. En primer lugar, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% 15 minutos a 4°C. A continuación, se permeabilizaron con saponina 0,5 % en PBS, detergente orgánico suave, durante 30 minutos a 4°C. Se añadió entonces 1 μ l de anti-Galectina-9 PE (Miltenyi Biotec), que se incubó 30 min. a 4°C en oscuridad. Entre todos los pasos se lavó con PBS 5% SFB 0,5 mM EDTA al igual que en el marcaje extracelular.

5.2.3. Análisis de resultados.

El análisis de los resultados obtenidos por citometría siguió los siguientes pasos (Figura 2): i) Sobre un diagrama de puntos (cada célula se ve representada por un punto) se enfrentó *FSC PEAK LOG* contra *SSC INT LOG* para delimitar la región sin agregados de más de una célula ni restos celulares. ii) Se delimitó la población de estudio a la región seleccionada. iii) Se enfrentó el canal de lectura del fluoróforo en cada caso contra *FSC INT LOG*. iv) Se activó la opción de lectura de fluorescencia

media en el eje de coordenadas. v) Se dividió el valor de fluorescencia obtenido en el marcaje con el anticuerpo específico entre el obtenido en el isotipo o el control sin marcar en el caso de no disponerlos.

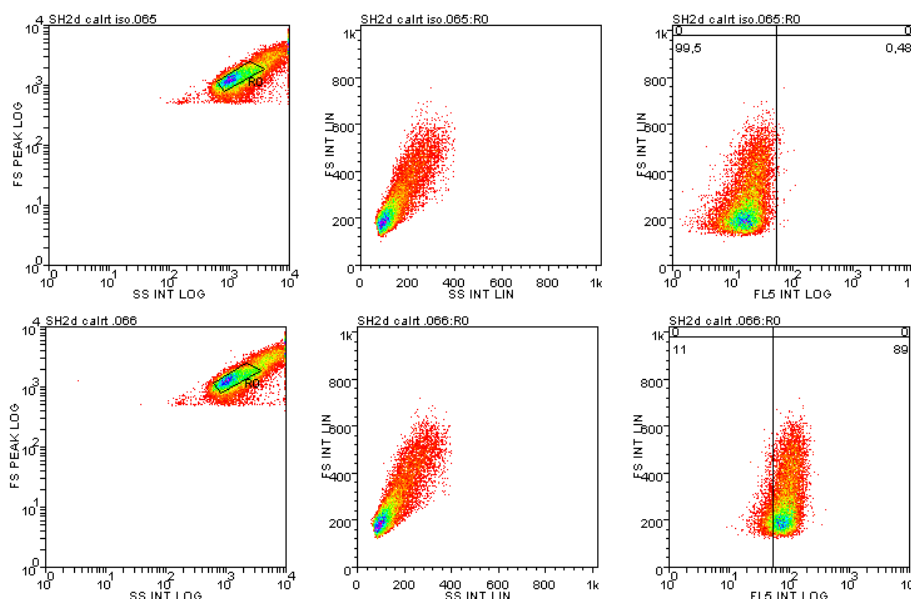


Figura 2. Análisis de datos por citometría. Ejemplo: marcaje con isotipo IgG1 PE (parte superior) y anti-calreticulina PE (parte inferior).

5.3. Caracterización de la sensibilidad a drogas usadas en quimioterapia en cultivos 2D y 3D para la línea celular SH-SY5Y.

Se testaron diluciones seriadas de tres fármacos utilizados habitualmente en quimioterapia: Cisplatino, Etopósido y Doxorrubicina, así como la combinación de ellos. Las diluciones fueron de 50, 5, 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005 μM para el Cisplatino y el Etopósido y 92, 9.2, 0.92, 0.092, 0.0092 y 0.00092 μM para la Doxorrubicina. Los resultados se estudiaron mediante dos métodos explicados en los apartados contiguos.

5.3.1. Estudio de la proliferación mediante Presto Blue.

El PrestoBlue (Thermo Fisher) es un reactivo de viabilidad celular, cuya metabolización por las oxido-reductasas celulares produce un compuesto fluorescente. Sobre 20000 células adheridas y 6 esferoides de 2000 células se testaron las distintas drogas. A las 24 y 48 horas de actuación de las drogas se añadieron 20 μl de PrestoBlue a cada pocillo, y tras una incubación de 3-5 horas, se midió la fluorescencia (máx. excitación 535nm/ máx. emisión 615nm). La medida de la fluorescencia se realizó con un lector de placas (Bio-Tek). Se hicieron blancos de todas las concentraciones de drogas para poder restar la fluorescencia basal (fluorescencia no producida por el metabolismo celular).

5.3.2. Estudio de muerte celular por Anexina V.

La Anexina V es una proteína celular usada en citometría por su unión a fosfatidilserina, fosfolípido mayoritario de la parte interna de la membrana celular que se transloca a la parte exterior durante el proceso de apoptosis. Sobre 50000 células adheridas en placa de 48 pocillos y 6 esferoides de 2000 células se testaron las distintas drogas. Se marcaron las células con Anexina V FITC de manera análoga a la explicada en el apartado 5.2.1, diferenciándose en que los lavados se realizaron con tampón de unión de Anexina (ABB) (Thermo Fisher). Además, el medio de cultivo no se desechó, para evitar perder con él las posibles células muertas, y por ello en suspensión. También se utilizó yoduro de propidio (PI) como marcador de muerte por necrosis. El PI es un compuesto fluorescente que se intercala en el DNA, pero no es permeable a través de la membrana de las células viables.

5.4. Expansión de células NK de donantes sanos.

5.4.1. Aislamiento de PBMCs.

Partiendo de muestras de “*buffy-coat*” (capa leucocitaria obtenida a partir de la centrifugación de sangre total) proporcionadas por el Banco de Sangre y Tejidos de Aragón se realizó un aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Para ello se usó la centrifugación en gradiente de densidad (524 g, 30 min., deceleración 3) de 13 ml de *buffy-coat* (1:4) junto con 13ml de Ficoll Histopaque (MiltenyiBiotec). Las PBMCs forman una fase blanquecina intermedia entre el plasma y el Ficoll. Los eritrocitos que pudieran haber sido arrastrados se eliminaron mediante la incubación (5 min.) con RBC Lysis Buffer (ThermoFisher). Una vez aislados se realizó un recuento celular para determinar el volumen del que iniciar la expansión.

5.4.2. Expansión de células NK.

La expansión de células NK se realizó durante 21 días añadiendo cada 3 días interleucinas 2 y 15 y células K562 en ratio 1:10 en RPMI completo con SFB inactivado. La IL-15 está involucrada en el mantenimiento de la viabilidad de las células NK, mientras la IL-2 en su activación⁸. Las células K562 no expresan HLA-I, por lo que son una buena diana para las células NK y con ello promueven su activación. La inactivación del suero (30min. a 50°C y centrifugación 2851g, 10min.) se realizó para inactivar las proteínas inmunitarias del complemento presentes en este y evitar su influencia en los mecanismos de citotoxicidad posterior.

5.4.3. Seguimiento de la expansión.

El seguimiento de la expansión se realizó por citometría mediante la caracterización de las poblaciones de células presentes con marcaje extracelular de las proteínas CD3 y CD56. Este marcaje sobre PBMCs genera cuatro poblaciones: dobles positivos, correspondiendo a linfocitos NKT (con fenotipo mezcla entre células NK y linfocito T); CD3⁺ CD56⁻, los linfocitos T; CD3⁻ CD56⁺, las células NK, y dobles negativos, el resto de los leucocitos aislados. Los marcajes y su lectura fueron realizados siguiendo el protocolo de marcaje extracelular del apartado 5.2.1.

5.5. Citotoxicidad de células NK expandidas sobre células SH-SY5Y GFP.

Se evaluó la citotoxicidad de células NK de un donante sano expandidas durante 5 y 21 días. Se realizó usando como células diana, células SH-SY5Y GFP en cultivos 2D y 3D. Los ratios célula NK:diana fueron 6:1 y 1:1 y se analizaron los resultados a 5 y 24 horas para el modelo 2D y 24 y 48 horas en el caso de los esferoides. Se usó como control células SH-SY5Y GFP incubadas sin células NK. Se cuantificó el número de células viables por citometría con la lectura de células GFP positivas. Al morir la célula la fluorescencia de la GFP se pierde, por lo que manteniendo los tiempos de adquisición del citómetro se realizó una medida relativa de la viabilidad específica de las células diana³⁵.

5.5.1. Puesta a punto del uso de células GFP positivas como valor representativo de células viables.

Se comprobó que la medida de células GFP positivas era una medida representativa del valor de células viables en el cultivo. Para ello se sembraron disoluciones con número decreciente de células SH-SY5Y GFP, de 50.000 hasta 5.000 y a las 24 horas se analizaron en el citómetro.

5.5.2. Purificación de células NK

Para la purificación de las células NK en expansión se usaron columnas magnéticas MACS (Miltenyi Biotec). Se incubó el cultivo completo de PBMCs con el anticuerpo anti-CD56 MicroBeads (Miltenyi Biotec) (20ul de anticuerpo por cada 10 millones de PBMCs totales). Las “micropelotas” son partículas magnéticas que permite la retención en una columna metálica bajo un campo magnético. La proteína CD56 es expresada únicamente por células NK y NKT, por lo que con este método se aíslan únicamente estas poblaciones, siendo las células NK mayoritarias en sangre.

5.6. Visualización celular por microscopía.

5.6.1. Determinación de la morfología de esferoides por microscopia óptica.

Los esferoides fueron observados por microscopia en campo claro en un microscopio óptico invertido Nikon. Se observó su morfología y se determinó el grado de compactación como la observación de una frontera definida entre células y medio. Se fotografiaron los esferoides de la línea celular SH-SY5Y a día 4 y 7 para el estudio su formación y desarrollo, usando como control positivo esferoides de la línea celular HepG2 con un mismo número de células iniciales³⁴.

5.6.2. Microscopia de fluorescencia.

Se empleó un microscopio invertido de fluorescencia, modelo Olympus IX81, para la toma de imágenes de fluorescencia total (suma de todos los planos) tanto en cultivo de células en 2D como en 3D. Se realizó la lectura de fluorescencia emitida por la proteína GFP (máx. excitación 395nm-máx. emisión 509nm) y por el compuesto PI (máx. excitación 535nm- máx. emisión 617nm).

5.6.3. Microscopía confocal.

La obtención de imágenes de secciones individuales de los esferoides se realizó mediante microscopía confocal. Esta tecnología permite observar planos independientes del interior de los esferoides. Para ello la medida de “*pinhole*” utilizada fue igual o menor a 1AU. El *pinhole* es un término inglés (traducción literal: agujero de alfiler) que define la apertura del diafragma que restringe el paso de fluorescencia, permitiéndolo únicamente a la correspondiente con el plano enfocado. El microscopio empleado fue un Microscopio Confocal Espectral Zeiss LSM 880 con Airyscan.

5.6.4. Preparación de muestras de esferoides para su observación.

Todos los pasos de la manipulación con micropipeta de los esferoides para su visionado fueron con puntas de micropipeta cortadas para aumentar su diámetro y evitar la deformación o fragmentación de la estructura 3D. Los esferoides fueron lavados con PBS 5% SFB y marcados con PI durante 15 min a temperatura ambiente.

5.7. Estudio de la estructura de esferoides de la línea celular S-SY5Y por anatomía patológica.

Las preparaciones se llevaron a cabo en el servicio de anatomía patológica del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS). Se utilizaron muestras de esferoides SH-SY5Y fijados (4% paraformaldehído, 30min.). Se realizó un procesado por inclusión en parafina y cortes cada 5 µm mediante el Microtomo de rotación Leica RM2255. Posteriormente se realizó su tinción con hematoxilina-eosina. La hematoxilina, de color azul, se une a las estructuras aniónicas, como el núcleo, y la eosina a estructuras catiónicas, tiñendo citoplasma y membrana de color rosa.

5.8. Generación de línea celular SH-SY5Y + GFP-Luciferasa.

5.8.1. Obtención de lentivirus e infección de células SH-SY5Y.

Se empleó la línea celular HEK 293T como células empaquetadoras para la generación de partículas virales con el plásmido de interés, ZsGreen (cedido por la Graduada Sandra Hortelano). El plásmido contiene la secuencia de la proteína GFP, proteína fluorescente de membrana que nos permite una fácil observación de las células por microscopía, y de la luciferasa. La luciferasa es una encima de interés por permitir el seguimiento de la célula que la expresa en organismos vivos debido a su capacidad de degradar luciferina para dar un compuesto luminiscente, pudiendo ser observadas *in vivo*, sin interferencia de la propia fluorescencia de los tejidos. La generación de lentivirus se realizó añadiendo 2,5 µg de plásmido pMD2.G y 6µg de pPAX2, con información de proteínas víricas, y 6 µg de ZsGreen. Se adicionó a la mezcla 40 µL de polietilenimina (PEI) (Sigma), un polímero catiónico que condensa el DNA en partículas con carga positiva, facilitando su endocitosis y la liberación en el citoplasma. Tras una fuerte agitación y 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió al cultivo de células HEK 293T en DMEM sin suplementar. Tras 16 horas de incubación, se reemplazó

el medio por DMEM completo y se dejaron las células 2 días en cultivo. Se recogió el medio y se concentraron los virus con Lentivirus-X Concentrator (Takarabio), centrifugando 45 min. a 1455g y 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en un volumen mínimo de medio y agregó al cultivo 2D de células SH-SY5Y. Los lentivirus son virus de RNA con retrotranscriptasas e integrasas para la inserción de su RNA como DNA en el genoma del hospedador.

5.8.2. Aislamiento de células transformadas.

El grado de internalización del plásmido se equiparó el grado de expresión de la proteína GFP. Se midió tanto cualitativamente por observación en microscopio invertido de fluorescencia, como cuantitativamente por citometría de flujo. El aislamiento de células infectadas se planificó mediante dilución límite por el aislamiento de colonias individuales que presentaban fluorescencia en placa de 96 pocillos y su posterior cultivo en volúmenes de medios crecientes.

5.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa GraphPad Prism 7. En la comparación de la expresión de ligandos de células NK (resultados 6.2) se aplicó el test Mann-Whitney para variables no paramétricas, ya que con una n tan pequeña no se pudo testar su normalidad. En la comparación de los IC50 obtenidos con el tratamiento de drogas (resultados 6.3.) se realizó el test estadístico de Fisher.

6. RESULTADOS

6.1. Estudio de la morfología de los esferoides.

Para estudiar la morfología de los esferoides se procedió al cultivo en 3D de las células según el método de la gota colgante explicado en materiales y métodos (apartado 5.1.5). A través de la observación en el microscopio invertido se estableció el tiempo de formación de esferoides en la línea celular SH-SY5Y en un periodo de 48 horas desde la siembra, por lo que se tomó ese tiempo de incubación para la creación de esferoides en los ensayos posteriores. La línea celular SK-N-BE(2)-C no formó esferoides compactos por el método de la gota colgante, observándose cúmulos de células de baja compactación que no fueron considerados esferoides.

Como control se usó esferoides de la línea celular HepG2, ya que estos están descritos en la bibliografía³⁴. La comparación por microscopía óptica de esferoides de las líneas celulares SH-SY5Y y HepG2 del mismo número de células en origen (2.000 y 10.000 células) mostró diferencias en el desarrollo de ambos (Figura 3 B). La variación en el volumen entre esferoides de 2.000 y 10.000 células iniciales fue menor en la línea celular SH-SY5Y. Así mismo, los esferoides para esta línea celular fueron de menor tamaño en todos los casos. El crecimiento de los esferoides de SH-SY5Y mostró un punto de inflexión entre los días 7 y 14 en el que perdieron su forma esférica y comenzaron un desarrollo longitudinal (Figura 3 A).

Para una mejor caracterización, se obtuvieron imágenes de los cortes de esferoides teñidos con hematoxilina y eosina. Los esferoides de células SH-SY5Y mostraron una estructura reticular, con una mayor densidad celular en la periferia y relativamente constante en el resto de la estructura (Figura 3 D). La arquitectura celular de los esferoides también se analizó a través de microscopía de fluorescencia convencional y confocal. Para ello se hicieron esferoides de células SH-SY5Y que expresaban la proteína fluorescente GFP. Estos esferoides GFP positivos se marcaron con PI como sonda de viabilidad celular. Los estudios mostraron una viabilidad celular alta, al detectarse únicamente señal de fluorescencia roja (PI) localizada en puntos concretos, correspondiendo con el marcaje de células muertas en zonas generalmente de la periferia, no observándose la formación de un núcleo necrótico (Figura 3 E). En microscopia confocal, las imágenes de secciones del interior de los esferoides mostraron células viables, presentando ciertas células muertas (PI positivo) en la periferia (Figura 3 C). Las imágenes de zonas interiores del esferoide ($z > 60\mu\text{M}$) mostraban una pérdida

gradual de la fluorescencia según se profundizaba en la masa celular por lo que no se pudo llegar a observar al completo su estructura.

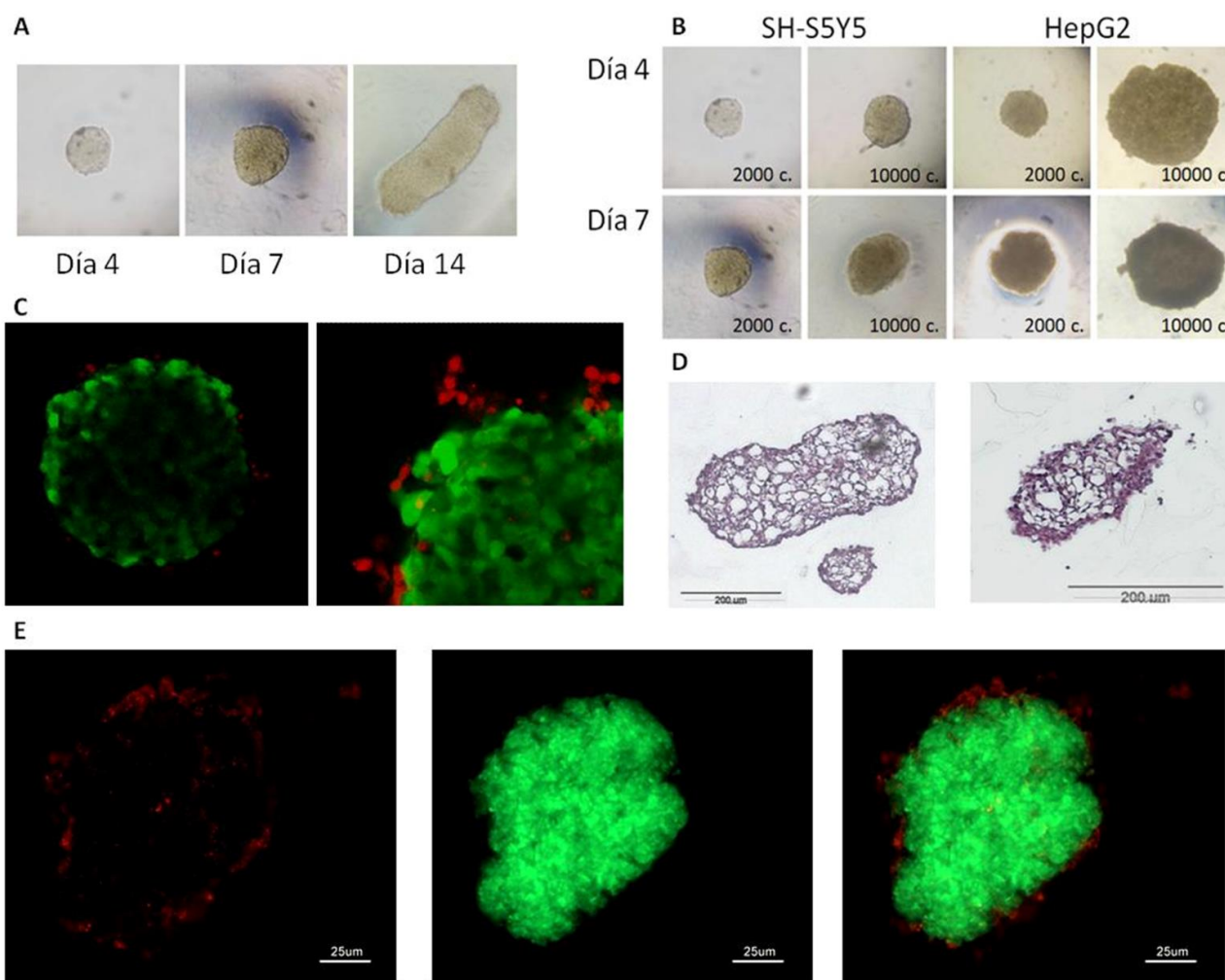


Figura 3. Estudio de la morfología de los esferoides.

A) Imágenes de esferoides de la línea celular SH-SY5Y de 2000 células en origen a distintos días desde su siembra. Los días desde la siembra se indican bajo cada imagen. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio óptico invertido a 20 aumentos.

B) Comparación de esferoides de las líneas celulares SH-SY5Y y HepG2. En cada imagen se indica el número de células en origen para cada esferoide, habiendo esferoides de 2000 y de 10000 células. Se fotografiaron a dos tiempos desde su siembra, 4 y 7 días, con un microscopio óptico invertido a 20 aumentos.

C) Esferoides de células SH-SY5Y GFP marcados con PI de 2000 células en origen a día 8 desde su siembra. En verde se muestra la fluorescencia de la proteína GFP y en rojo la fluorescencia correspondiente al compuesto PI. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal siendo i) a 10 aumentos, e ii) a 20. La línea de escala representa 200 μm.

D) Esferoides SH-SY5Y con tinción hematoxilina-eosina. Se muestran imágenes obtenidas por microscopio óptico invertido de dos cortes realizados por anatomía patológica (material y métodos 5.7.) de esferoides SH-SY5Y de 2000 células en origen.

E) Esferoide de células SH-SY5Y GFP marcado con PI de 2000 células en origen a día 8 desde su siembra. En verde se muestra la fluorescencia de la proteína GFP y en rojo la fluorescencia correspondiente al PI. Las imágenes se obtuvieron en microscopio invertido de fluorescencia a 10 aumentos. La línea de escala representa 25 μm.

6.2. Caracterización de las líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-BE(2)-C en función de su expresión de ligandos de células NK: HLA-I, HLA-II, CEACAM-1, ICAM-1, PDL1, galectina-9 y los TAA's del NB calreticulina y CD47, en modelos 2D y 3D.

Se estudió por citometría de flujo la expresión de ligandos de células NK en modelos 2D de la línea celular SK-N-BE(2)-C y en modelos 2D y 3D de la línea celular SH-SY5Y, para observar tanto la diferencia entre líneas celulares, como entre formas de cultivo. Los datos se representaron como número de veces que aumentó la intensidad media de fluorescencia (IMF) respecto al control (isotipo), por lo que un valor igual a uno corresponde con expresión nula de la proteína (Figura 4). Se adjunta como Figura I en los anexos un diagrama de puntos y un histograma representativo del marcaje en la línea celular SK-N-BE(2)-C para cada una de las proteínas estudiadas.

Las proteínas estudiadas fueron las siguientes: i) HLA-II, presente en células presentadoras de antígenos. Su nivel de expresión fue bajo en los tres modelos. ii) ICAM-1, proteína de adhesión, estabiliza el contacto entre células, como células inmunes y células diana. Se localiza en la llamada parte periférica de la sinapsis (psMAC), refiriéndose a sinapsis como intercambio de señales entre célula inmune y diana⁸. Aumentó en la línea celular SH-SY5Y y de mayor forma en su modelo 3D. iii) CEACAM-1, proteína reconocida por el punto de control inmunológico TIM3, se detectó únicamente en el modelo 2D de células SH-SY5Y. TIM3 se expresa en el TMA de diferentes tipos de cáncer, donde bloquea su eliminación³⁶. iv) La galectina-9 modula varios procesos celulares, como la agregación celular, así como la apoptosis en células tumorales, teniendo efectos antiproliferativos en tumores. También se trata de un ligando para el punto de control inmunológico TIM3³⁷. Su expresión intracelular fue marcadamente mayor en el modelo celular 3D que respecto a ambas líneas en 2D. v) CD47, proteína sobreexpresada en NB que evita la fagocitosis por el sistema inmune²⁷. Se confirmó su alto nivel de expresión en los tres modelos, disminuyendo en la línea celular SH-SY5Y y siendo menor en el modelo 3D. vi) HLA-I es la diana principal de numerosos KIRs, por lo que su expresión manda señales inhibitorias potentes a las células NK. Su expresión fue elevada en todos los casos, siendo mayor en la línea celular SK-N-BE(2)-C. vii) PDL1, ligando del punto de control inmunológico PD1, expresado en células inmunes, cuya unión inhibe la actuación de estas. La expresión de PDL1 se presenta ampliamente en varios tumores con lo que frenan su eliminación¹⁰. La expresión en cultivos 2D de células SH-SY5Y fue marcadamente mayor que en los otros dos modelos estudiados. viii) La calreticulina es una chaperona que participa en diferentes procesos celulares. Se ha descrito que las células tumorales aumentan su expresión en membrana²⁸. Su expresión disminuyó agudamente en el modelo SH-SY5Y en cultivo 3D, pero se mantuvo en un nivel de incremento de IMF de dos, por lo que se siguió considerando positiva.

Se obtuvo un aumento de la fluorescencia frente al control para todas las proteínas. En el caso de la expresión de la proteína CEACAM-1 únicamente la línea celular SH-SY5Y en modelo de cultivo 2D mostró un aumento superior a 2. El estudio de la expresión de las proteínas HLA-I, PD-L1 y calreticulina obtuvo valores de IMF mucho mayores que para el resto de proteínas, superando una IMF diez veces la del control, excluyendo el caso de la calreticulina en el modelo 3D de células SH-SY5Y. El análisis estadístico mostró diferencias significativas para la expresión de las proteínas PDL1 y calreticulina entre los modelos 2D y 3D de la línea celular SH-SY5Y. A pesar de que no se obtuvieron otras diferencias estadísticamente significativas se observaron tendencias que quizá aumentando las repeticiones del estudio se consolidarían.

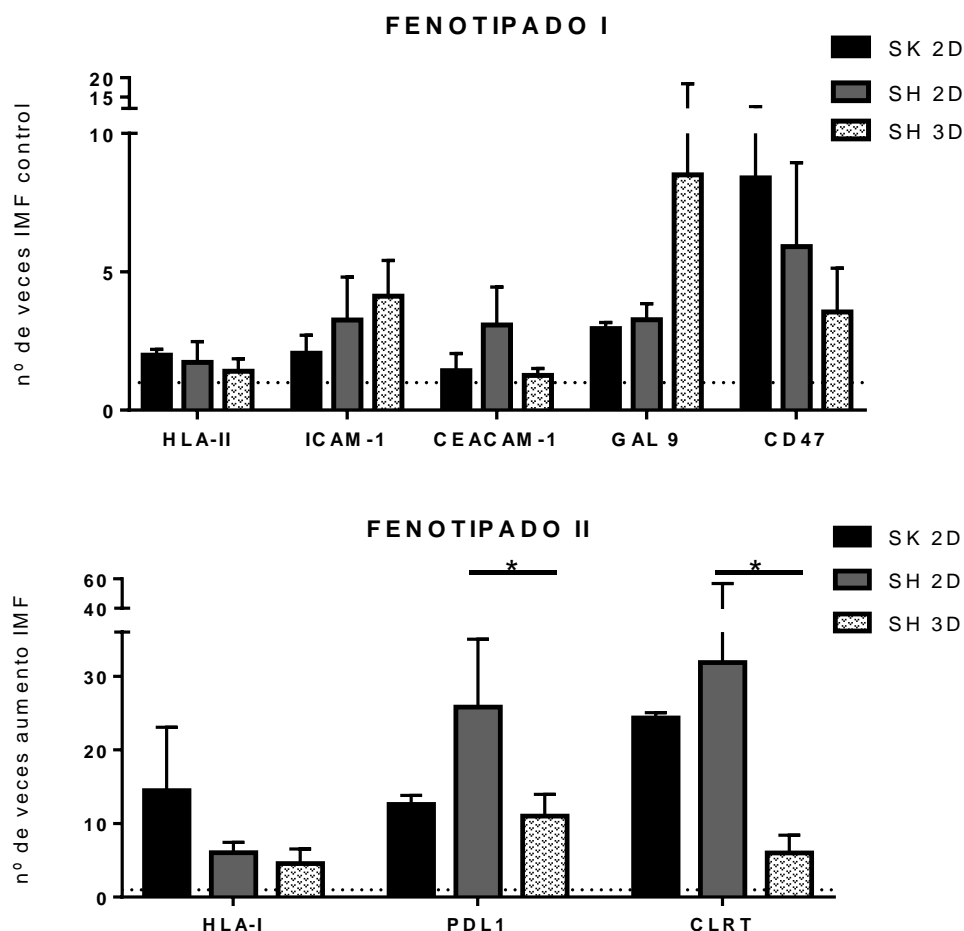


Figura 4. Resultados del análisis de la expresión de las proteínas HLA-II, ICAM-1, CEACAM-1, galectina-9, CD47, HLA-I, PDL1 y calreticulina en un modelo de cultivo 2D de la línea celular SK-N-BE(2)-C y modelos de cultivo 2D y 3D de la línea celular SH-SY5Y. Se siguió el procedimiento especificado en el apartado de material y métodos 6.2., utilizando anticuerpos contra esas proteínas unidos a distintos fluoróforos y se utilizó como control negativo los anticuerpos del mismo isotipo y fluoróforo que el usado en el marcaje. Las gráficas presentan el aumento de intensidad media de fluorescencia en número de veces respecto al control ($n \geq 2$). En línea de puntos se indica el valor igual a 1, a partir del cual se considera positiva la expresión de la proteína. En la leyenda, SK 2D corresponde con el cultivo en 2D de la línea celular SK-N-BE(2)-C y SH 2D y SH 3D con los modelos de cultivo 2D y 3D de la línea celular SH-SY5Y. En el eje x, la abreviatura gal 9 corresponde a la proteína galectina-9 y CLRT a la calreticulina. Se aplicó el test estadístico Mann-Whitney, mostrándose el símbolo * cuando se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa para un $p < 0,05$. Si no se representa es que la diferencia de expresión no es estadísticamente significativa.

6.3.Comparación de la sensibilidad de los cultivos 2D y 3D de la línea celular SH-SY5Y a los fármacos usados en clínica.

La sensibilidad de la línea células SH-SY5Y a diferentes drogas se analizó con un ensayo de proliferación por el método de PrestoBlue. El porcentaje de proliferación muestra la variación de la población celular en cada condición respecto al control sin tratamiento (Figura 5). En este caso, la concentración de droga a la que la proliferación celular alcanza la mitad del valor del control recibe el

nombre de concentración inhibitoria media (IC50). Los fármacos usados fueron los empleados comúnmente en clínica para el tratamiento del NB (Cisplatino, Etopósido y Doxorubicina). En todos los casos estudiados, se observó la disminución de proliferación al aumentar la concentración de fármacos y la disminución del IC50 de la combinación de ellos respecto a cualquiera de sus análogos como una única droga. La proliferación se ve alterada por el método de cultivo, obteniéndose una menor sensibilidad al efecto antiproliferativo de las drogas en cultivos 3D. En el caso del Etopósido, las diferencias son muy bajas, mientras que en el caso de las drogas combinadas es más acusado. La dispersión de los resultados 3D es mayor que en 2D, pudiendo deberse a la complejidad a la hora de asegurar un mismo número de esferoides por pocillo en cada experimento.

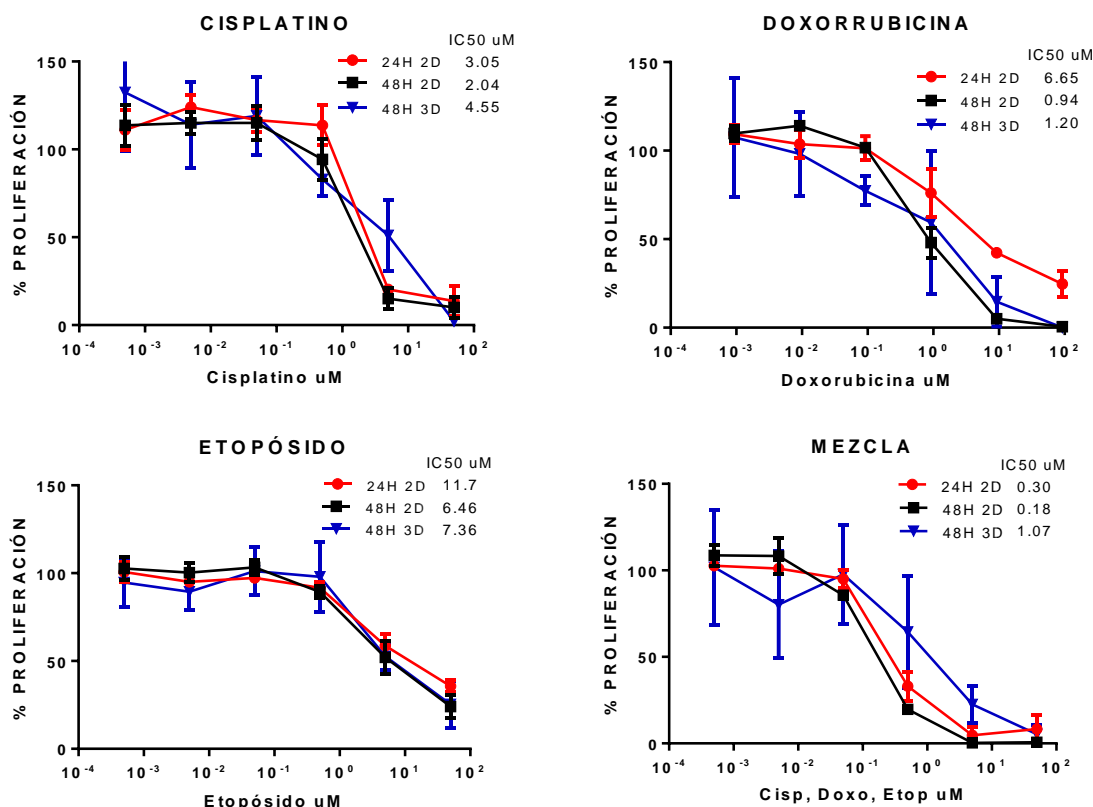


Figura 5. Efecto del tratamiento con drogas de quimioterapia en cultivos 2D y 3D sobre la proliferación de la línea celular SH-SY5Y. Se incubaron las células con distintas concentraciones de Cisplatino, Doxorubicina, Etopósido, así como su combinación y se analizó la proliferación celular por la degradación de PrestoBlue según se describe en el apartado de material y métodos 6.3.1. Las gráficas representan el porcentaje de proliferación frente a concentración de drogas (uM) (n=3). En el caso de la mezcla, las concentraciones indicadas son la concentración de cada droga individualmente. Se muestra en rojo, los valores obtenidos para un periodo de incubación de 24 horas en cultivo en 2D, en negro para 48 horas en cultivo en 2D y en azul 48 horas de incubación de las drogas con esferoides. En las leyendas se indican los IC50 en uM obtenidos utilizando el programa GraphPad. Se realizó un test de Fisher, el cual no definió los valores de IC50 obtenidos como distintos para ninguno de los casos.

Debido a que el estudio de proliferación por el método del PrestoBlue no nos indica si la inhibición observada es por inducción de muerte o por inhibición del crecimiento, se realizó un estudio similar, detectando muerte celular por citometría de flujo con Anexina V e yoduro de propidio. En la figura II de los anexos se muestran los resultados de un ejemplo representativo del tratamiento con Doxorubicina en cultivo en 2D en forma de diagramas de puntos. Los resultados del modelo 2D a distintos tiempos mostraron una mayor muerte con las concentraciones más altas de todas las drogas, así como con su combinación (Figura 6). En el modelo 3D, se obtuvo una muerte basal muy alta que

dificultó la interpretación de los resultados, pero se vio una tendencia en el aumento de muerte a dosis altas en los casos de la Doxorrubicina, la mezcla y débilmente en el Etopósido. Para el estudio de la muerte definimos el EC50 como la concentración a la que la muerte celular alcanza el 50% de la población total. Los EC50 obtenidos mostraron más sensibilidad a las drogas a las 48 horas en modelo 2D frente a su análogo a 24 horas. En la comparación entre modelo 2D y 3D se mostró más sensibilidad en el 2D únicamente en el tratamiento con Cisplatino y las mezcla. Para descartar que la muerte basal en los esferoides se debiera al protocolo de disgregación aplicado, se llevó a cabo el mismo protocolo en un cultivo en 2D y se estudió su viabilidad, obteniéndose un 94% de células viables, por lo que esta teoría se descartó.

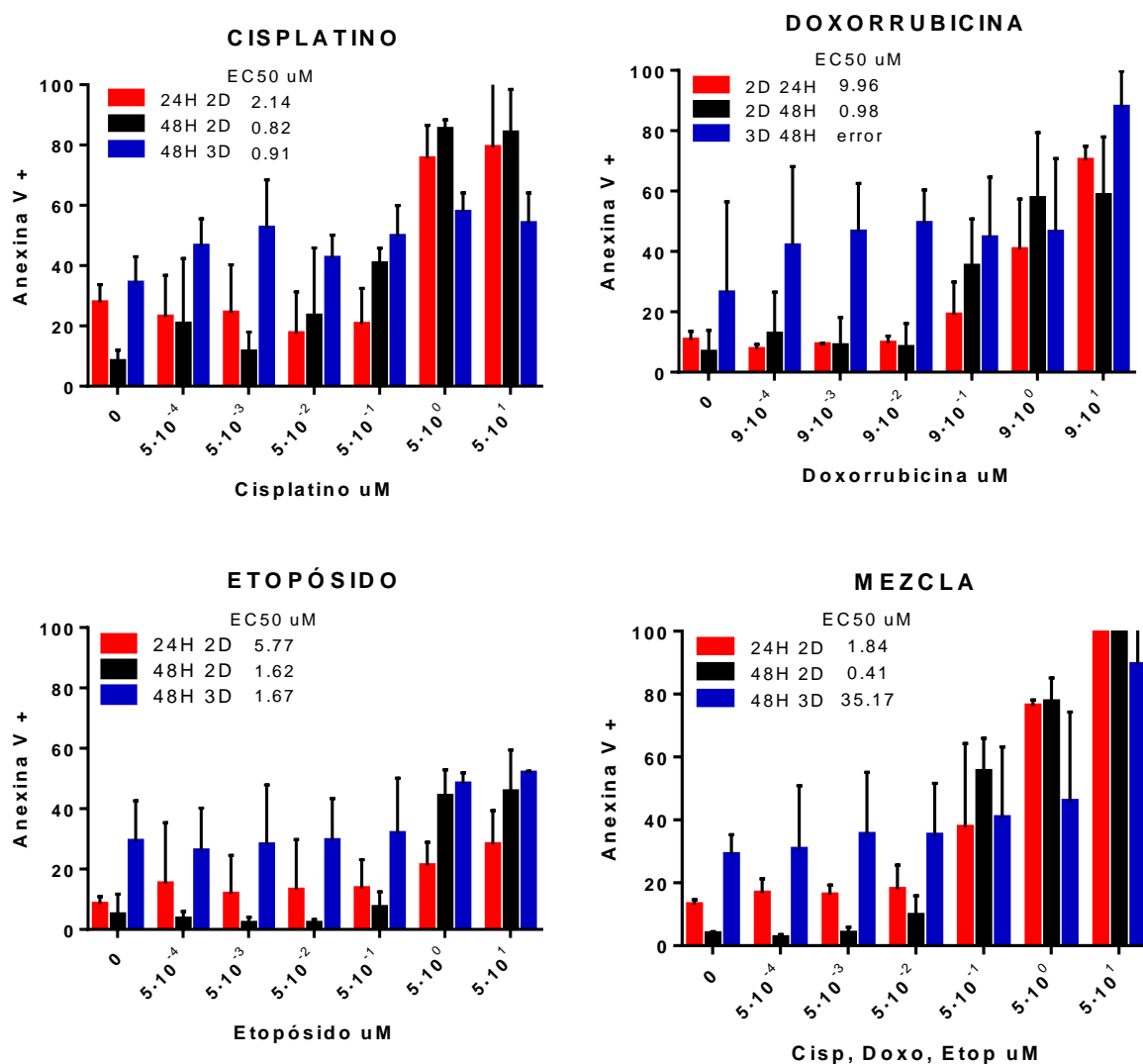


Figura 6. Efecto del tratamiento con drogas de quimioterapia en cultivos 2D y 3D sobre la viabilidad de la línea celular SH-SY5Y. Se incubaron las células con distintas concentraciones de Cisplatino, Doxorrubicina, Etopósido, así como su combinación y se analizó la muerte por detección de Anexina V según se describe en el apartado de material y métodos 6.3.2. Las gráficas representan el porcentaje de muerte celular frente a concentración de drogas (μM) en la línea celular SH-SY5Y (n=3). En la mezcla, las concentraciones indicadas son concentraciones individuales de cada droga y en el caso de la Doxorrubicina no serían las indicadas si no las siguientes: 0, 9·10⁻⁴, 9·10⁻³, 9·10⁻², 9·10⁻¹, 9·10⁰ y 9·10¹μM. Se muestra en rojo, los valores obtenidos para un periodo de incubación de 24 horas en modelo 2D, en negro para 48 horas en modelo 2D y en azul 48 horas de incubación de las drogas en esferoides. En las leyendas se indican los EC50 en μM obtenidos utilizando el programa GraphPad.

Los valores de EC50 resultantes deberían ser mayores que los IC50, obtenidos en el experimento de proliferación, ya que para una misma concentración de droga su efecto sobre la disminución de la proliferación es mayor que en el aumento de la muerte, debido a que la primera es consecuencia necesaria para la segunda. En este estudio solo se cumplen en el caso de la Doxorrubicina y la mezcla de las drogas, pudiendo deberse a la alta muerte basal detectada o a la pérdida de células en el análisis en el caso de que la muerte sea muy avanzada.

6.4. Comparación de la sensibilidad de los cultivos 2D y 3D de la línea celular SH-SY5Y a células NK activadas.

Partiendo de un “buffy-coat” de un donante sano se procedió a la purificación de PBMCs y la activación de las células NK. Se realizaron marcajes de CD3 y CD56 de los PBMCs mostrando un aumento progresivo del porcentaje de la población de células NK: 5,21%, 8,28%, 67,2% y 68,5% respectivamente (Figura 7). La población doble negativa desaparece a partir del día 14, debido probablemente a la muerte de aquellas células que no han recibido señales de activación. A día 14 se trabajó en otro citómetro debido a un problema técnico, por lo que el protocolo del citómetro varió, observándose una distribución distinta de las poblaciones, aunque los porcentajes no variaron respecto a los obtenidos a día 21.

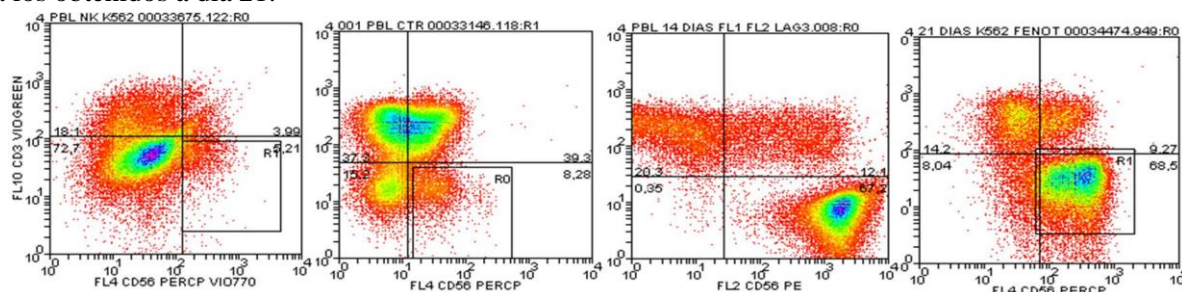


Figura 7. Caracterización de la población de células en expansión. Se analizaron las poblaciones presentes en el cultivo de células NK en expansión en función de la expresión de las proteínas CD56 y CD3 mediante citometría de flujo según se describe en materiales y métodos 5.6. Se muestra el diagrama de puntos enfrentando CD56 y CD3. De izquierda a derecha días 5, 7, 14 y 21 (n=1).

Para analizar la actividad citotóxica de las células NK activadas se puso a punto una técnica basada en la cuantificación del número de células GFP positivas por citometría de flujo (apartado de material y métodos 5.7.1.). Para validar este método se sembraron en los pocillos un número decreciente de células. Se estableció el mayor número de células sembradas como el 100% y se limitó el tiempo de toma de muestra del citómetro a 100 segundos. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos. El número de células detectadas por citometría muestran un descenso proporcionado al número de células presentes en cada pocillo. Se consideró que los resultados se adecuaban por lo que se decidió aplicar esta técnica para el estudio de células viables tras tratamiento con células NK. Este método facilita en gran medida el protocolo de lectura de la citotoxicidad de las células NK frente a las dianas, células SH-SY5Y GFP, permitiendo distinguir de forma fiable las poblaciones celulares.

| % células sembradas | % células leído |
|---------------------|-----------------|
| 100 | 100 |
| 80 | 83.63 |
| 60 | 52.08 |
| 40 | 36.82 |
| 20 | 21.33 |
| 10 | 10.32 |

Tabla 1. Porcentaje de células viables respecto al cultivo de 50.000 células. El porcentaje de células sembradas representa el descenso en el número de células presentes en cada pocillo y el porcentaje de células leído, el descenso de células detectadas en el citómetro tras su procesado (n=1).

Una vez validado el método se procedió al estudio de citotoxicidad con las células NK y las células SH-SY5Y GFP cultivadas en 2D y 3D. Se observó un menor número de células en los pocillos en los que se usó un mayor ratio de células NK: células SH-SY5Y GFP (Figura 8). En el caso del ratio 1:1 solo se observó disminución de células viables a tiempos mayores de 5h en cultivos 2D o 24h en cultivos 3D. En la figura III de los anexos se muestra un diagrama de puntos representativo de los datos obtenidos. Para el ratio 6:1, se observó una disminución marcada a todos los tiempos. En la comparación de la actividad citotóxica de células NK activadas durante un periodo de 5 o 21 días, se detectó un menor número de células viables al enfrentarse con células NK activadas durante 21 días. Comparando los modelos 2D y 3D a 24 horas de actuación de las células NK, se observa una resistencia mayor en el modelo 3D, encontrándose un mayor número de células viables.

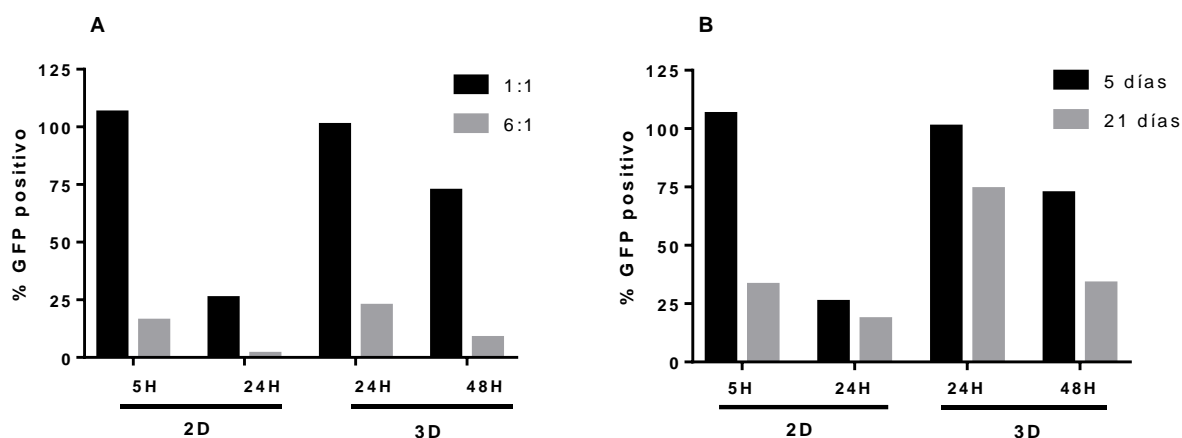


Figura 8. Muerte celular inducida por células NK activadas sobre la línea celular SH-SY5Y GFP cultivadas en 2D y 3D. En los diagramas de barras se representa el porcentaje de células SH-SY5Y GFP respecto al control sin tratar. Se consideró la fluorescencia de la GFP como marcador de viabilidad y para estandarizar los resultados obtenidos, se dividió el número de células viables entre las células en el control respectivo. Modelos 2D y 3D de la línea celular SH-SY5Y GFP fueron incubados durante distintos tiempos con: A) Células NK expandidas durante 5 días a distintos ratios de células NK: células diana: en negro ratio 1:1, en gris 6:1. B) Células NK a ratio 1:1 activadas durante distintos tiempos: en negro 5 días de activación, en gris 21 días de activación. (n=1).

6.5. Expresión de las proteínas GFP y luciferasa en células SH-SY5Y.

Para obtener células GFP-luciferasa positivas se produjeron partículas virales en las células HEK 293T y con estas partículas virales se infectaron las células SH-SY5Y (materiales y métodos 5.10.1). Se usó la expresión de la proteína GFP como marcador de la transfección en las células HEK 293T y de la infección en las células SH-SY5Y de ambas proteínas, GFP y luciferasa. La transfección tuvo una eficiencia mayor que la infección según las imágenes obtenidas por microscopia. Por citometría de flujo se determinó la eficiencia de la infección de las células SH-SY5Y en un 63,3% (Figura 9).

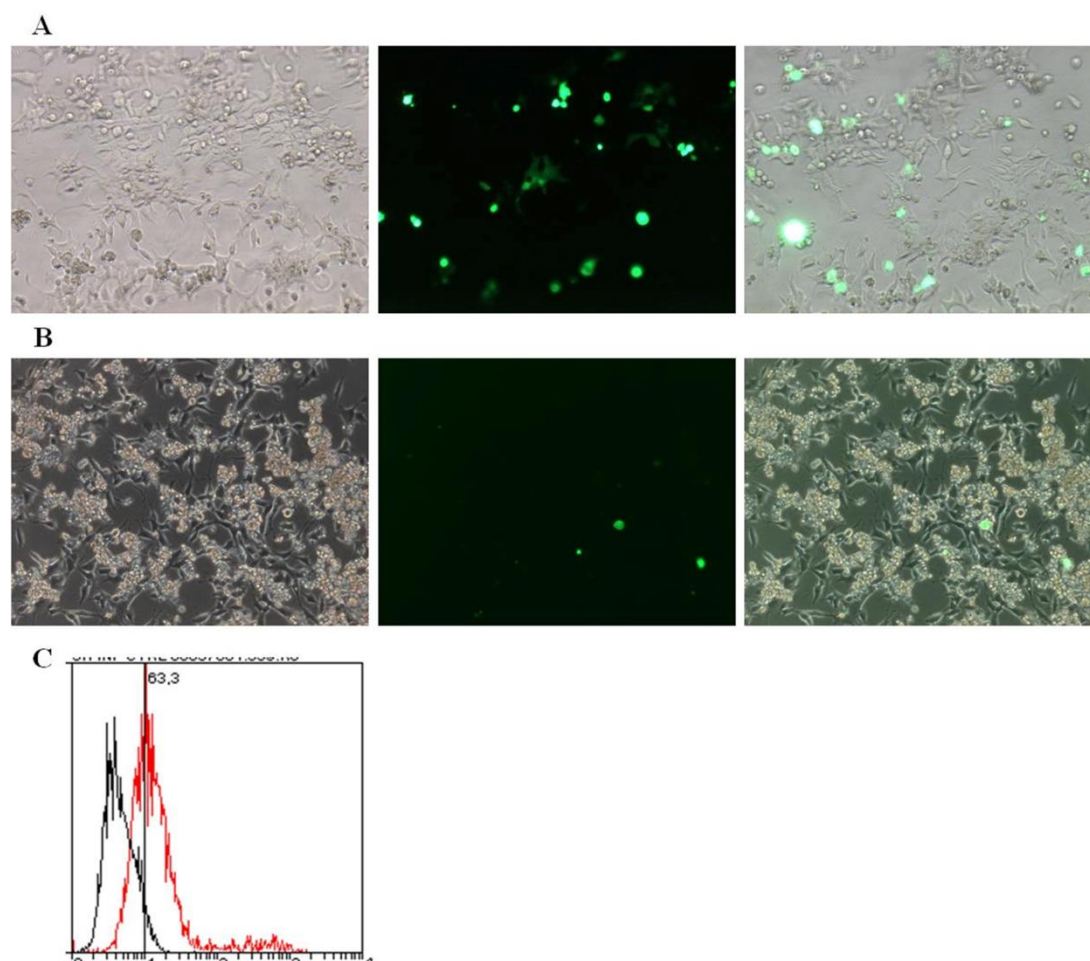


Figura 9. Expresión de la proteína GFP en células HEK 293T y SH-SY5Y. A) Células empaquetadoras HEK 293T durante la producción de virus a día 2 desde la aplicación de los plásmidos (n=3). B) Células SH-SY5Y infectadas a día 1 desde la aplicación de las partículas virales recogidas del medio de cultivo de las células HEK 293T (n=3). Los protocolos seguidos se describen en el apartado 6.8.1. A y B) Imágenes obtenidas en microscopio invertido de fluorescencia con el objetivo de 10 aumentos. Se muestran las imágenes de campo claro, de la fluorescencia de la proteína GFP y la combinación de ambas. C) Histograma obtenido por citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia de la proteína GFP en las células SH-SY5Y. En negro como control, células SH-SY5Y sin expresión de proteína GFP, en rojo, cultivo de células SH-SY5Y a los dos días de su infección (n=1).

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

El modelo celular seleccionado para el estudio de un nuevo tratamiento tiene amplias repercusiones en los resultados obtenidos, y mientras está premisa ha desencadenado la generación de miles de líneas celulares, pudiendo encontrar alrededor de 4.000 líneas celulares en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC por sus siglas en inglés), las formas de cultivo no muestran tal desarrollo. Actualmente esta corriente se está potenciando, apareciendo técnicas de cultivo alternativas al modelo de cultivo en 2D de crecimiento celular en adhesión sobre placas de cultivo. Se ha visto que esferoides de gran tamaño son capaces de mimetizar las propiedades de los tumores sólidos **Invalid source specified.**, propiedades que influyen en los efectos terapéuticos de diversos tratamientos de forma similar a la observada en tumores sólidos *in vivo*.

En este trabajo se han obtenido esferoides de NB la línea celular SH-SY5Y y estudiado sus características. Se observó una muerte basal mayor en los esferoides respecto al cultivo en 2D (Figura

6) y pese a ello, en los ensayos de citotoxicidad los esferoides mostraron mayor proliferación y viabilidad respecto a las condiciones de control (Figuras 5 y 8). Este hecho podría deberse al estrés generado en las células por el cambio de modelo de cultivo de 2D a 3D. Esto concuerda con la observación de células muertas en la superficie de los esferoides observadas por microscopía confocal y de fluorescencia (Figura 3). Una parte de la población de células no lograría adaptarse al crecimiento en 3D y morirían, aumentando la muerte basal de manera independiente a los tratamientos posteriores. En cambio, aquellas células que se adaptasen al cultivo en 3D y formaran esferoides, mostrarían mayor resistencia a los tratamientos. Esto cuestiona el método de gota colgante empleado para la generación de esferoides, que fuerza a las células a pasar de un cultivo 2D a 3D puntualmente, y se plantea como alternativa el cultivo continuado de las células en 3D como una posible mejora de la técnica. Actualmente se están desarrollando medios de cultivos que fomentan la agregación de células adherentes y promueven el crecimiento de las células en 3D, permitiendo el cultivo de líneas celulares en 3D. Estos métodos estimulan a las células a crecer en cultivo en 3D, pero no aseguran la homogeneidad de los esferoides obtenidos, por lo cual la combinación de ambos métodos, cultivo con medio pro-agregación y generación de esferoides homogéneos por gota colgante, podrían reducir la muerte basal encontrada en los ensayos posteriores. Este aumento de la muerte basal con el paso de cultivo en 2D a 3D no sucede en todos los tipos tumorales ya que en otros modelos no se observó que el cultivo puntual en 3D afectara a la viabilidad celular¹⁷.

En este estudio también se observaron diferencias en la arquitectura del cultivo de la línea celular SH-SY5Y entre los modelos 2D y 3D. Los esferoides presentaron una alta compactación, pese a esto, no se observó núcleo necrótico, el cual sí está descrito en otros modelos 3D³¹. El núcleo necrótico también se observa frecuentemente en tumores de neuroblastoma de pacientes¹³, lo que muestra la disparidad aun presente entre esta aproximación y la realidad.

Los estudios de viabilidad y muerte celular con los tratamientos aplicados (quimioterapia y células NK activadas), mostraron mayor resistencia en las células en cultivo 3D. El aumento de la resistencia se observó mayor para el tratamiento con células NK. Esto podría deberse a una menor accesibilidad de las células NK a las células tumorales con respecto al cultivo 2D. La oposición a la difusión presentada tanto por la compleja arquitectura celular de los esferoides como por la matriz extracelular existente supondría un impedimento para la difusión de las células NK, sin embargo, afectaría en menor medida en la acción de los fármacos, debido a su alta solubilidad.

La mayor resistencia frente a los fármacos estudiados de los modelos celulares *in vitro* de cultivo en 3D con respecto a los modelos 2D tendría una explicación más compleja que la simple dificultad de difusión. Procesos como una mayor eficiencia en los mecanismos de reparación del DNA, o un aumento en la expresión en membrana de transportadores ABC de multiresistencia a drogas, entre otros, podrían estar implicados. Esta descrito la existencia de un gradiente de oxígeno, así como de otros nutrientes, que se reduce desde el exterior al interior del esferoide³⁸. Como consecuencia, esto crearía un ambiente de hipoxia, lo cual provocaría un aumento en la expresión de factores de la familia inducible por hipoxia (HIF). Tian *et al.*, demostró que la proteína HIF-1 α se expresa en cultivos en 3D mientras que no lo hace en cultivos 2D³⁹. La expresión de HIF-1 α podría contribuir a la aparición de varios mecanismos de resistencia como los mencionados anteriormente. De hecho, se describe que HIF-1 α aumenta la expresión de proteínas de resistencia a multidroga como por ejemplo P-glicoproteína (P-gp). P-gp es una proteína de membrana que expulsa activamente fármacos, entre otras moléculas, de las células, y se ha descrito su implicación en el aumento de resistencia frente a Doxorrubicina en esferoides de carcinoma de mama^{40,41}.

En cuanto al estudio de expresión de proteínas que regulan la actividad de las células NK se mostraron diferencias tanto entre las líneas celulares estudiadas (SH-SY5Y y SK-N-BE(2)-C) como entre los modelos de cultivo 2D y 3D (Figura 4). Esto muestra que la variabilidad fenotípica no existe únicamente entre las líneas celulares sino también entre las formas de cultivo. Este hecho remarca la

importancia de la selección de las dos variables a la hora de determinar un modelo celular: la línea celular y el método de cultivo. En el cultivo 3D de las células SH-SY5Y se observó una menor expresión en membrana respecto al cultivo en 2D de varias proteínas cuya acción se relaciona con el sistema inmune: CEACAM-1, ICAM-1, CD47, PDL1 y calreticulina. En el caso de la galectina-9, proteína secretada e inhibitoria para la actuación de las células NK, fue mayor en el cultivo en 3D, y ambos modelos expresaron niveles similares de la proteína HLA-I y mínimos de HLA-II. Mientras se conoce el papel crítico de la proteína HLA-I en la inhibición de las células NK, no se conoce la magnitud inhibitoria del resto de estos ligandos, por lo que concluir una mayor resistencia en uno u otro modelo ante el ataque de células NK por este motivo sería inconsistente. Además, la capacidad de inhibición de estos ligandos está ligada a la capacidad de infiltración de las células NK en el tumor. Los ligandos que se mostraron disminuidos en el cultivo 3D son aquellos expresados en la membrana celular, los cuales exigen un contacto célula-célula entre las células NK y las células diana. Por otro lado, se observó un marcado aumento de la proteína galectina-9 (ligando de TIM3), la cual es secretada³⁷, por lo que no exige un contacto directo entre células NK y células diana. La infiltración de las células NK en tumores genera controversia en la literatura, describiéndose casos en los que la presencia de células NK en el interior del esferoide es alta y casos en los que es muy reducida⁴². En el caso de una baja infiltración, la secreción de galectina-9 podría ser el mecanismo más eficaz del esferoide para inhibir la actuación de las células NK. Al generar un gradiente de concentración inhibitorio en torno al esferoide que inhibiría la actividad citotóxica de las células NK sin necesidad de un contacto íntimo entre las células NK y células SH-SY5Y.

Estas consideraciones apuntan a la importancia del modelo celular seleccionado para el estudio de nuevas terapias como las células NK-CAR nombrada anteriormente para el tratamiento del NB. Estas células NK-CAR se han diseñado para dirigirse contra CD47 y calreticulina, cuya expresión fue constatada en las dos líneas celulares de NB estudiadas en 2D, y su expresión se mantuvo en esferoides de la línea celular SH-SY5Y, aunque disminuyó su magnitud. Esto valida el modelo de cultivo en esferoides de la línea celular SH-SY5Y como modelo adecuado para el desarrollo de la nueva inmunoterapia contra NB.

El estudio de terapias sobre modelos *in vitro* que simulan un mayor número de las condiciones de sistemas fisiológicos completos permite seleccionar y centrar el desarrollo en terapias con más probabilidad de éxito en los ensayos clínicos posteriores, lo que se traduce en una reducción de los tiempos y costes de desarrollo de nuevas terapias efectivas. Las tecnologías relacionadas con los cultivos celulares se han desarrollado adaptándose al trabajo con modelos de cultivo en 2D, por ello, el trabajo con modelos 3D muestra limitaciones, necesitándose el desarrollo de métodos de visualización más accesibles y de métodos de “*screening*” para posibilitar el procesado a mayor escala.

8. CONCLUSIONES

- La línea celular SH-SY5Y cultivada en un modelo de cultivo 3D en esferoides mostró una disminución marcada en la expresión de las proteínas CEACAM-1, CD47, PDL1 y calreticulina y un aumento de galectina-9 respecto al modelo de cultivo en 2D.
- Los esferoides de la línea celular SH-SY5 mostraron mayor resistencia frente a los tratamientos estudiados (drogas empleadas en quimioterapia y células NK activadas) respecto a la misma línea en cultivos convencionales en 2D.
- La línea celular SH-SY5Y expresa las proteínas CD47 y calreticulina tanto en cultivo 2D como 3D lo que nos permite usarla como modelo celular para el desarrollo de células NK-CAR dirigido contra células que expresen esta proteína.
- Se ha conseguido generar células SH-SY5Y que expresan las proteínas GFP y luciferasa, y serán útiles para los estudios de la eficacia del NK-CAR *in vivo*.

CONCLUSIONS

- 3D culture of SH-SY5Y cell line in spheroids showed a marked expression decrease of CEACAM-1, CD47, PDL1, and calreticulin proteins, and an increase of galectin-9 in compare with the 2D culture model.
- SH-SY5Y cell line spheroids showed higher resistance against the studied therapies (chemotherapy drugs and activated NK cells) in comparison with conventional 2D culture model.
- SH-SY5Y cell line expresses CD47 and calreticulin proteins in 2D and 3D culture models, allowing its use as a cellular model for the development of NK-CAR cells targeted against cells that express them.
- SH-SY5Y cells expressing GFP and luciferase proteins were generated, and they will be useful to evaluate the NK-CAR therapy *in vivo*.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO | Cancer. *WHO* (2019).
2. AECC. Registro Nacional de Tumores Infantiles | Asociación Española Contra el Cáncer. Available at: <https://www.aecc.es/es/actualidad/noticias/registro-nacional-tumores-infantiles>. (Accessed: 1st June 2019)
3. Pardo, J. *NK4Kid: Desarrollo y evaluación de nuevos protocolos de inmunoterapia de células NK y generación de células CAR.NK para el tratamiento de cáncer infantil (LLA, LMA y neuroblastoma)*. (2018).
4. Comprehensive Cancer Information - National Cancer Institute. Available at: <https://www.cancer.gov/>. (Accessed: 1st June 2019)
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
6. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
7. Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309–322 (2012).
8. Owen, J. A., Punt, J. & Stranford, S. A. *Kuby Immunology*. (W. H. Freeman and Company, 2014).
9. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).
10. Davis, K. L., Agarwal, A. M. & Verma, A. R. Checkpoint inhibition in pediatric hematologic malignancies. *Pediatric Hematology and Oncology* **34**, 379–394 (2017).
11. Newman, E. A. *et al.* Update on neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery* **54**, 383–389 (2019).
12. Bansal, D. *et al.* Management of Neuroblastoma: ICMR Consensus Document. *The Indian Journal of Pediatrics* **84**, 446–455 (2017).
13. Delfa, S. B., Rubio Aparicio, P. & Martínez Martínez, L. *Neuroblastoma*. **31**, (2018).
14. Shimada, H. *et al.* International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer* **92**, 2451–61 (2001).
15. Berlanga, P., Cañete, A. & Castel, V. Advances in emerging drugs for the treatment of neuroblastoma. *Expert Opinion on Emerging Drugs* **22**, 63–75 (2017).
16. Alonso-Camino, V., Harwood, S. L., Álvarez-Méndez, A. & Alvarez-Vallina, L. Efficacy and toxicity management of CAR-T-cell immunotherapy: a matter of responsiveness control or tumour-specificity? *Biochemical Society Transactions* **44**, 406–411 (2016).
17. Lanuza, P. M. *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* **7**, e1395123 (2018).
18. Sánchez-Martínez, D. *et al.* Activated Allogeneic NK Cells Preferentially Kill Poor Prognosis B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Frontiers in Immunology* **7**, 454 (2016).
19. Sánchez-Martínez, D. *et al.* Human NK cells activated by EBV + lymphoblastoid cells overcome anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in haematological cancer cells. *OncoImmunology* **4**, e991613 (2015).
20. Guillerey, C., Huntington, N. D. & Smyth, M. J. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nature Immunology* **17**, 1025–1036 (2016).
21. Hu, Y., Tian, Z. & Zhang, C. Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy. *Acta Pharmacologica Sinica* **39**, 167–176 (2018).
22. Leung, W. Infusions of Allogeneic Natural Killer Cells as Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research* **20**, 3390–3400 (2014).
23. Keyel, M. E. & Reynolds, C. P. Spotlight on dinutuximab in the treatment of high-risk neuroblastoma: development and place in therapy. *Biologics: Targets and Therapy* **Volume 13**, 1–12 (2018).
24. Food and Drug Administration. Unituxin (dinutuximab). (2015). Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2015/125516Orig1s000TOC.cfm. (Accessed: 1st June 2019)

25. European Medicines Agency (EMA). Unituxin. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/unituxin>. (Accessed: 1st June 2019)
26. Schumacher-Kuckelkorn, R. *et al.* Lack of immunocytological GD2 expression on neuroblastoma cells in bone marrow at diagnosis, during treatment, and at recurrence*. *Pediatric Blood & Cancer* **64**, 46–56 (2017).
27. Aktas, S. *et al.* “Don’t Eat Me” Signals of Neuroblastoma by CD47 for Immune Escape: A Novel Prognostic Biomarker. *Proceedings* **2**, 1538 (2018).
28. Hsu, W. M. *et al.* Calreticulin expression in neuroblastoma—a novel independent prognostic factor. *Annals of Oncology* **16**, 314–321 (2005).
29. EARA | European Animal Research Association. Available at: <http://eara.eu/es/>. (Accessed: 1st June 2019)
30. Nath, S. & Devi, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology & Therapeutics* **163**, 94–108 (2016).
31. Pampaloni, F., Reynaud, E. G. & Stelzer, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 839–845 (2007).
32. Nath, S. & Devi, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology & therapeutics* **163**, 94–108 (2016).
33. Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C. & de Boer, J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology* **31**, 108–115 (2013).
34. Shah, U.-K. *et al.* A three-dimensional in vitro HepG2 cells liver spheroid model for genotoxicity studies. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **825**, 51–58 (2018).
35. Steff, A.-M., Fortin, M., Arguin, C. & Hugo, P. Detection of a decrease in green fluorescent protein fluorescence for the monitoring of cell death: An assay amenable to high-throughput screening technologies. *Cytometry* **45**, 237–243 (2001).
36. Das, M., Zhu, C. & Kuchroo, V. K. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunological Reviews* **276**, 97–111 (2017).
37. Gonçalves Silva, I. *et al.* The Tim-3-galectin-9 Secretory Pathway is Involved in the Immune Escape of Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *EBioMedicine* **22**, 44–57 (2017).
38. Grimes, D. R., Fletcher, A. G. & Partridge, M. Oxygen consumption dynamics in steady-state tumour models. *Royal Society Open Science* **1**, 140080–140080 (2014).
39. Tian, X. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α enhances the malignant phenotype of multicellular spheroid HeLa cells in vitro. *Oncology letters* **1**, 893–897 (2010).
40. Mellor, H. R. & Callaghan, R. Accumulation and distribution of doxorubicin in tumour spheroids: the influence of acidity and expression of P-glycoprotein. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **68**, 1179–1190 (2011).
41. WARTENBERG, M. *et al.* Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *The FASEB Journal* **17**, 503–505 (2003).
42. Giannattasio, A. *et al.* Cytotoxicity and infiltration of human NK cells in in vivo-like tumor spheroids. *BMC Cancer* **15**, 351 (2015).